



**ΕΚΕΤΑ**  
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ  
ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

**ΙΝΕΒ**

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ  
ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο: Αναστασία Αναστασιάδου

Πατρώνυμο: Ανέστης

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κώστας Σταματόπουλος, Διευθυντής ΙΝΕΒ|ΕΚΕΤΑ

Αντώνιος Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής

Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος, Καθηγητής

ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2021



**CERTH**  
CENTRE FOR RESEARCH & TECHNOLOGY HELLAS



**INAB**

INSTITUTE OF APPLIED BIOSCIENCES

UNIVERSITY OF THESSALY  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

## **DIPLOMA PROJECT**

# **STUDY OF GENETIC VARIATIONS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

First name: Anastasia Anastasiadou

Father's name: Anestis

### **ADVISORY COMMITTEE**

Kostas Stamatopoulos, Director INAB | CERTH

Antonios Giakountis, Assistant Professor

Konstantinos Mathiopoulos, Professor

LARISSA, JULY 2021

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Περιεχόμενα.....  | 3  |
| Πρόλογος.....   | 5  |
| Περίληψη.....   | 6  |
| Abstract .....  | 9  |
| 1. Εισαγωγή .....   | 12 |
| 1.1 Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα.....   | 12 |
| 1.1.1 Δομή και λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος .....                             | 12 |
| 1.1.2 Έμφυτη ανοσία.....  | 14 |
| 1.1.3 Επίκτητη ανοσία .....   | 15 |
| 1.2 Αντιγόνα- Ανοσογόνα.....  | 17 |
| 1.3 Χυμική ανοσία .....   | 18 |
| 1.3.1 Β λεμφοκύτταρο .....  | 18 |
| 1.3.2 Ο Β κυτταρικός υποδοχέας .....  | 19 |
| 1.4 Οντογένεση Β κυττάρων.....  | 20 |
| 1.4.1 Αντιγονο-ανεξάρτητη φάση ανάπτυξης.....   | 22 |
| 1.4.2 Αντιγονο-εξαρτώμενη φάση ανάπτυξης.....   | 24 |
| 1.4.3 Βλαστικά κέντρα.....  | 25 |
| 1.5 Πληθυσμοί Β λεμφοκυττάρων .....   | 29 |
| 1.6 Πρωτογενή και Δευτερογενή λεμφικά όργανα.....                                     | 30 |
| 1.6.1 Πρωτογενή λεμφικά όργανα .....  | 31 |
| 1.6.2 Δευτερογενή λεμφικά όργανα .....  | 32 |
| 1.7 Αιματολογικές κακοήθειες.....   | 33 |
| 1.8 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία .....   | 34 |
| 1.9 Διάγνωση.....   | 36 |
| 1.10 Πρόγνωση.....  | 36 |
| 1.11 Γενετικοί δείκτες.....   | 37 |
| 1.11.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....  | 37 |
| 1.11.2 Σωματικές μεταλλάξεις .....  | 39 |
| 1.12 Το γονίδιο <i>TP53</i> .....   | 39 |
| 1.12.1 Φυσιολογική λειτουργία της p53.....  | 40 |
| 1.12.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>TP53</i> .....                                      | 43 |
| 1.12.3 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και μεταλλάξεις του γονιδίου <i>TP53</i> ..... | 44 |
| 1.13 Αντικείμενο μελέτης.....   | 45 |
| 2. Υλικά και μέθοδοι.....   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1 Ομάδα μελέτης.....   | 46 |
| 2.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος .....                                   | 46 |
| 2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA.....   | 47 |
| 2.4 Ενίσχυση του γονιδίου <i>TP53</i> με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....                      | 48 |
| 2.5 Ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR .....   | 49 |
| 2.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR για το γονίδιο <i>TP53</i> .....                                  | 51 |
| 2.7 Ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR .....   | 51 |
| 2.8 Κατασκευή βιβλιοθηκών με τη χρήση εκκινητών μοριακών ευρετηρίων Nextera XT Index kit v2.    53 |    |
| 2.9 Καθαρισμός, ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών.....                 | 54 |
| 2.10 Ποιοτικός έλεγχος και ποσοτικός προσδιορισμός των βιβλιοθηκών .....                           | 55 |
| 2.11 Αλληλούχηση στον αλληλουχητή επόμενης γενιάς MiSeq Illumina.....                              | 56 |
| 2.12 Βιοπληροφορική ανάλυση .....  | 58 |
| 3. Αποτελέσματα .....  | 59 |
| 4. Συζήτηση.....   | 64 |
| Βιβλιογραφία .....   | 67 |

## Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), σε συνεργασία με το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κώστα Σταματόπουλο, Διευθυντή του INEB|ΕΚΕΤΑ για τη δυνατότητα που μου προσέφερε και την υποστήριξη που μου παρείχε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Αντώνιου Γιακουντή, Επίκουρου Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμμετοχή του στην Τριμελή επιτροπή.

Σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας είχε η κ. Μαρία Καρυπίδου, Βιολόγος του INEB-ΕΚΕΤΑ, και την ευχαριστώ ιδιαίτερως καθώς παρακολουθούσε ενεργά όλες τις φάσεις εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δίνοντας λύσεις σε μεθοδολογικά και άλλα προβλήματα που προέκυψαν.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Πασέντση, Τεχνικό Επιστήμονα του INEB|ΕΚΕΤΑ, για την πολύτιμη και πολύπλευρη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την ευχάριστη και παραγωγική συνεργασία μας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για τη διαρκή υποστήριξη και την ενθάρρυνσή τους. Αντίστοιχα, ευχαριστώ τους φίλους μου και τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτήν τη διαδρομή.

Αναστασία Αναστασιάδου

Θεσσαλονίκη, Ιούλιος 2021

## Περίληψη

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι εξειδικευμένος κυτταρικός πληθυσμός του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου, υπεύθυνα για την εκτέλεση των δράσεων της χυμικής άνοσης απάντησης στο πλαίσιο της προσαρμοστικής ανοσίας. Ειδικότερα, τα Β λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Μετά την ωρίμανση τους εγκαταλείπουν το μυελό των οστών εκφράζοντας στην επιφάνειά τους έναν μοναδικό υποδοχέα δέσμευσης αντιγόνου, που καλείται Β κυτταρικός υποδοχέας (B cell Receptor, BcR). Ο υποδοχέας αυτός περιλαμβάνει ένα μεμβρανικό μόριο ανοσοσφαιρίνης, μέσω του οποίου τα Β λεμφοκύτταρα είναι σε θέση να αναγνωρίζουν αντιγόνα.

Η επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity) αποτελείται από δύο τύπους ανοσίας, τη χυμική και την κυτταρική. Τα Β λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη χυμική ανοσία. Κατά τη χυμική ανοσία, όταν ένα Β λεμφοκύτταρο αλληλεπιδράσει για πρώτη φορά με ένα διαλυτό αντιγόνο που αναγνωρίζει ο υποδοχέας του, θα πολλαπλασιαστεί και θα διαφοροποιηθεί σε Β κύτταρο μνήμης (memory B cell) και σε πλασματοκύτταρο (plasma cell). Τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν αντιγόνα τα οποία έχουν ήδη αντιμετωπίσει στο παρελθόν και σε πιθανή επόμενη επαφή με το ίδιο αντιγόνο ενεργοποιούν μια πιο ισχυρή και άμεση άνοση απάντηση. Από την άλλη, τα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν μεμβρανικό αντίσωμα, αλλά παράγουν και εκκρίνουν τα αντισώματα.

Οι αιματολογικές κακοήθειες ανήκουν στα νοσήματα του αιμοποιητικού ιστού και αποτελούν περίπου το 10% του συνόλου των καρκίνων. Στις αιματολογικές κακοήθειες ανήκουν οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και το πολλαπλούν μύελωμα. Επιπλέον, οι λευχαιμίες υποδιαιρούνται σε χρόνιες και οξείες, ανάλογα με την κλινική πρόοδο της νόσου, όσο και σε λεμφικές και μυελικές, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που επηρεάζουν.

Μια από τις πιο κοινές λευχαιμίες είναι η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). Η ΧΛΛ αποτελεί την πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο, εμφανίζεται

με σχεδόν διπλάσια συχνότητα (1,7:1) στους άντρες απ' ό,τι στις γυναίκες και η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση είναι τα 72 έτη. Χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό και την συσσώρευση Β κυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών, στο σπλήνα και στους λεμφαδένες. Τα νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους δείκτες CD5, CD19 και CD23.

Η εξέλιξη της νόσου είναι αργή και διακρίνεται από μεγάλη κλινική ετερογένεια. Η διάγνωση της ασθένειας συνήθως πραγματοποιείται μετά από τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο καθώς οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση. Μεταξύ των ασθενών λίγοι χρειάζονται θεραπεία αμέσως μετά τη διάγνωση, ενώ άλλοι δεν χρειάζονται θεραπεία για πολλά χρόνια.

Η ετερογένεια στην κλινική εξέλιξη της ΧΛΛ παρακίνησε την αναζήτηση και οδήγησε στην αναγνώριση προγνωστικών παραγόντων όπως είναι η κατάσταση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (IGHV), διάφοροι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες όπως ο CD38 και ZAP-70, αλλά επίσης και μεταλλάξεις γονιδίων, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*.

Το γονίδιο *TP53* (Tumor suppressor p53) είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεταλλάσσεται συχνά σε διάφορους καρκίνους, τόσο συμπαγείς, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα ή ο καρκίνος του μαστού, όσο και αιματολογικούς, όπως η οι οξείες λευχαιμίες αλλά και η ΧΛΛ. Κανονικά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και η έκφρασή του αυξάνεται όταν υπάρχει κάποιο είδος κυτταρικού στρες. Η πρωτεΐνη p53, που παράγεται από το συγκεκριμένο γονίδιο, έχει χαρακτηριστεί ως 'Guardian of the genome' και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Εάν ενεργοποιηθεί η έκφραση του γονιδίου *TP53* και επαυξηθεί η παραγωγή της πρωτεΐνης, η p53 στη συνέχεια θα οδηγήσει σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, το κύτταρο θα έχει τον απαραίτητο χρόνο ώστε να επιδιορθώσει την βλάβη. Σε περίπτωση που δεν επιδιορθωθεί η βλάβη, τότε η p53 προάγει την απόπτωση του κυττάρου. Εφόσον όμως υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53*, η πρωτεΐνη που θα παραχθεί δε θα είναι λειτουργική κι έτσι θ' απενεργοποιηθεί η ογκοκατασταλτική της δράση. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οδηγήσει σε ογκογένεση, αφού σε ενδεχόμενη βλάβη του DNA το κύτταρο δε σταματά την ανάπτυξή του.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την ύπαρξη *TP53*-μεταλλαγμένων μικροκλώνων με χρήση μεθοδολογίας αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) σε ομάδα ασθενών με ΧΛΛ. Οι διαταραχές του γονιδίου *TP53* (έλλειψη στο χρωμόσωμα 17p όπου εντοπίζεται το γονίδιο ή μεταλλάξεις) αποτελούν σημαντικό προγνωστικό και προβλεπτικό βιοδείκτη και επηρεάζουν την επιλογή φαρμακευτικής αγωγής. Ανιχνεύονται στο 10-15% των ασθενών πριν τη χορήγηση θεραπείας και σχετίζονται με δυσμενή κλινική πορεία και αντοχή στην ανοσοχημειοθεραπεία.

Η ανίχνευση των διαταραχών του γονιδίου *TP53* στην κλινική ρουτίνα πραγματοποιείται με ποικίλες διαγνωστικές μεθόδους. Η έλλειψη τμήματος ή όλου του γονιδίου ανιχνεύεται κυρίως με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH). Ωστόσο, σημαντικό ποσοστό ασθενών με διαταραχές του γονιδίου *TP53* φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο, οι οποίες μέχρι πρόσφατα ανιχνεύονταν κυρίως με αλληλούχηση κατά Sanger, μεθοδολογία χαμηλής ευαισθησίας (όριο ανίχνευσης: 15-20%). Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία καθώς και η διαθεσιμότητα εργαλείων και λογισμικών ικανών να αναλύσουν δεδομένα μεγάλης κλίμακας καθιστούν δυνατή την αξιόπιστη ανίχνευση μεταλλάξεων με συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφου (Variant Allele Frequency, VAF) έως και 2% σε υπο-κλώνους (minor subclones) λευχαιμικών Β κυττάρων που συνυπάρχουν με τον κύριο κλώνο δίνοντας νέα δυναμική στον τομέα της μοριακής διαγνωστικής.



## Abstract

B lymphocytes are a specialized cell population of the human immune system mediating humoral immune responses in the context of adaptive immunity. In particular, B lymphocytes are produced and mature in the bone marrow. As they mature, they leave the bone marrow expressing on their surface a unique antigen binding receptor, called B cell Receptor (BcR). This receptor is a membrane antibody molecule which endows B cells with the ability to recognize antigens.

Adaptive immunity consists of humoral and cellular immunity. B lymphocytes are responsible for the former. During a humoral immune response, when a B lymphocyte interacts for the first time with a soluble antigen recognized by its receptor, the B lymphocyte will multiply and differentiate into either a memory B cell or a plasma cell. Memory B cells have the ability to recognize antigens which they have already dealt with in the past and in a possible subsequent contact with the same antigen they will trigger a stronger and more immediate immune response. On the other hand, plasma cells do not express a membrane antibody, but produce and secrete antibodies.

Hematological malignancies are diseases of the hematopoietic tissue and they constitute 10% of all cancers. Leukemias, lymphomas, myelodysplastic syndromes and multiple myeloma belong to this group of cancers. Leukemias can be subdivided into both chronic and acute, depending on the clinical progression of the disease, as well as myeloid and lymphoid, depending on the cell type that is affected.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the commonest leukemia in western countries. CLL occurs with almost twice the frequency (1,7:1) in male than in female and the median age at diagnosis is 72 years. CLL characterized by the proliferation and accumulation of B cells within the blood, bone marrow, lymph nodes and spleen. Neoplastic B lymphocytes express on their surface CD5, CD19 and CD23.

The progression of the disease is slow showing great clinical heterogeneity. The diagnosis of the disease is usually made on the occasion of lymphocytosis detected during random laboratory testing, as most patients are asymptomatic at the time of

diagnosis. Among patients, some need treatment immediately after diagnosis, while others do not need treatment for many years.

The great variability in the clinical course of CLL prompted the quest for prognostic markers and led to the identification of several such markers, such as the somatic hypermutation status of the immunoglobulin heavy variable genes (IGHV), immunophenotypic markers such as CD38 and ZAP-70, but also mutations, such as in the *TP53* gene.

The *TP53* (Tumor suppressor p53) is a tumor suppressor gene, one of the most commonly mutated genes in various cancers, such as lung or breast cancer. Normally it is expressed at low, while its expression increases when there is some kind of cellular stress. The p53 protein, produced by this gene, has been characterized as the 'Guardian of the genome' and acts as a transcription factor that regulates the cell cycle. When a stressor activates its expression, the p53 protein is also up-regulated, leading to the inhibition of the cell cycle, offering the cell the time needed to repair the damage. If the damage is not repaired, then p53 promotes cell apoptosis. However, if there is a mutation in the *TP53* gene, the mutant p53 will not be functional and, thus, its tumor suppressor activity is inactivated. This is likely to lead to oncogenesis, as in the event of DNA damage the cell does not stop growing.

In the present study we investigated the existence of *TP53*-mutant microclones using Next Generation Sequencing (NGS) in a group of patients with CLL. Disorders of the *TP53* gene (deletion or mutations) are an important prognostic and predictive biomarker and influence the choice of medication. They are detected in 10-15% of patients before treatment and are associated with adverse clinical outcome and resistance to immunochemotherapy. Detection of *TP53* gene disorders in the clinical routine is performed by a variety of diagnostic methods. Lack of part or all of the gene is mainly detected by fluorescent in situ hybridization (FISH). However, a significant proportion of patients with *TP53* gene disorders carry point mutations in the gene, which until recently were detected mainly by Sanger sequencing, a low-sensitivity methodology (detection limit: 15-20%). The development of the new generation sequencing methodology (NGS) characterized by increased sensitivity as well as the

availability of tools and software capable of analyzing large-scale data make it possible to reliably detect mutations with allele occurrence frequency (Variant Allele Frequency, VAF) up to 2% in minor subclones of leukemic B cells that coexist with the main clone, giving new dynamics in the field of molecular diagnostics.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα

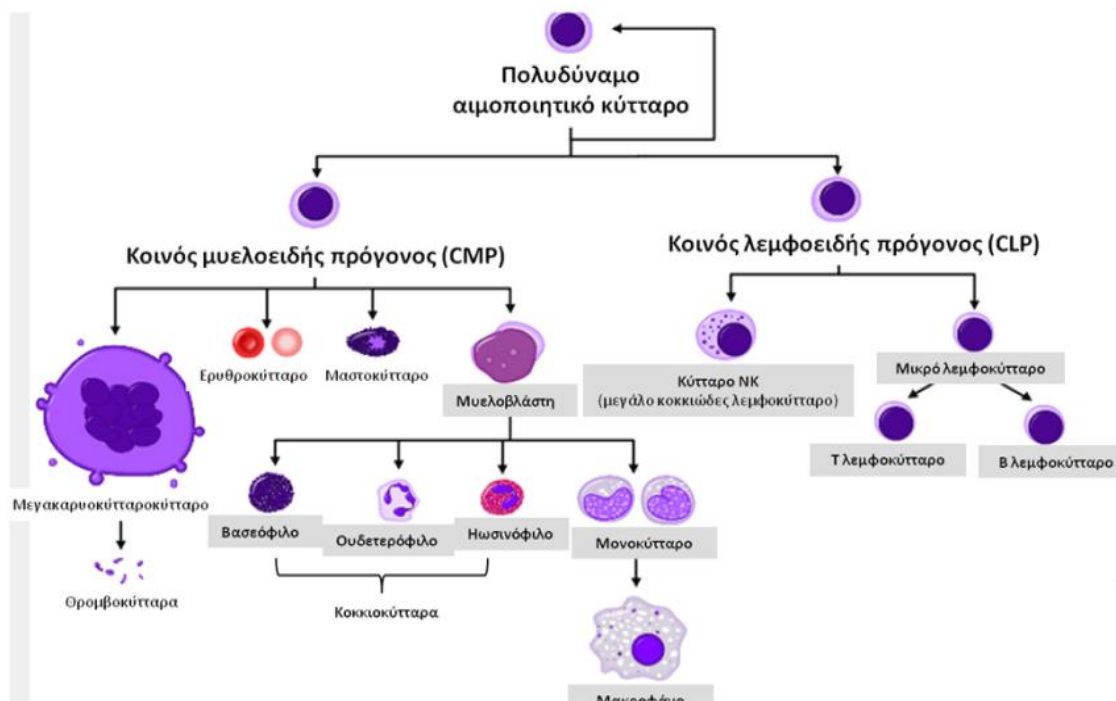
### 1.1.1 Δομή και λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα συνιστά τον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού. Ανοσία καλείται η ικανότητα του οργανισμού να προστατεύει τον εαυτό του εξουδετερώνοντας δυνητικά επιβλαβείς εισβολείς (όπως βακτήρια και ιούς) ή παθολογικά κύτταρα (όπως τα καρκινικά κύτταρα). Η ανοσία διαθέτει τόσο λιγότερα ειδικά όσο και ειδικά συστήματα άμυνας. Η έμφυτη ανοσία (innate immunity) είναι το λιγότερο ειδικό σύστημα και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας. Προϋπάρχει της μόλυνσης και βασικό χαρακτηριστικό της είναι η αντιμετώπιση οποιουδήποτε παθογόνου μικροοργανισμού. Η μη ειδική άμυνα περιλαμβάνει μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την είσοδο των μικροοργανισμών μέσω ανατομικών φραγμών (όπως το δέρμα, οι βλεννογόνοι, το κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού) αλλά και βιοχημικών φραγμών (όπως το γαλακτικό οξύ, το γαστρικό υγρό και η λυσοζύμη). Η επίκτητη ανοσία (adaptive immunity) αποτελεί το ειδικό σύστημα άμυνας. Ενεργοποιείται όταν η έμφυτη ανοσία δεν εξουδετερώνει τους μικροοργανισμούς και χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση και μνήμη.<sup>1-2</sup>

Υπεύθυνα για την ανοσία είναι τα λευκοκύτταρα ή λευκά κύτταρα του αίματος (white blood cells, WBC). Υπάρχουν τρεις ομάδες λευκοκυττάρων, καθεμία από τις οποίες έχει διαφορετική λειτουργία. Τα λεμφοκύτταρα (φυσικά φονικά κύτταρα, Β και Τ λεμφοκύτταρα) αποτελούν τη μια ομάδα κυττάρων. Τα Β κύτταρα διακρίνονται από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα λόγω της σύνθεσης και έκφρασης μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών, οι οποίες λειτουργούν και ως υποδοχείς συγκεκριμένων αντιγόνων. Επιπλέον, τα Β κύτταρα έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνα στα Τ κύτταρα. Μια άλλη ομάδα λευκοκυττάρων είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, Β λεμφοκύτταρα). Τα κύτταρα αυτά ενδοκυτταρώνουν το αντιγόνο και παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους τμήματά του

συζευγμένα με μεμβρανικές πρωτεΐνες που καλούνται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τέλος, υπάρχουν και τα εκτελεστικά κύτταρα (Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα), τα οποία συμβάλλουν στην εξουδετέρωση του παθογόνου.

Τα λευκοκύτταρα προέρχονται από κοινούς κυτταρικούς προγόνους, τα πολυδύναμα ή αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο μυελό των οστών (Εικόνα 1). Τα αυτο-ανανεούμενα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης μπορεί να διαφοροποιηθούν είτε σε ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο είτε σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα δημιουργούν τα Β, Τ και ΝΚ (φυσικά φονικά) κύτταρα. Από την άλλη, τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα δημιουργούν τα προγονικά κύτταρα των ερυθρών αλλά και των λευκών αιμοσφαιρίων, αλλά και τα πρόδρομα κύτταρα των αιμοπεταλίων.<sup>1-2</sup>



**Εικόνα 1:** Αιμοποίηση

(Προέλευση: LODISH HF. *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman and Company;2004)

### 1.1.2 Έμφυτη ανοσία

Η έμφυτη ανοσία αποτελεί τη μη ειδική άμυνα του οργανισμού. Περιλαμβάνει τους μηχανισμούς που θα εμποδίσουν την είσοδο των παθογόνων στον οργανισμό, αλλά και άλλους που θα αντιμετωπίσουν τους μικροοργανισμούς αν καταφέρουν τελικά να εισέλθουν στον οργανισμό. Στους εξωτερικούς φραγμούς ανήκουν το δέρμα και οι βλεννογόνοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα βλεννώδη επιθήλια που επενδύουν τους αγωγούς του αναπνευστικού, του γαστρεντερικού και του ουρογεννητικού συστήματος.<sup>1</sup>

Από την στιγμή που ένα παθογόνο περάσει τους εξωτερικούς φραγμούς, θα ενεργοποιηθούν διάφορες μη ειδικές ανοσοποιητικές αποκρίσεις μέσω της αναγνώρισης των εισβολέων. Η αναγνώριση αυτή συμβαίνει με τη βοήθεια υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRR) οι οποίοι αναγνωρίζουν σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), όπως οι υδατάνθρακες στα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων. Οι πρώτοι PRR που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLR). Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται είτε στην κυτταρική μεμβράνη είτε ενδοκυττάρια. Στα κύτταρα που φέρουν τέτοιους υποδοχείς ανήκουν και τα φαγοκύτταρα. Όταν ένα φαγοκύτταρο αναγνωρίσει μέσω του TLR ένα παθογόνο θα το εγκολπώσει και θα το καταστρέψει. Επίσης, η ενεργοποίηση των TLR θα οδηγήσει στην έκκριση χημικών ουσιών, οι οποίες συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στη διαδικασία της φλεγμονής. Στους PRR εκτός από τους TLR ανήκουν και άλλοι τύποι υποδοχέων όπως οι υποδοχείς τύπου NOD (Nod-Like Receptors, NLR) οι οποίοι αναγνωρίζουν ενδοκυττάρια PAMP.<sup>3</sup>

Επιπλέον, οι έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις περιλαμβάνουν πέρα από την δημιουργία φλεγμονής και την έκκριση ιντερφερόνης, την ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων αλλά και την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος.<sup>2</sup>

### 1.1.3 Επίκτητη ανοσία

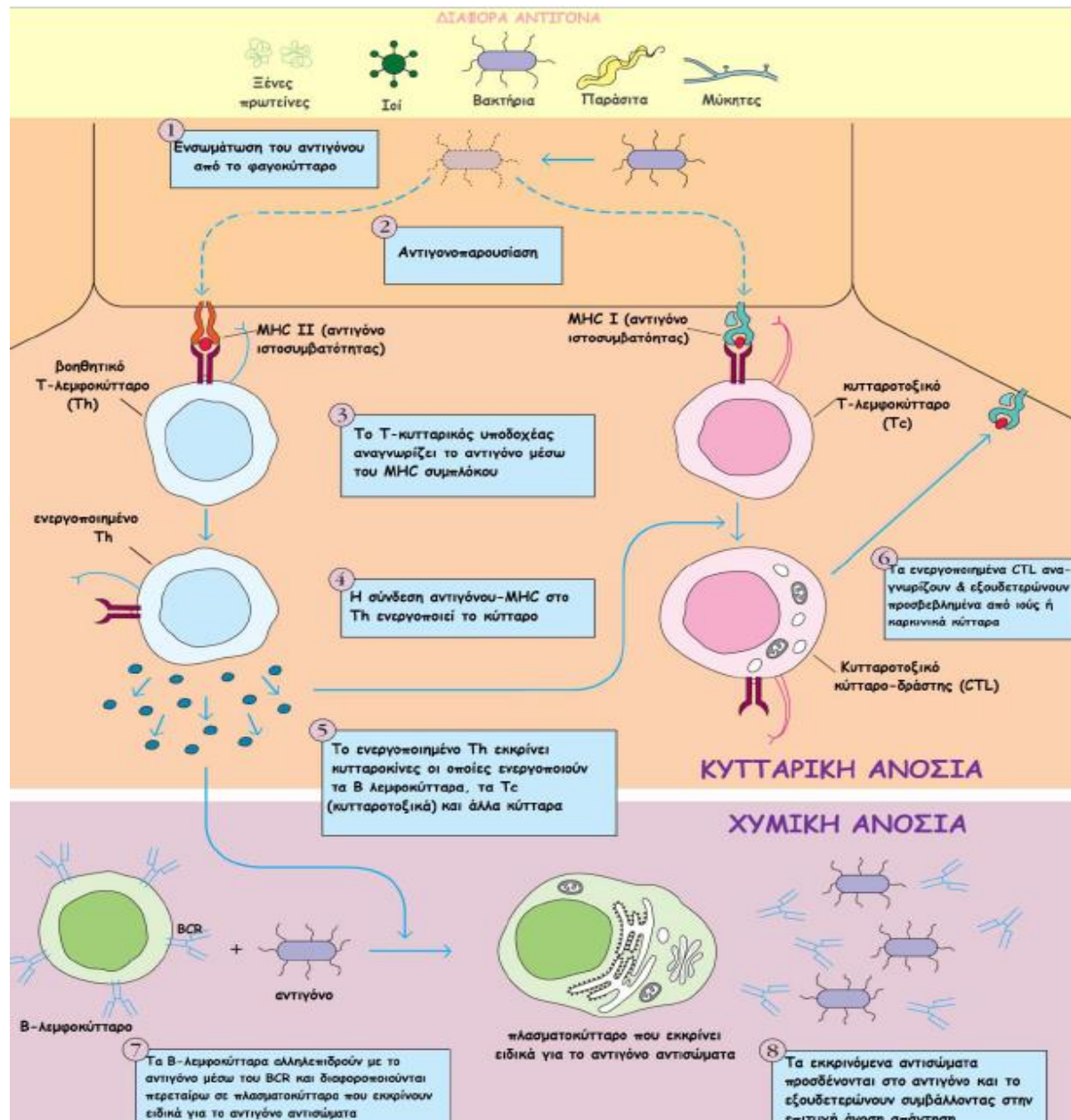
Η επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity) είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη. Σε αυτήν συμμετέχουν τα λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα που εκκρίνουν. Διαθέτει 4 βασικά χαρακτηριστικά:

- 1) Αντιγονική ειδικότητα: τα αντισώματα μπορούν να διακρίνουν τα αντιγόνα ακόμα και αν έχουν μικρές δομικές διαφορές
- 2) Ετερογένεια: λόγω της τεράστιας ποικιλίας λεμφοκυττάρων διαφορετικής αντιγονικής ειδικότητας
- 3) Άνοση μνήμη: δίνει τη δυνατότητα πιο γρήγορης ανοσολογικής απάντησης σε δεύτερη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο
- 4) Αναγνώριση εαυτού/μη εαυτού: τα λεμφοκύτταρα δεν απαντούν σε αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού, αλλά μόνο σε ξένα αντιγόνα<sup>4</sup>

Υπάρχουν δύο τύποι επίκτητης ανοσίας. Η χυμική ανοσία, που διαμεσολαβείται μέσω αντισωμάτων τα οποία παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, και η κυτταρική ανοσία, η οποία στηρίζεται στη δράση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων. Τα B και T λεμφοκύτταρα κατατάσσονται σε διάφορους πληθυσμούς ανάλογα με την λειτουργία τους. Ειδικότερα τα T λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε: βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (T helper, T<sub>H</sub>) και κυτταροτοξικά T (T cytotoxic, T<sub>C</sub>). Τα B λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε B λεμφοκύτταρα μνήμης τα οποία θα ενεργοποιηθούν σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο και έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και σε πλασματοκύτταρα, τα οποία συνθέτουν και εκκρίνουν αντισώματα.<sup>4</sup>

Η ειδική άνοση απάντηση περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι αυτό της αναγνώρισης, κατά τη διάρκεια του οποίου ειδικές δομές του αντιγόνου, οι αντιγονικοί επίτοποι, αναγνωρίζονται από τους επιφανειακούς υποδοχείς των B (B cell Receptor-BcR) και T (T Cell Receptor-TR) κυττάρων. Στο στάδιο της ενεργοποίησης συμβαίνει ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα τα B κύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα, ενώ τα T<sub>H</sub> ενεργοποιούνται και εκκρίνουν κυτταροκίνες οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των B και T<sub>C</sub> κυττάρων. Τα T<sub>C</sub> διαφοροποιούνται σε

κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Τέλος, στην εκτελεστική φάση τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα εκδηλώνουν τη δράση τους και καταστρέφουν τα παθογόνα. Τα CTL μεσολαβούν στη θανάτωση τροποποιημένων εαυτών κυττάρων, για παράδειγμα κυττάρων μολυσμένων με ιό (Εικόνα 2).<sup>1-2</sup>



Εικόνα 2: Κυτταρική και χυμική ανοσία

(Προέλευση: Kuby, J, Immunology 6th edition, W.H. Freeman and Company, 2007)



## 1.2 Αντιγόνα- Ανοσογόνα

Τα αντιγόνα είναι τα μόρια τα οποία επάγουν την άνοση απόκριση. Υπάρχουν δυο διακριτές ανοσολογικές ιδιότητες, η ανοσογονικότητα και η αντιγονικότητα. Ανοσογόνο είναι ένα μόριο το οποίο προκαλεί ανοσολογική απάντηση (όπως βακτήρια, μύκητες, παράσιτα ιούς ή προϊόντα τους). Από την άλλη, αντιγόνο είναι ένα μόριο το οποίο αντιδρά με τα τελικά προϊόντα της άνοσης απάντησης (αντισώματα ή/και υποδοχείς T κυττάρων). Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσογονικότητα ενός μορίου. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι η ξενικότητα. Αντιγόνα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί στα ανώριμα λεμφοκύτταρα κατά την ανάπτυξη τους θα αναγνωριστούν ως μη εαυτά. Επομένως, τα εαυτά αντιγόνα δεν αποτελούν ανοσογόνα και δεν οδηγούν σε άνοση απόκριση, με εξαιρέσεις που οδηγούν σε αυτοανοσία. Επιπλέον, ένας ακόμη παράγοντας ανοσογονικότητας είναι το μέγεθος. Όσο πιο μεγάλο είναι ένα μόριο τόσο πιο ανοσογόνο, με τα πιο ενεργά ανοσογόνα να έχουν μοριακή μάζα πάνω από 100.000 daltons (Da). Ακόμη, σημαντικό ρόλο στην ανοσογονικότητα ενός αντιγόνου έχει και η χημική σύστασή του. Για παράδειγμα, τα ετεροπολυμερή τείνουν να είναι πιο ανοσογονικά από τα ομοπολυμερή. Τέλος, σημαντική είναι και η ευαισθησία του αντιγόνου στη διαδικασία της επεξεργασίας και της παρουσίασης. Τα μεγάλα μακρομόρια είναι πιο εύκολο να φαγοκυτταρωθούν και να παρουσιαστούν σε σχέση με μικρά μόρια και γι' αυτό είναι πιο ανοσογόνο.

Οι υποδοχείς των B και T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές του αντιγόνου που καλούνται αντιγονικοί καθοριστές ή επίτοποι. Τα λεμφοκύτταρα λοιπόν δεν αναγνωρίζουν ολόκληρα τα αντιγόνα, αλλά μόνο τις περιοχές των επιτόπων. Το ίδιο αντιγόνο μπορεί να έχει πολλούς διαφορετικούς επίτοπους. Επειδή τα B κύτταρα αναγνωρίζουν διαλυτά αντιγόνα, οι επίτοποι που συνδέονται στον B κυτταρικό υποδοχέα είναι εκτεθειμένοι στις επιφάνειες του αντιγόνου. Αντίστοιχα, τα T κύτταρα αναγνωρίζουν τμήματα του αντιγόνου που έχουν παρουσιαστεί από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τον T κυτταρικό υποδοχέα βρίσκονται στα τμήματα που παρουσιάζονται και η σύνδεση τους με τον υποδοχέα εξαρτάται από τα μόρια MHC.

### 1.3 Χυμική ανοσία

Σε αντίθεση με την κυτταρική ανοσία που περιλαμβάνει τη δράση αντιγονοειδικών Τ κυττάρων καθώς και άλλων κυττάρων που δεν είναι αντιγονοειδικά, όπως τα NK κύτταρα, η χυμική ανοσία στηρίζεται στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα. Επίσης, χυμική ανοσία μπορεί να προκληθεί όταν χορηγηθούν αντισώματα από τον ορό ενός ανοσοποιημένου ατόμου σε ένα μη ανοσοποιημένο άτομο.

Κατά τη χυμική ανοσία, μετά την αλληλεπίδρασή του με ένα αντιγόνο, το Β κύτταρο θα διαφοροποιηθεί σε πλασματοκύτταρο. Τα αντισώματα που παράγονται από τα πλασματοκύτταρα λειτουργούν ως το δραστικό στοιχείο της χυμικής ανοσίας. Όταν το αντίσωμα θα συνδεθεί στο αντιγόνο, το τελευταίο θα οδηγηθεί σε καταστροφή. Ο περιορισμός των αντιγόνων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, ένα αντιγόνο που θα καλυφθεί από αντισώματα μπορεί να οδηγηθεί σε φαγοκυττάρωση πιο εύκολα.<sup>1-2</sup>

#### 1.3.1 Β λεμφοκύτταρο

Τα Β λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών, σε αντίθεση με τα Τ λεμφοκύτταρα τα οποία επίσης παράγονται στο μυελό των οστών αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδέν. Μετά την ωρίμανσή τους, τα Β κύτταρα που εγκαταλείπουν το μυελό των οστών εκφράζουν στην επιφάνειά τους έναν μοναδικό υποδοχέα δέσμευσης αντιγόνου, τον Β κυτταρικό υποδοχέα (B cell Receptor, BcR). Ο υποδοχέας αυτός περιλαμβάνει ένα μεμβρανικό μόριο ανοσοσφαιρίνης, το οποίο μεσολαβεί στην αναγνώριση των αντιγόνων.

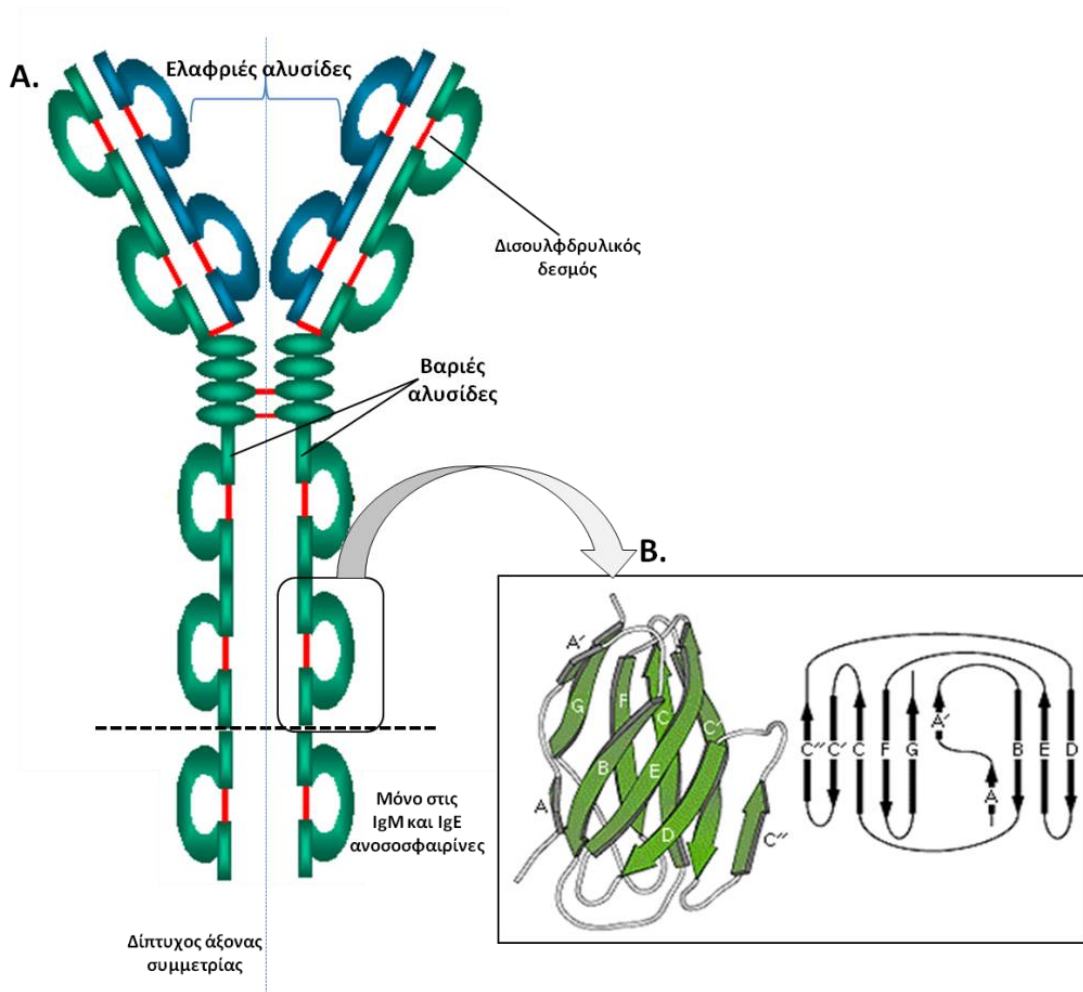
Όταν ένα παρθένο Β κύτταρο έρθει για πρώτη φορά σε επαφή με ένα αντιγόνο που αναγνωρίζει ο υποδοχέας του, θα πολλαπλασιαστεί και θα διαφοροποιηθεί σε πλασματοκύτταρα (plasma cells) και Β κύτταρα μνήμης (memory B cells). Τα Β κύτταρα μνήμης ζουν περισσότερο από τα παρθένα Β κύτταρα και εκφράζουν στην

επιφάνεια τους την ίδια μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη με το Β κύτταρο από το οποίο προήλθαν. Από την άλλη, τα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη αλλά παράγουν και εκκρίνουν τα αντισώματα. Σε μια δεύτερη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο, τα Β κύτταρα μνήμης αποκρίνονται πιο γρήγορα από τα παρθένα Β κύτταρα και παράγονται περισσότερα πλασματοκύτταρα αλλά και υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων.

### 1.3.2 Ο Β κυτταρικός υποδοχέας

Ο Β κυτταρικός υποδοχέας είναι ένα μεμβρανικό σύμπλοκο από δύο επικουρικές πρωτεΐνες και ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης. Οι ανοσοσφαιρίνες (Ig) είναι γλυκοπρωτεϊνικά μόρια και αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες μεταξύ τους, οι οποίες καλούνται υπομονάδες. Η πρώτη πολυπεπτιδική αλυσίδα βάρους 50 kDa ορίζεται ως βαριά ή αλυσίδα H, ενώ η δεύτερη βάρους 25 kDa ορίζεται ως ελαφριά ή αλυσίδα L.. Κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά με έναν δισουλφιδυδρυλικό δεσμό, ενώ δισουλφιδυδρυλικοί δεσμοί συνδέουν επίσης τις βαριές αλυσίδες μεταξύ τους. Έτσι τελικά δημιουργείται η βασική δομή της ανοσοσφαιρίνης, το διμερές (H-L)<sub>2</sub> (Εικόνα 3).<sup>5</sup>

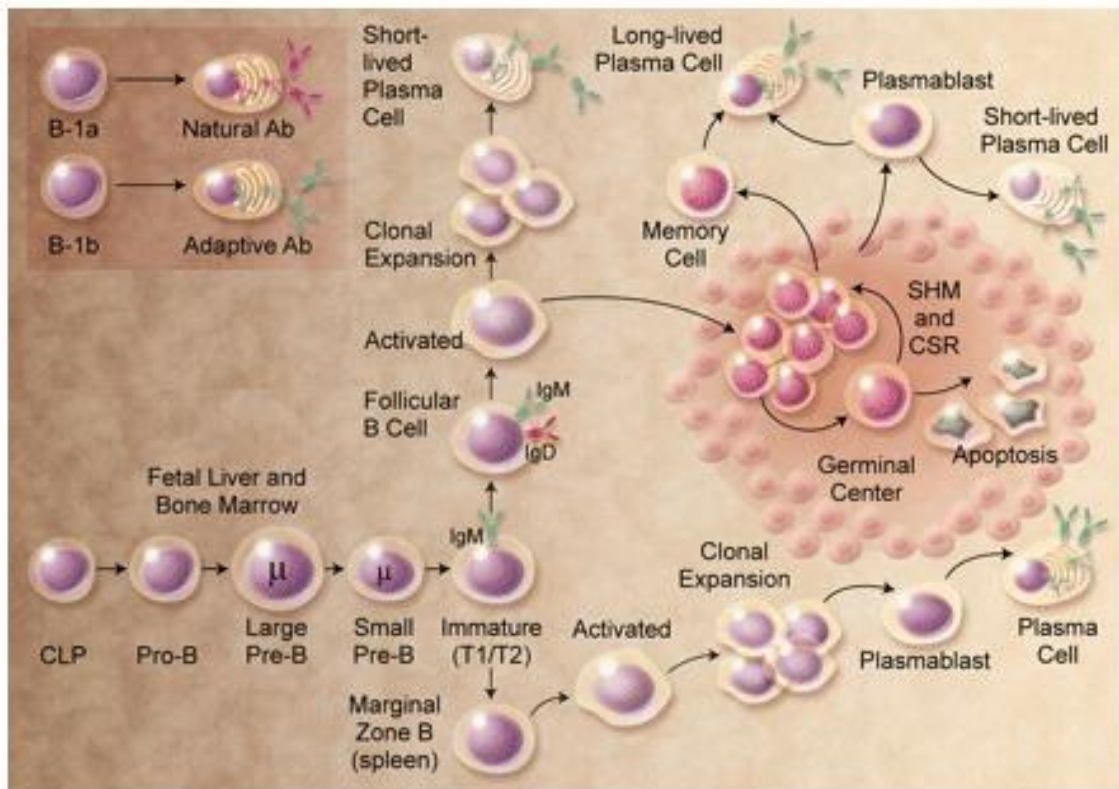
Κάθε βαριά και ελαφριά αλυσίδα περιέχει μια περιοχή υψηλής μεταβλητότητας προς το τέλος του αμινοτελικού άκρου. Η περιοχή αυτή αποτελείται από 100-110 αμινοξέα και ορίζεται ως μεταβλητή (V). Αντίθετα, οι υπόλοιπες περιοχές του αντισώματος εμφανίζουν λιγότερες διαφορές. Οι περιοχές αυτές καλούνται σταθερές (C). Αυτή η διάκριση σχετίζεται με τις δύο κύριες λειτουργίες των ανοσοσφαιρινών, δηλαδή την αναγνώριση και σύνδεση με το αντιγόνο, και έπειτα με την ενεργοποίηση των εκτελεστικών μηχανισμών για την έγκαιρη αντιμετώπισή του. Η εκτελεστική λειτουργία της ανοσοσφαιρίνης διεκπεραιώνεται από τη σταθερή περιοχή της και ο ισότυπος της εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης καθορίζει το είδος των εκτελεστικών μηχανισμών που θα ενεργοποιηθούν κάθε φορά.



**Εικόνα 3:** Α. Δομή του μορίου της αντισσφαιρίνης. Β. Πτυχή αντισσφαιρίνης (Τροποποιημένη από: Male et al.; Immunology; 7th Edition; Chapter 3).

## 1.4 Οντογένεση Β κυττάρων

Στον άνθρωπο τα Β λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο μυελό των οστών (bone marrow, BM) από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic stem cell, HSC). Η ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων διακρίνεται σε δύο φάσεις: (1) την ανεξάρτητη από το αντιγόνο που συμβαίνει στο μυελό των οστών και (2) την εξαρτώμενη από αντιγόνο που συμβαίνει στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (Εικόνα 4).<sup>1-2</sup>



**Εικόνα 3:** Ωρίμανση B λεμφοκυττάρων.

Ο ανασυνδυασμός της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας πραγματοποιείται στο μυελό των οστών. Τα παρθένα B κύτταρα απομακρύνονται από το μυελό των οστών και διέρχονται από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, έως ότου έρθουν σε επαφή με κάποιο αντιγόνο. Η επαφή αυτή οδηγεί σε παραγωγή πλασματοκυττάρων και κυττάρων μνήμης. (Προέλευση LeBien, TW et al.; Blood. 2008 Sep 1;112(5):1570-80).

Στο μυελό των οστών πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Τα ανώριμα B κύτταρα που εκφράζουν μεμβρανική IgM, εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος όπου αναπτύσσονται σε ώριμα B κύτταρα, τα οποία εκφράζουν IgM αλλά και IgD. Στη συνέχεια, τα παρθένα αυτά B κύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα και στη λέμφο και μεταφέρονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Εάν το B κύτταρο έρθει σε επαφή με κάποιο αντιγόνο θα πολλαπλασιαστεί και θα διαφοροποιηθεί σε πλασματοκύτταρα και σε κύτταρα μνήμης.

### 1.4.1 Αντιγονο-ανεξάρτητη φάση ανάπτυξης

Σε αυτό το στάδιο συμβαίνει η διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSC) προς B λεμφοκύτταρα. Διαδραματίζεται στο μυελό των οστών και σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία παίζουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα αιμοποιητικά κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τα στρωματικά κύτταρα, με τα τελευταία να παρέχουν τα απαραίτητα σήματα (π.χ. κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες) για την ανάπτυξη και ωρίμανση των HSC. Η φάση αυτή διαρκεί περίπου πέντε ημέρες με τελικό προϊόν ένα ώριμο 'παρθένο' B λεμφοκύτταρο (virgin B cell) με μοναδική ανοσοσφαιρίνη επιφανείας IgM.<sup>6</sup>

Στον άνθρωπο, τα B κύτταρα είναι διπλοειδή κύτταρα και επομένως φέρουν δύο αλληλόμορφα για την βαριά αλυσίδα (IGH) και τέσσερα αλληλόμορφα για την ελαφριά αλυσίδα (IGK/IGL). Παρά το γεγονός αυτό, το B κύτταρο εκφράζει τα αναδιαταγμένα γονίδια μόνο από το ένα χρωμόσωμα. Το φαινόμενο αυτό καλείται αποκλεισμός αλληλομόρφου (allelic exclusion). Σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό, όταν συμβούν παραγωγικές αναδιατάξεις και εκφραστεί η ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνεια του B κυττάρου, σταματούν οι περαιτέρω γονιδιακές αναδιατάξεις. Ο αποκλεισμός αλληλομόρφου ρυθμίζεται στο επίπεδο του ανασυνδυασμού VDJ.<sup>1</sup>

Τα βασικά στάδια της διαφοροποίησης των B κυττάρων στο μυελό των οστών περιλαμβάνουν το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, το πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο και έπειτα το προγονικό B κύτταρο (pro-B cells), το πρόδρομο B κύτταρο (προ-B κύτταρο, pre-B cell) και το ανώριμο B κύτταρο.<sup>8</sup>

Τα διάφορα στάδια κατά την ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζονται από την έκφραση συγκεκριμένων μεμβρανικών μορίων αλλά και από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Οι αναδιατάξεις συμβαίνουν με συγκεκριμένη σειρά. Η πρώτη αναδιάταξη συμβαίνει μεταξύ των γονιδίων D και J της βαριάς αλυσίδας (Heavy chain, H). Στο στάδιο αυτό το κύτταρο καλείται πρώιμο προ-προ B κύτταρο (early pro-B). Στην συνέχεια και στο στάδιο του όψιμου προ-προ B κυττάρου (late pro-B), ακολουθεί η σύνδεση ενός γονιδίου V με τα αναδιαταγμένα γονίδια DJ. Όταν

ολοκληρωθούν οι αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας, τα κύτταρα περνούν στο στάδιο του προ-B κυττάρου (pre-B cell). Τα κύτταρα στο στάδιο του προ-προ B κυττάρου εκφράζουν στην επιφάνεια τους το ετεροδιμερές Igα/Igβ, το οποίο είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό του B κυτταρικού υποδοχέα. Επίσης στο στάδιο αυτό εκφράζεται και ο υποδοχέας c-Kit, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση με τα στρωματικά κύτταρα. Ωστόσο στο επόμενο στάδιο, δηλαδή σε αυτό του προ-B κυττάρου, παύει να εκφράζεται ο c-Kit και αρχίζει να εκφράζεται ο προ-BCR. Ο προ-BCR αποτελείται από την αναδιαταγμένη βαριά αλυσίδα  $\mu$  και μια υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain), ένα σύμπλοκο των πρωτεϊνών Vπρο-B και της  $\lambda 5$ , μαζί με τους συνυποδοχείς Igα και Igβ. Η υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα βοηθά στο σωστό δίπλωμα της βαριάς αλυσίδας  $\mu$ .

Μόνο τα B κύτταρα που εκφράζουν τον προ-BCR θα συνεχίσουν την ωρίμανση τους. Η έκφραση του προ-B υποδοχέα προκαλεί την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-xL. Τα κύτταρα που αποτυγχάνουν να δημιουργήσουν σύμπλοκο βαριάς αλυσίδας/υποκατάστατης ελαφριάς αλυσίδας δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη bcl-xL και πεθαίνουν με απόπτωση, εκτός αν διασωθούν με λειτουργικό δευτερογενή ανασυνδυασμό και διόρθωση υποδοχέα (receptor editing).<sup>7</sup>

Στο αμέσως επόμενο στάδιο, παράγονται και πάλι οι πρωτεΐνες RAG1 και RAG2, που απαιτούνται για τον ανασυνδυασμό των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας (Light chain, L). Κατά κανόνα, προηγείται ο ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου IGK. Σε περίπτωση μη παραγωγικής αναδιάταξης, το κύτταρο προχωρεί στον ανασυνδυασμό των γονιδίων της  $\lambda$  ελαφριάς αλυσίδας. Τελικά τα κύτταρα περνούν στο στάδιο του ανώριμου B κυττάρου, όπου εκφράζουν την επιφανειακή IgM μαζί με τους συνυποδοχείς Igα και Igβ, σχηματίζοντας τον B κυτταρικό υποδοχέα (BCR). Το βήμα αυτό αποτελεί και το τελευταίο που συμβαίνει κατά την ωρίμανση στον μυελό των οστών.<sup>8-9</sup>

Επειδή τα περισσότερα από τα ανώριμα B κύτταρα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα, δηλαδή συστατικά του ίδιου του οργανισμού, χρειάζεται να υπάρχει έλεγχος πριν την έξοδο των κυττάρων από τον μυελό των οστών ώστε να επιτευχθεί αυτοανοχή (self-

tolerance). Υπάρχουν 3 μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται αυτός ο έλεγχος:

- Εξάλειψη κλώνων (clonal deletion): τα ανώριμα B κύτταρα που αναγνωρίζουν κάποιο αυτοαντιγόνο που υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση στον μυελό των οστών, θα οδηγηθούν σε απόπτωση.
- Διόρθωση υποδοχέα (receptor editing): στα B κύτταρα που αναγνωρίζουν ένα αυτοαντιγόνο θα ενεργοποιηθεί η έκφραση των RAG1 και RAG2 έτσι ώστε να συμβούν περαιτέρω ανασυνδυασμοί των γενετικών τόπων IGK ή IGL. Ως αποτέλεσμα θα αντικατασταθεί η ελαφριά αλυσίδα και θα δημιουργηθεί ένας νέος BcR που δεν θα αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα.<sup>10-11</sup>
- Ανέργια (anergy): ανώριμα B κύτταρα που αναγνωρίζουν με χαμηλή συγγένεια αυτοαντιγόνα θα γίνουν ανεργικά, δηλαδή ανίκανα να ανταποκριθούν στα διάφορα σήματα. Τα ανεργικά B λεμφοκύτταρα χάνουν την επιφανειακή IgM (διατηρούν την IgM στο κυτταρόπλασμα), ενώ εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgD στην επιφάνειά τους.

Τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα που έχουν ελεγχθεί για αυτοανοχή είναι έτοιμα πλέον να εγκαταλείψουν το μυελό των οστών για να ωριμάσουν τελικά. Το ώριμο B λεμφοκύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του IgM και IgD καθώς επίσης και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης. Μόνο το 10% των B κυττάρων ωριμάζουν και εξέρχονται από τον μυελό των οστών.

#### **1.4.2 Αντιγόνο-εξαρτώμενη φάση ανάπτυξης**

Μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης, τα B κύτταρα εξέρχονται από το μυελό των οστών, κυκλοφορούν στο αίμα και τη λέμφο και μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα περιλαμβάνουν το σπλήνα, τους λεμφαδένες, το λεμφικό ιστό που σχετίζεται με τους βλεννογόνους (αμυγδαλές και πλάκες του Peyer στο έντερο) και το διάχυτο λεμφικό ιστό στο σώμα. Εκεί, τα B

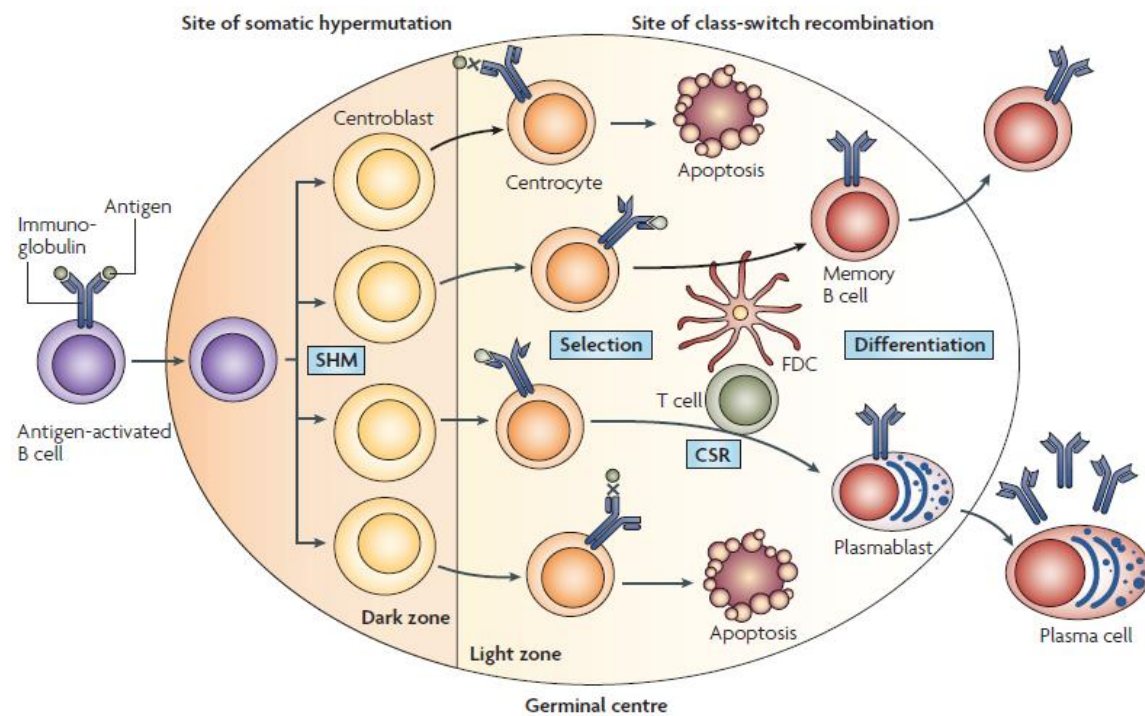


λεμφοκύτταρα περνούν στη δεύτερη φάση διαφοροποίησης που χαρακτηρίζεται ως εξαρτώμενη από το αντιγόνο.

Εάν τα Β λεμφοκύτταρα δεν έρθουν σε επαφή με αντιγόνο τότε περνούν και πάλι στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των απαγωγών λεμφαγγείων. Εάν όμως τα Β λεμφοκύτταρα έρθουν σε επαφή με ένα διαλυτό πρωτεϊνικό αντιγόνο ή με κάποιο ενεργοποιημένο  $T_H$ , τότε ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται στις περιοχές των Τ κυττάρων, όπου είναι εφικτή η αλληλεπίδραση μεταξύ Τ, Β και δενδριτικών κυττάρων. Στη συνέχεια, κάποια από τα διεγερμένα κύτταρα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου μετά από 7-10 ημέρες δημιουργούν το βλαστικό κέντρο (germinal center).<sup>12</sup>

### 1.4.3 Βλαστικά κέντρα

Το βλαστικό κέντρο είναι ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον που ευνοεί τον γρήγορο πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Το βλαστικό κέντρο (Πρόέλευση: Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 22–33.)

Τα βλαστικά κέντρα δημιουργούνται μέσα σε 7-10 ημέρες από την πρώτη έκθεση σε ένα αντιγόνο. Έχουν μια σκοτεινή ζώνη, η οποία περιέχει τα Β κύτταρα που υφίστανται γρήγορη διαφοροποίηση και μια φωτεινή ζώνη, η οποία συμπεριλαμβάνει τα Β κύτταρα μαζί με δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (Follicular Dendritic Cells, FDCs), μακροφάγα και Τ βοηθητικά κύτταρα (T helper, T<sub>H</sub>).

Κανονικά, όταν τα ώριμα Β κύτταρα διεγερθούν από αντιγόνο θα μεταναστεύσουν στα βλαστικά κέντρα, θα διαφοροποιηθούν σε κεντροβλάστες και θα σχηματίσουν τη σκοτεινή ζώνη, που βρίσκεται προς την πλευρά της περιοχής των Τ κυττάρων. Οι κεντροβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Μέσα στη σκοτεινή ζώνη υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίρεση και σωματική υπερμετάλλαξη των αναδιαταγμένων μεταβλητών (V, Variable) περιοχών των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στις περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (CDR, complementarity determining regions), οι οποίες αποτελούν μικρά πολυπεπτιδικά τμήματα των αλληλουχιών των μεταβλητών περιοχών της ελαφριάς (VL) και της βαριάς αλυσίδας (VH), όπου είναι πιθανότερο να επηρεάσουν τη συνολική συγγένεια με το αντιγόνο. Στη συνέχεια, όταν σταματήσει η διαίρεση των κεντροβλαστών, αυτοί μεταναστεύουν στον αντίθετο πόλο του βλαστικού κέντρου, στο τμήμα που καλείται φωτεινή ζώνη και αυξάνουν την έκφραση της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Σε αυτό το στάδιο χαρακτηρίζονται ως κεντροκύτταρα. Στη φωτεινή ζώνη έρχονται σε επαφή με τα δενδριτικά κύτταρα και τα T<sub>H</sub> κύτταρα. Τα κύτταρα που εκφράζουν μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες υψηλής συγγένειας θα επιλεγούν και μετά από ένα δεύτερο μήνυμα επιβίωσης που δέχονται από τα T<sub>H</sub>, θα διαφοροποιηθούν είτε σε Β κύτταρα μνήμης είτε σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα.

Τα πλασματοκύτταρα είναι κύτταρα τα οποία δε διαιρούνται. Ζουν περίπου τέσσερις εβδομάδες στο μυελό των οστών ή στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων και εκφράζουν χαμηλά ή ανύπαρκτα επίπεδα επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Το κυτταρόπλασμά τους είναι πλούσιο σε ανοσοσφαιρίνες και έχουν την ιδιότητα να εκκρίνουν τα αντισώματα. Από την άλλη, τα κύτταρα μνήμης είναι μακρόβια κύτταρα σε ηρεμία που δεν παράγουν αντισώματα. Εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο. Τα κύτταρα αυτά, σε επόμενη επαφή με το ίδιο

αντιγόνο, μπορεί να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να εκδηλώσουν ταχύτερη και εντονότερη δευτερογενή άνοση απάντηση.

Στα βλαστικά κέντρα συμβαίνουν τρεις σημαντικές διεργασίες που αφορούν στη διαφοροποίηση των Β κυττάρων (Εικόνα 5): σωματική υπερμεταξίγνεση, ωρίμανση συγγένειας και εναλλαγή ισοτύπου.<sup>13-14</sup>

i. Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Με τη διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (SYM, somatic hypermutation-SHM) τα αναδιαταγμένα γονίδια της μεταβλητής περιοχής (V, Variable) αποκτούν μεγαλύτερη ετερογένεια. Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση συμβαίνει όταν η ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας του Β λεμφοκυττάρου δεσμεύσει ένα αντιγόνο. Η εισαγωγή μεταλλάξεων συμβαίνει τόσο σε λειτουργικές όσο και σε μη λειτουργικές αναδιατάξεις. Στις μη λειτουργικές αναδιατάξεις οι μεταλλάξεις κατανέμονται με τυχαίο τρόπο, ενώ στις λειτουργικές αναδιατάξεις οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στις τρεις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDR) των αλληλουχιών των μεταβλητών περιοχών των γονιδίων της ελαφριάς (VL) και της βαριάς αλυσίδας (VH). Η ΣΥΜ αποτελεί επίσης προϋπόθεση για την παραγωγή ανοσοσφαιρινών με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο. Η διαδικασία περιλαμβάνει την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε πολύ μεγάλο ποσοστό ( $1/10^3$  ανά κυτταρική γενιά).

Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση συμβαίνει στη σκοτεινή ζώνη κατά τον πολλαπλασιασμό των κεντροβλαστών. Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν κατά προτίμηση σε συγκεκριμένα κωδικόνια και τα σημεία αυτά αναφέρονται ως 'επίκεντρα' (hotspots). Επίσης, υπάρχει προτίμηση για μεταπτώσεις (transitions) έναντι των μεταστροφών (transversions). Επιπλέον, ο μηχανισμός της ΣΥΜ φαίνεται ότι στοχεύει επιλεκτικά νουκλεοτίδια G και C έναντι των A και T, αλλά και πουρίνες έναντι των πυριμιδινών. Η ΣΥΜ σχετίζεται με κοπή της αλυσίδας του DNA και απαιτείται η ενεργοποίηση του ενζύμου δεαμινάση της κυτιδίνης (AID: activation-induced deaminase), το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία.<sup>14-15</sup>

Από τη διαδικασία αυτή μπορεί να προκύψουν ανοσοσφαιρίνες με μεγαλύτερη ή μικρότερη συγγένεια για το αντιγόνο. Ωστόσο μέσω της διαδικασίας της επιλογής που συμβαίνει στην φωτεινή ζώνη επιλέγονται τα Β κύτταρα με τις ανοσοσφαιρίνες υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο.<sup>16</sup>

#### ii. Ωρίμανση συγγένειας

Η ωρίμανση συγγένειας συμβαίνει στη φωτεινή ζώνη, στα μη διαιρούμενα κεντροκύτταρα. Τα κεντροκύτταρα προκειμένου να επιβιώσουν έρχονται σε επαφή με τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων και τα T<sub>H</sub> κύτταρα που βρίσκονται στη φωτεινή ζώνη. Τα πρώτα δεσμεύουν στην επιφάνεια τους συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος. Τα κεντροκύτταρα ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την δέσμευση στο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, με τα κεντροκύτταρα που έχουν τις ανοσοσφαιρίνες υψηλής συγγένειας να πλεονεκτούν και να λαμβάνουν μήνυμα σημαντικό για την επιβίωση τους. Αντίθετα, τα κύτταρα που δεν καταφέρνουν να συνδεθούν με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος πεθαίνουν με απόπτωση.<sup>15</sup>

#### iii. Εναλλαγή ισοτύπου

Οι ισοτύποι των ανοσοσφαιρινών διακρίνονται από την δομή των σταθερών περιοχών των βαριών αλυσίδων. Τα αντισώματα μέσω των μεταβλητών περιοχών των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων τους καθορίζουν την ειδική δέσμευση με το αντιγόνο, ενώ μέσω του ισοτύπου της σταθερής περιοχής της βαριάς αλυσίδας καθορίζεται η συμμετοχή τους σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες.

Κατά την εναλλαγή ισοτύπου (Class Switch Recombination, CSR), η σταθερή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης IgM (C<sub>μ</sub>) αντικαθίσταται από τη σταθερή περιοχή άλλου ισοτύπου (C<sub>γ</sub>, C<sub>ε</sub> ή C<sub>α</sub>) με αποτέλεσμα την παραγωγή δευτερογενών ισοτύπων (IgG, IgE και IgA). Έτσι, η ειδικότητα του αντισώματος παραμένει ίδια, ενώ αλλάζει η βιολογική του δράση. Πρόκειται για μια μη αντιστρεπτή διαδικασία η οποία απαιτεί την δράση του ενζύμου AID. Πραγματοποιείται στην φωτεινή ζώνη των βλαστικών

κέντρων, όπου τα κεντροκύτταρα έρχονται σε επαφή με τα T<sub>H</sub> κύτταρα της περιοχής. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την επαγωγή της εναλλαγής ισotyπou. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στην διαδικασία έχουν και οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα T<sub>H</sub> κύτταρα.<sup>15-16</sup>

## 1.5 Πληθυσμοί B λεμφοκυττάρων

Τα B λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: θυλακιοειδή B-λεμφοκύτταρα (follicular, FO), B λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (MZ cells) (marginal-zone cells) και B-1 κύτταρα.

### i. Θυλακιοειδή B-λεμφοκύτταρα:

Πρόκειται για κύτταρα που συμμετέχουν στις θυμο-εξαρτώμενες άνοσες απαντήσεις (TD). Είναι βραχύβια, εντοπίζονται στα πρωτογενή θυλάκια και μεταφέρονται μέσω του αίματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και έπειτα πίσω στο μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να ενεργοποιηθούν και να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα. Επιπλέον, μεταναστεύουν στο βλαστικό κέντρο όπου υπόκεινται σε σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και εναλλαγή ισotyπou, έτσι ώστε είτε να παράγουν αντισώματα υψηλής συγγένειας είτε να διαφοροποιηθούν σε B κύτταρα μνήμης που θα ενεργοποιηθούν σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο.<sup>8, 17</sup>

### ii. MZ B λεμφοκύτταρα:

Τα B κύτταρα της οριακής ζώνης εντοπίζονται στην οριακή ζώνη (κυρίως του σπλήνα) και έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης. Θεωρούνται κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και συμμετέχουν στις θυμο-ανεξάρτητες άνοσες απαντήσεις (TI). Επίσης μπορούν να ενεργοποιηθούν από θυμο-εξαρτώμενα αντιγόνα και να δεχθούν βοήθεια από τα T κύτταρα. Η ανοσία που παρέχεται από αυτά τα κύτταρα αποτελεί

το συνδετικό κρίκο μεταξύ της έμφυτης και της προσαρμοστικής άνοσης απάντησης. Η άνοση απάντηση από τα MZ και B1 λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζεται από αμεσότητα, αφού συμμετέχουν στις θυμο-ανεξάρτητες άνοσες απαντήσεις και δεν εμπλέκεται ενεργοποίηση βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, χαμηλή συγγένεια αναγνώρισης και πολύ-αντιδραστικότητα, καθώς αναγνωρίζονται διαφορετικά παθογόνα μέσω συντηρημένων μοτίβων.<sup>17-18</sup>

### iii. B-1 B λεμφοκύτταρα:

Τα B-1 B λεμφοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα κατά την εμβρυική ζωή και αποτελούν το 5% του συνόλου των B-κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι μακρόβια και διαθέτουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και μπορούν να παράγουν παρθένα B1 κύτταρα. Τα B-1 B λεμφοκύτταρα υποδιαιρούνται στους υποπληθυσμούς B-1a και B-1b. Εντοπίζονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα και τον υπεζωκότα και έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο. Τα B1a έχουν φαινότυπο  $IgD^{high}IgM^{low}/CD23^{-}CD43^{+}CD45^{low}CD5^{+}$ , ενώ τα B1b κύτταρα έχουν φαινότυπο  $IgD^{high}IgM^{low}/CD23^{-}CD43^{+}CD45^{low}CD5^{-}$ . Τα B-1 κύτταρα εμπλέκονται στις θυμο-ανεξάρτητες αντιδράσεις μέσω έκκρισης IgM αντισωμάτων έναντι βακτηριακών συστατικών, όπως είναι η φωσφορυλοχολίνη.<sup>8, 17-18</sup>

## 1.6 Πρωτογενή και Δευτερογενή λεμφικά όργανα

Τα λεμφικά όργανα διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Στα πρωτογενή (ή κεντρικά) ανήκουν ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας, ενώ στα δευτερογενή (ή περιφερικά) οι λεμφαδένες, οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων και ο σπλήνας. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα πραγματοποιείται η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Μετά την ωρίμανση τους τα κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και στο στάδιο αυτό είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με κάποιο αντιγόνο. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα παρέχουν το περιβάλλον όπου συμβαίνουν οι αντιδράσεις μεταξύ των λεμφοκυττάρων και των αντιγόνων.

### 1.6.1 Πρωτογενή λεμφικά όργανα

i. Θύμος αδένας:

Πρόκειται για ένα δίλοβο όργανο με επίπεδο σχήμα που βρίσκεται στο πρόσθιο μεσοθωράκιο. Είναι σχετικά μεγάλος κατά τη γέννηση και αποκτά το μέγιστο μέγεθος του κατά την ήβη, ενώ στην συνέχεια ατροφεί και αντικαθίσταται από λίπος. Κάθε λοβός περιβάλλεται εξωτερικά από κάψα. Οι λοβοί διαιρούνται περαιτέρω σε λοβία και ανάμεσά τους μεσολαβεί συνδετικός ιστός. Τα λοβία αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες του αδένα. Κάθε λοβίο έχει ένα εξωτερικό διαμέρισμα, τον φλοιό, που περιέχει πληθυσμούς ανώριμων T κυττάρων, και ένα εσωτερικό διαμέρισμα, τον μυελό, που περιέχει λίγα θυμοκύτταρα. Στον θύμο αδένα λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη και η ωρίμανση των T κυττάρων.<sup>1-2</sup>

ii. Μυελός των οστών:

Ο μυελός των οστών εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στους σπονδύλους, στα πλατιά οστά του κρανίου, στα λαγόνια όπως επίσης στις πλευρές και τις επιφύσεις των μακρών οστών. Στον μυελό των οστών πραγματοποιείται η αιμοποίηση και η αποθήκευση λίπους. Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Τα HSC έχουν την δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και μπορούν να ακολουθήσουν δυο διαφορετικά μονοπάτια. Είτε να διαφοροποιηθούν προς ένα κοινό λεμφοειδή προγονικό κύτταρο (Common Lymphoid Progenitor, CLP), είτε να διαφοροποιηθούν προς ένα κοινό μυελικό προγονικό κύτταρο (Common Myeloid Progenitor, CMP). Όλα τα λεμφοειδή κύτταρα προέρχονται από τα CLPs ενώ όλα τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς προέρχονται από τα CMP. Στη συνέχεια, από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του CLP προκύπτει το μοναδικό προγονικό κύτταρο της B λεμφικής σειράς (B Lymphoid Stem Cell, BLSC) από το οποίο τελικά παράγονται ώριμα B λεμφοκύτταρα. Τα B λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών, σε αντίθεση με τα T λεμφοκύτταρα τα οποία παράγονται στον μυελό των οστών αλλά ωριμάζουν στον θύμο αδένα.<sup>1-2</sup>

## 1.6.2 Δευτερογενή λεμφικά όργανα

### i. Λεμφαδένες και λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων

Οι λεμφαδένες αποτελούνται από ένα δίκτυο αγγείων (λεμφαγγεία) το οποίο συλλέγει το εξωκυττάριο υγρό (λέμφος) από τους ιστούς και το επαναφέρει στην κυκλοφορία. Αποτελούν τις θέσεις όπου εκδηλώνονται ανοσοαποκρίσεις εναντίον των αντιγόνων της λέμφου. Οι λεμφαδένες διαιρούνται σε τρεις περιοχές. Η εξωτερική στιβάδα ή φλοιός περιέχει παρθένα Β λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Ο παραφλοιός, που βρίσκεται κάτω από τον φλοιό, περιέχει κυρίως Τ λεμφοκύτταρα, ενώ ο μυελός που αποτελεί την εξωτερική στιβάδα περιέχει κυρίως πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα. Καθώς η λέμφος διηθείται μέσω των λεμφαδένων, ένα αντιγόνο που βρίσκεται σε αυτήν θα παγιδευτεί και έπειτα από επεξεργασία θα παρουσιαστεί από τα δενδριτικά κύτταρα μαζί με ΜHC II. Έτσι, θα ενεργοποιηθούν τα  $T_H$  κύτταρα και θα επακολουθήσει η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων στον πλούσιο με  $T_H$  κύτταρα παραφλοιό.

Οι βλεννογόνοι επενδύουν τις εσωτερικές περιοχές του πεπτικού, του αναπνευστικού και του ουρογεννητικού σωλήνα. Οι επιφάνειες αφού αποτελούν πύλη εισόδου για πολλά παθογόνα, προστατεύονται από τον λεμφικό ιστό που σχετίζεται με τους βλεννογόνους (Mucosa associated lymphoid tissue-MALT). Στους ιστούς MALT περιλαμβάνονται οι αμυγδαλές, οι αδenoειδείς εκβλαστήσεις, η σκωληκοειδή απόφυση και οι πλάκες του Peyer. Οι MALT περιέχουν πληθυσμούς πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν αντισώματα.<sup>1-2</sup>

### ii. Σπλήνας

Ο σπλήνας είναι ένα ευμέγεθες λεμφικό όργανο με ωοειδές σχήμα, που εντοπίζεται στην αριστερή πλευρά της κοιλιακή χώρας και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση εναντίον αντιγόνων που βρίσκονται στο αίμα, ενώ επίσης συλλέγει και καταστρέφει γερασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα αντιγόνα που βρίσκονται στο αίμα αλλά και τα λεμφοκύτταρα μεταφέρονται στο σπλήνα μέσω της σπληνικής αρτηρίας. Το μεγαλύτερο μέρος του σπλήνα αποτελείται από τον ερυθρό



πολφό, που είναι η περιοχή καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Ο ερυθρός πολφός περιέχει μακροφάγα, πολλά ερυθροκύτταρα και λίγα λεμφοκύτταρα. Οι συναθροίσεις των λεμφοκυττάρων αποτελούν το λευκό πολφό του σπλήνα που περιβάλλει τα αρτηρίδια του οργάνου, σχηματίζοντας ένα περιαρτηριακό λεμφικό κάλυμμα (Periarteriolar Lymphoid Sheath, PALS). Η οριακή ζώνη του σπλήνα, που βρίσκεται περιφερικά των περιοχών PALS περιέχει λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.<sup>1-2</sup>

## 1.7 Αιματολογικές κακοήθειες

Οι αιματολογικές κακοήθειες είναι μια ομάδα νοσημάτων του αιμοποιητικού ιστού και αποτελούν περίπου το 10% του συνόλου των καρκίνων. Στις αιματολογικές κακοήθειες ανήκουν τα λεμφώματα και οι λευχαιμίες. Οι λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από τον πολλαπλασιασμό κυτταρικών πληθυσμών στο αίμα και τη λέμφο. Στις λευχαιμίες υπάρχει ανεξέλεγκτη παραγωγή λευχαιμικών κυττάρων τα οποία εμποδίζουν την παραγωγή των φυσιολογικών στοιχείων του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια) με αποτέλεσμα την αναστολή των φυσιολογικών λειτουργιών. Οι λευχαιμίες διακρίνονται σε λεμφικές και μυελικές, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που επηρεάζουν. Παράλληλα διαχωρίζονται σε οξείες και χρόνιες ανάλογα με την κλινική πρόοδο της νόσου. Οι οξείες λευχαιμίες εξελίσσονται πολύ γρήγορα και προέρχονται από λιγότερο διαφοροποιημένα ή ανώριμα κύτταρα. Αντίθετα, οι χρόνιες λευχαιμίες είναι λιγότερο επιθετικές και εξελίσσονται αργά, ενώ προέρχονται από ώριμα λεμφοκύτταρα. Οι πιο κοινές λευχαιμίες είναι :

- Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ ή CLL)
- Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ ή CML)
- Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ ή ALL)
- Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ ή AML)

Τα λεμφώματα αποτελούν κακοήθη νοσήματα του λεμφικού ιστού και αντιπροσωπεύουν παγκοσμίως πάνω από το 3% των περιπτώσεων νεοπλασιών. Πολλαπλασιάζονται ως συμπαγείς όγκοι μέσα σε λεμφικούς ιστούς, όπως ο μυελός των οστών, οι λεμφαδένες και ο θύμος αδένας. Διακρίνονται σε λεμφώματα Hodgkin (Hodgkin Lymphoma, HL) και μη Hodgkin (non-Hodgkin Lymphomas, NHL), με τα λεμφώματα NHL διακρίνονται περαιτέρω με βάση το κύτταρο προέλευσης σε Β- και Τ-λεμφώματα.<sup>17</sup>

Επιπλέον, στις αιματολογικές κακοήθειες περιλαμβάνονται τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και το πολλαπλούν μύελωμα. Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι κλωνικές διαταραχές του αιμοποιητικού προγονικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση. Το πολλαπλούν μύελωμα αποτελεί νεοπλασματική νόσο των πλασματοκυττάρων, όπου τα πλασματοκύτταρα έχουν διαφύγει από τον έλεγχο του χρόνου ζωής τους και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.

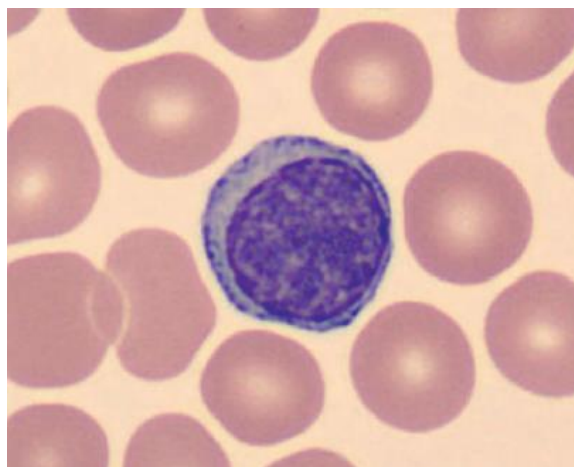
1-2στη σελίδα 3

## 1.8 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακοήθεια Β λεμφοκυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνεια τους CD5, CD19, CD23 και χαμηλά επίπεδα CD20. Χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση μικρών ώριμων λεμφοκυττάρων στο αίμα, το μυελό των οστών, τους λεμφαδένες και το σπλήνα, με αποτέλεσμα λεμφοκυττάρωση, διήθηση του μυελού των οστών, λεμφαδενοπάθεια και σπληνομεγαλία. Τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, είναι μικρά, με στρογγυλό πυρήνα, πυκνή χρωματίνη και λιγοστό κυτταρόπλασμα (Εικόνα 6).<sup>19</sup>

Η ΧΛΛ είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 72 έτη, αλλά για το 11% των ασθενών η διάγνωση πραγματοποιείται πριν την ηλικία των 55 ετών. Εμφανίζεται με σχεδόν διπλάσια συχνότητα (1,7:1) στους άντρες από ότι στις γυναίκες. Πρόκειται για μια ασθένεια που εμφανίζει μεγάλη κλινική ετερογένεια με τους περισσότερους ασθενείς να είναι

ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση. Λίγοι ασθενείς χρειάζονται θεραπεία αμέσως μετά την διάγνωση ενώ άλλοι δε χρειάζονται θεραπεία για πολλά χρόνια.<sup>20-22</sup>



**Εικόνα 6:** ΧΛΛ Β λεμφοκύτταρο

(Προέλευση: Kipps T, Stevenson F, Wu C, Croce C, Packham G, Wierda W, O'Brien S, Gribben J, Rai K. (2017). *Chronic lymphocytic leukaemia*)

Λόγω της μεγάλης αυτής κλινικής ετερογένειας που εμφανίζει η ΧΛΛ, ήταν απαραίτητο να βρεθούν κάποιοι προγνωστικοί δείκτες έτσι ώστε να είναι εφικτή η διαχείριση και η αντιμετώπιση της νόσου. Οι προγνωστικοί δείκτες βοήθησαν στον διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδες με καλή ή κακή πρόγνωση γεγονός που βοήθησε στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση. Ανάμεσα σε αυτούς τους δείκτες για την πρόβλεψη της κλινικής πορείας της ασθένειας ανήκουν το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, γενετικοί δείκτες αλλά και κάποιοι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες όπως οι CD38 και ZAP-70.<sup>20-25</sup>

Η ΧΛΛ υποδιαιρείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin heavy-chain variable region - IGHV). Το στάδιο της φυσιολογικής διαφοροποίησης στα βλαστικά κέντρα από το οποίο περνούν τα κύτταρα, καθορίζει για το αν θα έχουν μεταλλαγμένη ή μη μεταλλαγμένη IGHV. Οι

μεταλλάξεις των μεταβλητών περιοχών συμβαίνουν στη σκοτεινή ζώνη κατά την διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης.<sup>19</sup>

Επομένως, εάν τα ΧΛΛ κύτταρα εκφράζουν μη μεταλλαγμένη IGHV προέρχονται από κύτταρα τα οποία δεν έχουν διαφοροποιηθεί στα βλαστικά κέντρα, σε αντίθεση με τα κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη να έχουν περάσει από αυτό το στάδιο διαφοροποίησης. Οι ασθενείς με κύτταρα που εκφράζουν μη μεταλλαγμένη IGHV εμφανίζουν πιο επιθετική νόσο σε σχέση με τους ασθενείς που εκφράζουν μεταλλαγμένη IGHV.<sup>20-25</sup>

## 1.9 Διάγνωση

Οι περισσότεροι ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση και η ασθένεια εντοπίζεται σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο, όπου ανιχνεύεται στο αίμα μονοκλωνικός λεμφοκυτταρικός πληθυσμός (>5000 B-λεμφοκύτταρα/μL).<sup>27</sup>Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν στην επιφάνεια τους δείκτες όπως οι CD5, CD19, CD20, CD23, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του CD79b και της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας είναι χαρακτηριστικά χαμηλά σε σχέση με τα φυσιολογικά B κύτταρα.

Ωστόσο ορισμένοι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα που σχετίζονται με την ασθένεια, π.χ. κόπωση, ακούσια απώλεια βάρους, πυρετός, υπερβολική νυχτερινή εφίδρωση και αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων. Επίσης, ορισμένοι μπορεί να έχουν ή να αναπτύξουν διογκωμένους λεμφαδένες, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία.<sup>20</sup>

## 1.10 Πρόγνωση

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παραμένει ανίατη ασθένεια. Χαρακτηριστικό της είναι ότι η κλινική πορεία των ασθενών ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Υπάρχουν ασθενείς που επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και τελικά πεθαίνουν

από άλλα αίτια, ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο με μικρή επιβίωση παρά τη θεραπεία. Λόγω της μεγάλης κλινικής ετερογένειας και για να είναι εφικτή η διαχείριση της νόσου χρειάστηκε να αναζητηθούν κάποιοι προγνωστικοί παράγοντες.

Αρχικά αναπτύχθηκαν δυο κύρια κλινικά συστήματα σταδιοποίησης, κατά Rai και κατά Binet. Το σύστημα Rai χρησιμοποιείται περισσότερο στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ το σύστημα Binet χρησιμοποιείται περισσότερο στην Ευρώπη. Τα συστήματα αυτά προσφέρουν πληροφορίες για την επιβίωση των ασθενών αλλά δε μπορούν να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου.

Μετά την τροποποίηση του αρχικού συστήματος Rai που είχε πέντε υποομάδες (στάδια 0-IV), πλέον ο διαχωρισμός των ασθενών γίνεται σε τρεις κατηγορίες. Οι ασθενείς που εμφανίζουν μόνο λεμφοκυττάρωση ορίζονται ως χαμηλού κινδύνου. Ασθενείς με λεμφαδενοπάθειες ή/και ηπατοσπληνομεγαλία ανήκουν στους ενδιάμεσου κινδύνου, ενώ αυτοί που θα εμφανίσουν και αναιμία ή/και θρομβοπενία χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου.

Από την άλλη, το σύστημα σταδιοποίησης Binet ορίζει τρεις διαφορετικές κατηγορίες με βάση τον αριθμό των λεμφοειδικών θέσεων που εμπλέκονται στην εξέταση.<sup>30-31</sup>

## **1.11 Γενετικοί δείκτες**

Στους γενετικούς δείκτες ανήκουν τόσο χρωμοσωμικές ανωμαλίες όσο και σωματικές μεταλλάξεις.

### **1.11.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες**

Το 80% των ασθενών με ΧΛΛ εμφανίζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συνήθως απώλεια ή προσθήκη χρωμοσωμικών τμημάτων. Οι περισσότεροι ασθενείς (~80%)

φέρουν τουλάχιστον μια από τις εξής 4 κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες: διαγραφή στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q14)], διαγραφή στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [del(11q22-q23)], διαγραφή στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [del(17p13)] και τρισωμία 12 (+12).<sup>26</sup>

Η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία από τις παραπάνω είναι η del(13q) που εντοπίζεται στο 50% των ασθενών. Σε αυτή την περιοχή βρίσκονται δύο miRNA, τα mir15a και mir-16-1, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση των πρωτεϊνών BCL2 και ZAP70. Οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλλουν στην αυξημένη αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και σε ενισχυμένη σηματοδότηση του BcR, αντιστοίχως. Επομένως, η del(13q) θα οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση των miRNA, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών BCL2 και ZAP70 και των λειτουργιών τους, που συμβάλλουν στην πρόοδο της ΧΛΛ.<sup>28</sup>

Η τρισωμία 12 (+12) ανιχνεύεται στο 10-20% των ασθενών και σχετίζεται με ενδιάμεση πρόγνωση. Οι ασθενείς ΧΛΛ με τρισωμία 12 εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα άλλων δευτερογενών καρκίνων. Λόγω του επιπλέον χρωμοσώματος, είναι πιθανό να αυξηθεί η έκφραση κάποιων γονιδίων που περιέχονται στο χρωμόσωμα αυτό αλλά και άλλων γονιδίων που ρυθμίζονται από τα συγκεκριμένα γονίδια. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων, η οποία συμβάλλει στην παθογένεια της ΧΛΛ.<sup>29</sup>

Η del(11q) απαντάται στο 5-20% των ασθενών και η περιοχή διαγραφής ποικίλει σε μέγεθος. Ένα από τα γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή αυτή και επηρεάζεται από την διαγραφή είναι το γονίδιο *ATM*, το οποίο κωδικοποιεί την ATM κινάση που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Από την άλλη, η del(17p) εντοπίζεται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών. Η περιοχή που διαγράφεται περιλαμβάνει σχεδόν πάντα και την 17p13. Εκεί εντοπίζεται και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*. Από τις παραπάνω διαγραφές, οι del(17p) και del(11q) σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση, ενώ η del(13q) με ευνοϊκή πρόγνωση.<sup>20-25</sup>

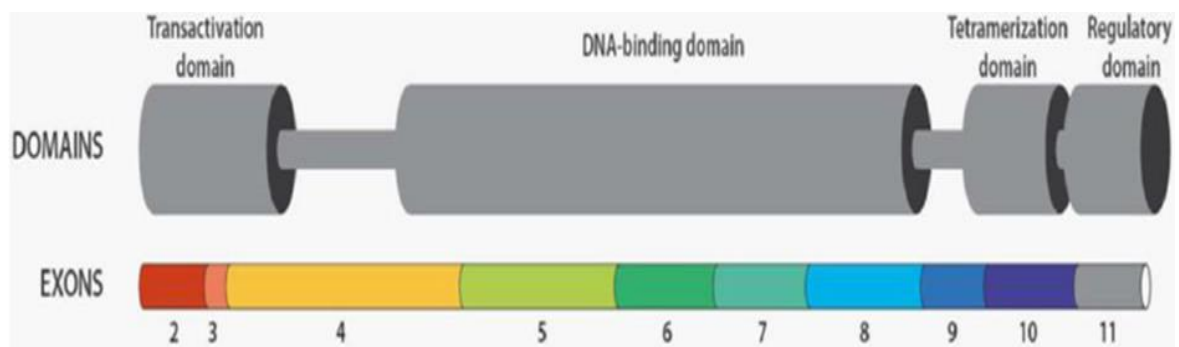
### 1.11.2 Σωματικές μεταλλάξεις

Σωματικές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα γονίδια, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται γονίδια που μετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (για παράδειγμα τα γονίδια *TP53*, *ATM*, *BIRC3*), στην επεξεργασία του mRNA (για παράδειγμα το γονίδιο *SF3B1*) και στη σηματοδότηση *NOTCH* (για παράδειγμα το γονίδιο *NOTCH1*).<sup>32</sup>

### 1.12 Το γονίδιο *TP53*

Το 1979 όταν και περιγράφηκε για πρώτη φορά η πρωτεΐνη p53 από δύο ξεχωριστές ομάδες (Lane & Crawford 1979, DeLeo et al. 1979, Linzer & Levine 1979) θεωρήθηκε ότι λειτουργεί ως ογκογονίδιο. Όμως περίπου 10 χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκε ο προστατευτικός χαρακτήρας της και αναγνωρίστηκε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Το γονίδιο *TP53* (Tumor suppressor p53) εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα (p) του χρωμοσώματος 17 (17p13.1). Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 με 393 αμινοξέα και αποτελείται από 11 εξόνια, με το πρώτο να μην είναι κωδικό (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου *TP53*

(Προέλευση: Catherwood, M. A., Gonzalez, D., Donaldson, D., Clifford, R., Mills, K., & Thornton, P. (2019). Relevance of *TP53* for CLL diagnostics. *Journal of Clinical Pathology*, 343–346)

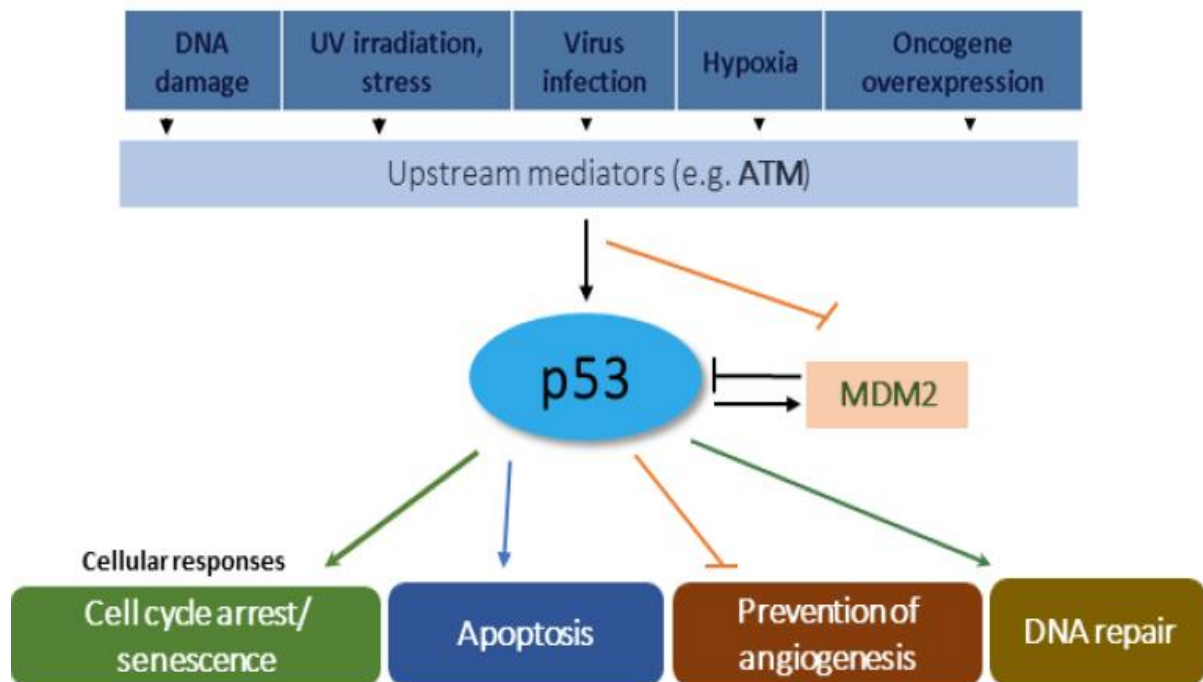
Το γονίδιο *TP53* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο σε καρκίνους, π.χ. στον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, γεγονός που αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που κατέχει.<sup>33-35</sup>

### 1.12.1 Φυσιολογική λειτουργία της p53

Η πρωτεΐνη p53 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που δεσμεύεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Το γονίδιο μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορους παράγοντες. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται το κυτταρικό στρες που προκαλείται από βλάβες στο DNA, υποξία, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η μεταβολική δυσλειτουργία. Μετά τη σύνδεσή της στο DNA η p53 οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων που προστατεύουν τον οργανισμό από την ανάπτυξη καρκίνου. Σε αυτές τις κυτταρικές απαντήσεις συμπεριλαμβάνονται διεργασίες όπως η παύση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αναστολή της αγγειογένεσης και η επιδιόρθωση του DNA (Εικόνα 8). Επιπλέον, η p53 αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες, για παράδειγμα πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στον ογκοκατασταλτικό ρόλο της p53.<sup>33</sup>



## Cellular stresses



**Εικόνα 8:** Ενεργοποίηση και λειτουργία της p53

(Προέλευση: Catherwood, M. A., Gonzalez, D., Donaldson, D., Clifford, R., Mills, K., & Thornton, P. (2019). Relevance of TP53 for CLL diagnostics. *Journal of Clinical Pathology*, 343–346)

Όταν υπάρχει βλάβη του DNA και ενεργοποιείται το γονίδιο *TP53*, αναστέλλοντας τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, το κύτταρο έχει τον απαραίτητο χρόνο για να επιδιορθώσει τη βλάβη. Εφόσον επιδιορθωθεί η βλάβη στο DNA τα επίπεδα της p53 μειώνονται, επιτρέποντας πλέον τη μετάβαση στην φάση S και τη συνέχεια του κυτταρικού κύκλου. Εάν δεν είναι δυνατή η επιδιόρθωση της βλάβης, τότε η p53 προάγει την απόπτωση του κυττάρου.

Ανάλογα με τον τύπο του κυτταρικού στρες ρυθμίζεται και διαφορετική απόκριση σε αυτό. Για παράδειγμα, εάν υπάρχει μικρή βλάβη του DNA θα διακοπεί ο κυτταρικός κύκλος και θα επιδιορθωθεί το DNA. Εάν όμως υπάρχει ένα πιο δυνατό σήμα ενεργοποίησης της p53 τότε το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Έτσι, η p53 συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, για αυτό και χαρακτηρίστηκε ως 'φύλακας του γονιδιώματος' ('guardian of the genome').

Η δραστικότητα της p53 ελέγχεται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, π.χ. φωσφορυλίωση, ακετυλίωση και ουμπικουιλίνωση, οι οποίες επηρεάζουν την δέσμευση της πρωτεΐνης στο DNA αλλά και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες.<sup>36</sup>

Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη p53 δεσμεύεται στο DNA και με τη σειρά της, κωδικοποιεί μια σειρά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των *MDM2*, *GADD45* και p21.

Η λιγκάση ουμπικουιλίνης Mdm2 (Mouse double minute 2) και η p53 συνδέονται μεταξύ τους μέσω αυτορρυθμιζόμενης αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) (Εικόνα 9). Το *MDM2* είναι ένα ογκογονίδιο του οποίου η μεταγραφή επάγεται από την p53. Η Mdm2 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της p53, καθώς την οδηγεί σε ουμπικουιλίνωση και αποικοδόμηση. Η PKB φωσφορυλιώνει την Mdm2, με αποτέλεσμα να εισέρχεται στον πυρήνα και να ουμπικουιλινώνει την p53. Όταν υπάρχει βλάβη στο DNA η p53 φωσφορυλιώνεται κι έτσι δε μπορεί η Mdm2 να την οδηγήσει σε ουμπικουιλίνωση. Ως αποτέλεσμα τα επίπεδα της p53 αυξάνονται όταν υπάρχει βλάβη στο DNA.<sup>37</sup>

Η πρωτεΐνη p21 ανήκει στην οικογένεια Cip/Kip (Cyclin-dependent Kinase inhibitor) των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Ειδικότερα, αναστέλλει την δραστηριότητα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDK1, CDK2 και των CDK4/6. Έτσι λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια των φάσεων G1 και S, καθώς αυτά τα σύμπλοκα είναι υπεύθυνα για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς, η πρωτεΐνη p21 αναστέλλει την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και αποτρέπει το διπλασιασμό του DNA, χωρίς όμως να το επιδιορθώνει.<sup>38-39</sup>

Η πρωτεΐνη Gadd45 (growth arrest and DNA-damage) εμπλέκεται σε διεργασίες όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση και η επιδιόρθωση του DNA. Η Gadd45 διεγείρει την επιδιόρθωση του DNA μέσω της δέσμευσής της με την PCNA (proliferating cell nuclear antigen), η οποία είναι μια κυκλίνη-πυρηνική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τις πρωτεάσες και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή. Με αυτόν τον

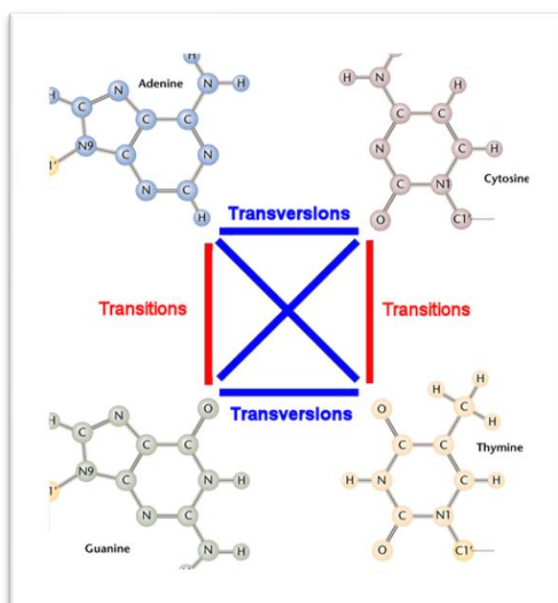
τρόπο, η Gadd45 προάγει την επιδιόρθωση του DNA και αναστέλλει τη δράση του PCNA στην αντιγραφή του DNA.<sup>40</sup>

### 1.12.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53

Εφόσον υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο TP53, η πρωτεΐνη που θα παραχθεί δεν θα είναι λειτουργική και έτσι απενεργοποιείται η ογκοκατασταλτική δράση της. Σε ενδεχόμενη βλάβη του DNA το κύτταρο δεν σταματά την ανάπτυξη. Ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται χωρίς να έχει επιδιορθωθεί η βλάβη στο DNA, γεγονός που είναι πιθανό να οδηγήσει σε ογκογένεση.

Οι μεταλλάξεις που μπορεί να υποστεί το γονίδιο TP53 είναι δύο ειδών (Εικόνα 9):

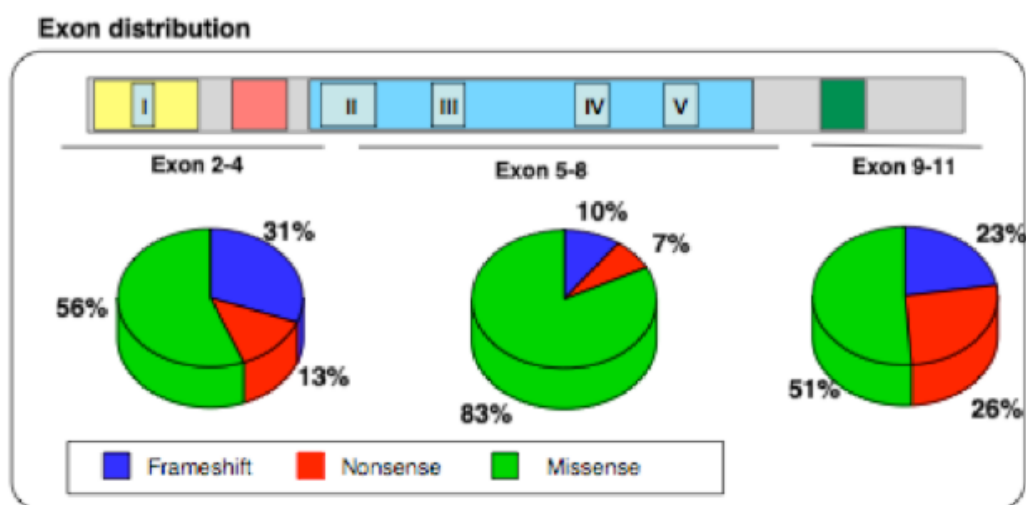
- Μετάπτωση (Transition): αλλαγές μεταξύ των πουρινών (A και G) ή των πυριμιδινών (T και C).
- Μεταστροφή (Transversion): αλλαγή από πουρίνη σε πυριμιδίνη και αντίστροφα.



Εικόνα 9: Είδη μεταλλάξεων

(Προέλευση: [https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions\\_vs\\_Transversions.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html))

Το 90% των μεταλλάξεων συμβαίνει στην κεντρική περιοχή πρόσδεσης με το DNA. Τα κωδικόνια που εντοπίζονται οι μεταλλάξεις διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου, με τις πιο κοινές μεταλλάξεις του γονιδίου να είναι missense μεταλλάξεις (Εικόνα 10).<sup>41</sup>



*Εικόνα 10: Κατανομή των μεταλλάξεων ανά κωδικόνιο*

(Προέλευση: [http://p53.free.fr/Database/p53%20HandBook\\_1.1.pdf](http://p53.free.fr/Database/p53%20HandBook_1.1.pdf))

### 1.12.3 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*

Ένας από τους βιοδείκτες που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαχείριση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με δυσμενή έκβαση της ασθένειας, λόγω αντίστασης στη χημειοθεραπεία.<sup>42</sup>

Συνήθως η έλλειψη του μικρού βραχίονα στο χρωμόσωμα 17 συνοδεύεται από μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* σε ασθενείς με ΧΛΛ. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν συγκεκριμένα επίκεντρα ('hot spots') όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις, τα οποία βρίσκονται σε ορισμένα τμήματα του γονιδίου.<sup>42,47</sup>

Η συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου *TP53* είναι χαμηλή σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει θεραπεία και υπολογίζεται, περίπου στο 10-15%. Ωστόσο, αυξάνεται σε ασθενείς με εξέλιξη νόσου, φτάνοντας σε ποσοστά 25-50%.<sup>43</sup>

### 1.13 Αντικείμενο μελέτης

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την ύπαρξη *TP53*-μεταλλαγμένων μικροκλώνων με χρήση μεθοδολογίας αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) υψηλής ευαισθησίας και μεγάλης ακρίβειας σε ομάδα ασθενών με ΧΛΛ.

Η ανίχνευση και αξιολόγηση των μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας αλληλομόρφου (Variant Allele Frequency, VAF) έως και 2% σε υπο-κλώνους (minor subclones) λευχαιμικών Β κυττάρων που συνυπάρχουν με τον κυρίαρχο κλώνο του γονιδίου *TP53* με τη χρήση της αλληλούχησης επόμενης γενιάς συμβάλλει στη καλύτερη κλινική διαχείριση των ασθενών δίνοντας νέα δυναμική στον τομέα της μοριακής διαγνωστικής.<sup>44-46</sup>

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Ομάδα μελέτης

Η ομάδα μελέτης περιελάμβανε συνολικά 274 περιπτώσεις από τις οποίες 151 αφορούσαν σε ασθενείς με πρόοδο νόσου (progressive) χωρίς έλλειψη 17p (εξέταση με FISH είτε με κλασικό καρυότυπο) ούτε μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* (μετά από αλληλούχηση κατά Sanger), ενώ η άλλη υποομάδα περιλάμβανε 123 ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, ανιχνεύσιμες με αλληλούχηση κατά Sanger, σε διάφορες φάσεις της νόσου (διάγνωση, πριν από την 1η γραμμή θεραπείας, πριν από κάθε επόμενη γραμμή θεραπείας).

### 2.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από αίμα έγινε μετά από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας, με χρήση του αντιδραστηρίου φικόλη (Ficoll-Hyraque).

#### Διαδικασία

1. Επιστοιβασία 35 ml ολικού αίματος σε 15 ml φικόλλης.
2. Φυγοκέντρηση στις 2.300 rpm επί 20 λεπτά χωρίς φρένο.
3. Συλλογή της στοιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων και μεταφορά σε νέο σωληνάριο.
4. Προσθήκη ανάλογης ποσότητας θρεπτικού RPMI, ώστε να προκύψει τελικός όγκος 15ml.
5. Φυγοκέντρηση στις 2.100 rpm επί 8 λεπτά.
6. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 10ml θρεπτικού RPMI.
7. Φυγοκέντρηση στις 2.100 rpm επί 8 λεπτά.

8. Απόρριψη του υπερκειμένου. Κύτταρα σε ίζημα.
9. Προσθήκη όγκου RPMI για επαναιώρηση των κυττάρων, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση τους.
10. Μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο με τη χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής trypan blue.

### **2.3 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA**

Γονιδιωματικό DNA (gDNA) απομονώθηκε από δείγματα αίματος. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με πέψη με πρωτεϊνάση K με τη χρήση του Invitrogen DNA Mini Kit. Οι στήλες χρησιμοποιούνται για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων. Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών σιλικόνης, η οποία δεσμεύει εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεϊνικά μόρια και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν τη δράση της πολυμεράσης κατά την αντίδραση PCR.

Το Kit περιέχει τις κατάλληλες στήλες, πρωτεϊνάση K, το διάλυμα AL (διάλυμα λύσης), τα διαλύματα AW1 και AW2 (διαλύματα για τις εκπλύσεις, απαιτείται προσθήκη αιθανόλης πριν τη χρήση) και το διάλυμα AE (διάλυμα έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA).

#### **Διαδικασία:**

1. Επαναιώρηση του pellet των κυττάρων σε 200μl PBS.
2. Προσθήκη 20μl πρωτεϊνάση K και 200 μl Lysis Buffer στο δείγμα.
3. Vortex ή ανακίνηση.
4. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 λεπτά.
5. Προσθήκη 200 μl αιθανόλη στο σωληνάριο erpendorf και ανάδευση.
6. Μεταφορά του δείγματος στην στήλη και φυγοκέντρηση στα 10.000g για 3 λεπτά.
7. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη και προσθήκη 500 μl Wash Buffer 1.
8. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 3 λεπτά.

9. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη και προσθήκη 500 μl Wash Buffer 2.
10. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 3 λεπτά.
11. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο erpendorf και προσθήκη στη στήλη 100μl Elution Buffer. Επώαση για 5 λεπτά.
12. Φυγοκέντρηση στα 10.000g για 3 λεπτά.
13. Η στήλη απομακρύνεται. Το σωληνάριο erpendorf περιέχει το DNA.

## **2.4 Ενίσχυση του γονιδίου *TP53* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ενίσχυση με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τη χρήση ειδικών εκκινητών για τα εξόνια 2-11 του γονιδίου *TP53*, περιοχές όπου εντοπίζονται μεταλλάξεις με αντίκτυπο στην λειτουργία της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γονιδιωματικού DNA. Το πρωτόκολλο για την ενίσχυση των εξωνίων 2 έως 11 του γονιδίου *TP53* στηρίζεται στις συστάσεις του International Agency for Research on Cancer (IARC) και European Research Initiative on CLL (ERIC) για τις μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Στους εκκινητές έχουν προστεθεί κατάλληλα άκρα που περιέχουν αλληλουχίες απαραίτητες στην κατασκευή και αλληλούχηση των βιβλιοθηκών σε αλληλουχητές του οίκου Illumina.



*Πίνακας 1: Αντιδραστήρια για την ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου TP53.*

| <b>Αντιδραστήρια</b>                    | <b>Όγκος</b> |
|---|--------------|
| Υπόστρωμα (gDNA ~50ng/μl)               | 1 μl         |
| 5x Q5 Reaction Buffer                   | 5 μl         |
| 10mM dNTPs Mix                          | 0,5 μl       |
| 10μM Forward primer                     | 1,25 μl      |
| 10μM Reverse primer                     | 1,25 μl      |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2u/μl) | 0,25 μl      |
| Water used for PCR                      | 15,25 μl     |
| <b>Τελικός όγκος</b>                    | <b>25 μl</b> |

Συνθήκες αντίδρασης:

- Αρχική αποδιάταξη: 98<sup>o</sup>C, 30 sec
- Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους, όπου κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
  - ο Αποδιάταξη: 98<sup>o</sup>C, 10 sec
  - ο Υβριδισμός εκκινητών: 62<sup>o</sup>C, 20 sec
  - ο Σύνθεση μορίων DNA: 72<sup>o</sup>C, 20 sec
- Τελική επέκταση συντιθέμενων μορίων DNA: 72<sup>o</sup>C, 2 min

Ακολουθεί ποιοτικός έλεγχος της επιτυχούς ενίσχυσης των εξωνίων 2 έως 11 του γονιδίου *TP53*. Εκτίμηση του μεγέθους σε ζεύγη βάσεων (bp) των ενισχυμένων θραυσμάτων και εκτίμηση της συγκέντρωσής τους με ηλεκτροφόρηση.

## **2.5 Ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR**

Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity). Η ανάλυση είναι εξαιρετικά επιλεκτική για δίκλωνο DNA (dsDNA), καθώς το αντιδραστήριο προσδέεται σε νουκλεϊνικά οξέα. Είναι ακριβής ανάλυση για αρχικές συγκεντρώσεις δείγματος από 10pg/μl έως

100ng/μl και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Το Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit περιέχει το Qubit® dsDNA HS Reagent, το Qubit® dsDNA HS Buffer, το Qubit® dsDNA HS Standard #1 και το Qubit® dsDNA HS Standard #2.

Η διαδικασία απαιτεί την κατασκευή δύο standards ώστε να γίνει η βαθμονόμηση του Qubit® Fluorometer.

#### **Διαδικασία:**

1. Προετοιμασία ενός Mix που θα περιέχει το Qubit® dsDNA HS Reagent και το Qubit® dsDNA HS Buffer. Αραίωση 1:200 του Qubit® dsDNA HS Reagent σε Qubit® dsDNA HS Buffer.  
Ο τελικός όγκος κάθε tube πρέπει να είναι 200μl. Για κάθε standard απαιτούνται 190μl από το Mix και για κάθε δείγμα απαιτούνται 180-190μl από το Mix.
2. Προσθήκη 190μl Mix στα tubes που θα χρησιμοποιηθούν για τα standards και προσθήκη 180-199μl Mix στα tubes που θα χρησιμοποιηθούν για τα δείγματα.
3. Προσθήκη 10μl από τα Qubit® dsDNA HS Standard #1 και Qubit® dsDNA HS Standard #2 στα αντίστοιχα tubes.
4. Προσθήκη 1-20μl δείγματος στα αντίστοιχα tubes.
5. Vortex.
6. Επώαση 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μέτρηση στο Qubit® Fluorometer.
8. Πρώτα πραγματοποιείται η μέτρηση για το Qubit® dsDNA HS Standard #1, μετά για το Qubit® dsDNA HS Standard #2 για να γίνει το Calibration. Στην συνέχεια πραγματοποιείται η μέτρηση για το κάθε δείγμα.

Για κάθε ένα δείγμα ετοιμάζεται ισομοριακό μείγμα (5-40ng/μl) των ενισχυμένων PCR προϊόντων αναμιγνύοντας τους κατάλληλους όγκους.

## 2.6 Καθαρισμός των προϊόντων PCR για το γονίδιο *TP53*

Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με την χρήση AMPure XP beads (0,8X). Οι μαγνήτες χρειάζεται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την χρήση τους.

### Διαδικασία:

1. Προσθήκη 0,8X AMPure XP beads στο προϊόν της PCR.
2. Ανακίνηση μέχρι να ομογενοποιηθεί το δείγμα με τα beads.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Μεταφορά στον μαγνήτη και επώαση για 3 λεπτά.
5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθούν τα beads.
6. Προσθήκη 200μl αιθανόλης (80%).
7. Απομάκρυνση αιθανόλης.
8. Επανάληψη βημάτων 6,7.
9. Επώαση 5 λεπτά με ανοιχτά καπάκια μέχρι να στεγνώσουν τα beads.
10. Απομάκρυνση των tubes από τον μαγνήτη και έκλυση σε 30μl H<sub>2</sub>O.
11. Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Μεταφορά στον μαγνήτη και επώαση για 3 λεπτά.
13. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά tubes. Το υπερκείμενο περιέχει το προϊόν της PCR.

## 2.7 Ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR

Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με την χρήση του Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity). Η ανάλυση είναι εξαιρετικά επιλεκτική για δίκλωνο DNA (dsDNA), καθώς το αντιδραστήριο προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα. Είναι μια ακριβής ανάλυση για αρχικές συγκεντρώσεις δείγματος από 10pg/μl έως 100ng/μl και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Το Qubit® dsDNA HS

(High Sensitivity) Assay Kit περιέχει το Qubit® dsDNA HS Reagent, το Qubit® dsDNA HS Buffer, το Qubit® dsDNA HS Standard #1 και το Qubit® dsDNA HS Standard #2.

Η διαδικασία απαιτεί την κατασκευή δύο standards ώστε να γίνει η βαθμονόμηση του Qubit® Fluorometer.

#### **Διαδικασία:**

1. Προετοιμασία ενός Mix που θα περιέχει το Qubit® dsDNA HS Reagent και το Qubit® dsDNA HS Buffer. Αραίωση 1:200 του Qubit® dsDNA HS Reagent σε Qubit® dsDNA HS Buffer.  
Ο τελικός όγκος κάθε tube πρέπει να είναι 200μl. Για κάθε standard απαιτούνται 190μl από το Mix και για κάθε δείγμα απαιτούνται 180-190μl από το Mix.
2. Προσθήκη 190μl Mix στα tubes που θα χρησιμοποιηθούν για τα standards και προσθήκη 180-199μl Mix στα tubes που θα χρησιμοποιηθούν για τα δείγματα.
3. Προσθήκη 10μl από τα Qubit® dsDNA HS Standard #1 και Qubit® dsDNA HS Standard #2 στα αντίστοιχα tubes.
4. Προσθήκη 1-20μl δείγματος στα αντίστοιχα tubes.
5. Vortex.
6. Επώαση 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μέτρηση στο Qubit® Fluorometer.
8. Πρώτα πραγματοποιείται η μέτρηση για το Qubit® dsDNA HS Standard #1, μετά για το Qubit® dsDNA HS Standard #2 για να γίνει το Calibration. Στην συνέχεια πραγματοποιείται η μέτρηση για το κάθε δείγμα.

## 2.8 Κατασκευή βιβλιοθηκών με τη χρήση εκκινητών μοριακών ευρετηρίων Nextera XT Index kit v2.

Για κάθε ένα δείγμα προστίθενται κατάλληλες αλληλουχίες ταυτοποίησης (indexes) με την μέθοδο της PCR. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα 2 μl ισομοριακού μίγματος. Οι αλληλουχίες ταυτοποίησης υβριδίζονται ειδικά σε θέσεις εκατέρωθεν της περιοχής που αντιστοιχεί στα εξόνια και χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικούς συνδυασμούς για το κάθε δείγμα.

*Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για την Index PCR*

| Αντιδραστήρια                           | Όγκος        |
|---|--------------|
| Υπόστρωμα (~40ng/μl)                    | 2 μl         |
| 5x Q5 Reaction Buffer                   | 5 μl         |
| 10mM dNTPs Mix                          | 0,5 μl       |
| 5μM Index A                             | 1,25 μl      |
| 5μM Index B                             | 1,25 μl      |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2u/μl) | 0,25 μl      |
| Water used for PCR                      | 14,75 μl     |
| <b>Τελικός όγκος</b>                    | <b>25 μl</b> |

### Συνθήκες αντίδρασης:

- Αρχική αποδιάταξη: 98°C, 30 sec
- Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 8 κύκλους, όπου κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
  - Αποδιάταξη: 98°C, 10 sec
  - Υβριδισμός εκκινητών: 62°C, 20 sec
  - Σύνθεση μορίων DNA: 72°C, 40 sec
- Τελική επέκταση συντιθέμενων μορίων DNA: 72°C, 2 min

## 2.9 Καθαρισμός, ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών.

Ολοκληρωμένες βιβλιοθήκες των εξωνίων 2-11 του γονιδίου *TP53* υπόκεινται σε κατάλληλη επεξεργασία έτσι ώστε να απομακρυνθούν κατάλοιπα (άλατα, ένζυμα κ.τ.λ.) από τη διαδικασία κατασκευής τους. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων μαγνητικών σφαιριδίων (AMPure XP beads), τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μόρια DNA συγκεκριμένου μεγέθους ανάλογα με την αναλογία που προστίθενται στο δείγμα.

### Διαδικασία:

1. Προσθήκη 0,8X AMPure XP beads στο προϊόν της PCR.
2. Ανακίνηση μέχρι να ομογενοποιηθεί το δείγμα με τα beads.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Μεταφορά στον μαγνήτη και επώαση για 3 λεπτά.
5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθούν τα beads.
6. Προσθήκη 200μl αιθανόλης (80%).
7. Απομάκρυνση αιθανόλης.
8. Επανάληψη βημάτων 6,7.
9. Επώαση 5 λεπτά με ανοιχτά καπάκια μέχρι να στεγνώσουν τα beads.
10. Απομάκρυνση των tubes από τον μαγνήτη και έκλυση σε 30μl H<sub>2</sub>O.
11. Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Μεταφορά στον μαγνήτη και επώαση για 3 λεπτά.
13. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά tubes. Το υπερκείμενο περιέχει το προϊόν της Index PCR.

Το παραγόμενο αποτέλεσμα είναι μια βιβλιοθήκη DNA κάθε μόριο της οποίας φέρει διακριτή μοριακή "ταυτότητα" αποκλείοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της PCR.

## 2.10 Ποιοτικός έλεγχος και ποσοτικός προσδιορισμός των βιβλιοθηκών

Έλεγχος των καθαρισμένων βιβλιοθηκών που έχουν παραχθεί για την παρουσία διμερών προϊόντων, εκτίμηση του μέσου μεγέθους σε ζεύγη βάσεων (bp) των κατασκευασμένων βιβλιοθηκών και υπολογισμός της συγκέντρωσής τους με φθορισμό και ηλεκτροφόρηση σε σύστημα με τριχοειδή.

Η εκτίμηση του μέσου μεγέθους σε ζεύγη βάσεων (bp) των κατασκευασμένων βιβλιοθηκών και ο υπολογισμός της συγκέντρωσής πραγματοποιείται με την χρήση Fragment Analyzer.

1. Τοποθέτηση 22μl Diluent Marker (DNF-477 High sensitivity small Fragment Analysis Kit) σε κατάλληλη πλάκα 96 θέσεων χωρητικότητας 0.2ml
2. Προσθήκη 2μl από τις βιβλιοθήκες σε κάθε θέση της πλάκας. Προσθήκη 2μl από τον DNA μάρτυρα (High Sensitivity Small Fragment DNA Ladder) στη δωδέκατη θέση της σειράς.
3. Τοποθέτηση της απαραίτητης ποσότητας γέλης (Separation gel) καθώς και της κατάλληλης ποσότητας χρωστικής (Intercalating Dye) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα στον κατάλληλο υποδοχέα του συστήματος.

*Πίνακας 3: Αναλογία αριθμού δειγμάτων-ποσότητας χρωστικής-ποσότητας γέλης*

| Number of samples to be analyzed | Volume of Intercalating dye | Volume of Separation Gel |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 12                               | 1.0 μL                      | 10 mL                    |
| 24                               | 1.50 μL                     | 15 mL                    |
| 36                               | 2.0 μL                      | 20 mL                    |
| 48                               | 2.50 μL                     | 25 mL                    |
| 96                               | 4.50 μL                     | 45 mL                    |

4. Τοποθέτηση στον κατάλληλο υποδοχέα του συστήματος διάλυμα 1x Conditioning Solution. Απαιτούνται 5ml από το διάλυμα 1X Conditioning Solution ανά σειρά 12 δειγμάτων.
5. Σε κατάλληλη πλάκα 96 θέσεων χωρητικότητας 1.5ml και πάντα στη σειρά A, προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι 1ml αραιωμένου (1x) διαλύματος 5x Inlet Buffer.
6. Τοποθέτηση της πλάκας στο συρτάρι W του συστήματος για τη συλλογή των χρησιμοποιημένων διαλυμάτων του συστήματος.
7. Σε κατάλληλη πλάκα 96 θέσεων χωρητικότητας 0.2ml προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι 200μl διαλύματος 0.25x Rinse Buffer. Τοποθέτηση της πλάκας στο συρτάρι M του συστήματος.
8. Στον αντίστοιχο πίνακα του λογισμικού του συστήματος επιλογή της σωστής θέσης των δειγμάτων, καταγραφή των κωδικών των δειγμάτων και έναρξη της ηλεκτροφόρησης.
9. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με την χρήση του λογισμικού PROSize Data Analysis Software.

## **2.11 Αλληλούχηση στον αλληλουχητή επόμενης γενιάς MiSeq Illumina.**

Η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε σε συστήματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς του οίκου Illumina μέσω της τεχνολογίας σύνθεσης (sequence by synthesis, SBS) του οίκου Illumina.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Εμπορικό σκεύασμα (kit) για την κλωνική ενίσχυση και την αλληλούχηση βιβλιοθήκης σε αλληλουχητή του οίκου Illumina (MiSeq Reagent Kit v3, 600-cycles, #MS-102-3003)



2. Νερό (Molecular Biology Grade)
3. 1N NaOH (Applichem) (A6579,1000)
4. Εμπορικό σκεύασμα δείγματος ελέγχου συμβατό με τους αλληλουχητές επόμενης γενιάς του οίκου Illumina (PhiX control v3, # FC-110-3001)

#### **Διαδικασία:**

1. Αναγραφή των κωδικών των δειγμάτων, των αντίστοιχων μοριακών ευρετήριων (indexes) και των παραμέτρων με τις οποίες θα πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση στον κατάλληλο πίνακα του λογισμικού της Illumina, Illumina Experiment Manager.
2. Αφαίρεση της κασέτας αντιδραστηρίων (Reagent cartridge) από την κατάψυξη και επώαση μέχρι να ξεπαγώσει σε λουτρό με νερό παροχής (περίπου μία ώρα).
3. Προετοιμασία του ισομοριακού δείγματος των βιβλιοθηκών που πρόκειται να αλληλουχηθούν. Προετοιμασία διαλύματος 0.2N NaOH.
4. Σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5ml τοποθετείται 5μl από το ισομοριακό μείγμα. Προσθήκη στο δείγμα 5μl 0.2N NaOH. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 990μl διαλύματος HT1 Buffer (συστατικό του kit MiSeq Reagent Kit v3).
5. Σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5ml πραγματοποιείται η αραίωση του δείγματος με διάλυμα HT1 Buffer στην επιθυμητή συγκέντρωση (π.χ. 13pM).
6. Ανάμειξη των βιβλιοθηκών στην επιθυμητή αναλογία με το PhiX control. Ο συνολικός όγκος θα είναι 600μl. Επώαση στους 96°C για 3 λεπτά.
7. Πραγματοποιείται έλεγχος για το αν έχουν ξεπαγώσει τα συστατικά της κασέτας των αντιδραστηρίων και τοποθετείται το δείγμα στην ειδική εσοχή της κασέτας αντιδραστηρίων.
8. Τοποθέτηση της κασέτας αντιδραστηρίων, της Flow cell και του διαλύματος Incorporation Buffer (συστατικά του kit MiSeq Reagent Kit v3) στο MiSeq ώστε να ξεκινήσει η αλληλούχηση.

## 2.12 Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση για την ανεύρεση παθογενετικών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στα δείγματα που αλληλουχήθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων βιοπληροφορικών εργαλείων και πρωτοκόλλων.

Κατά την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, γίνεται ομαδοποίηση των διαβασμάτων που προέρχονται από το ίδιο αρχικό μόριο DNA γεγονός που αυξάνει την ακρίβεια της ανίχνευσης και επιτρέπει την αξιόπιστη εύρεση μεταλλαγών με συχνότητα εμφάνισης μικρότερη από 5%.

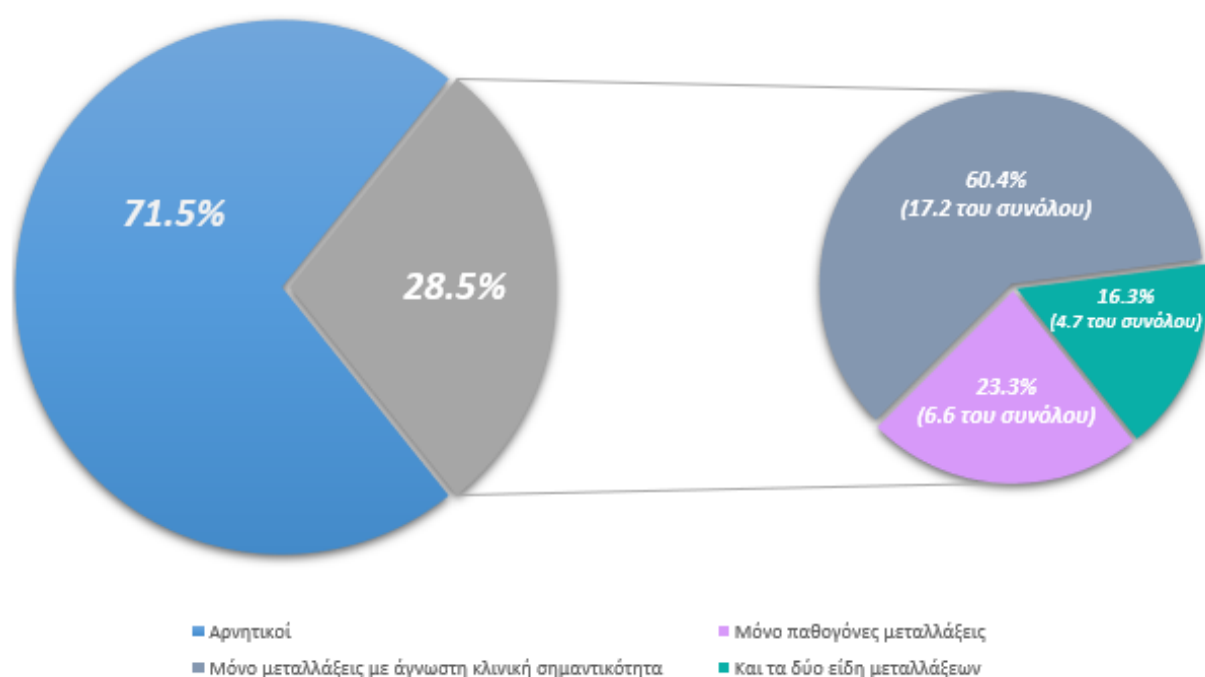
Η κλινική σημασία και οι επιπτώσεις στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης p53 όλων των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν αξιολογήθηκαν με χρήση των βάσεων δεδομένων ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (v.2019) και IARC (International Agency for Research on Cancer) TP53 database (<https://p53.iarc.fr/>).

### 3. Αποτελέσματα

Συνολικά αναλύθηκαν 151 ασθενείς ΧΛΛ με πρόοδο νόσου, χωρίς έλλειψη 17p (εξέταση με FISH είτε με κλασικό καρυότυπο) και χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* (μετά από αλληλούχηση κατά Sanger).

Σε 43/151 περιπτώσεις (28,5%) ανιχνεύθηκαν παθογόνες παραλλαγές ή παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο *TP53* με συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (VAF) κυμαινόμενο μεταξύ 11,3% και 0,9% (υποκλωνική υποομάδα).

Πιο συγκεκριμένα, σε 10/151 περιπτώσεις (6,6%) εντοπίστηκαν μόνο παθογόνες μεταλλάξεις, σε 26/151 (17,2%) εντοπίστηκαν μόνο μεταλλάξεις με άγνωστη κλινική σημασία ενώ σε 7/151 (4,7%) υπήρχαν και τα δύο είδη μεταλλάξεων (Εικόνα 11, Πίνακας 4).

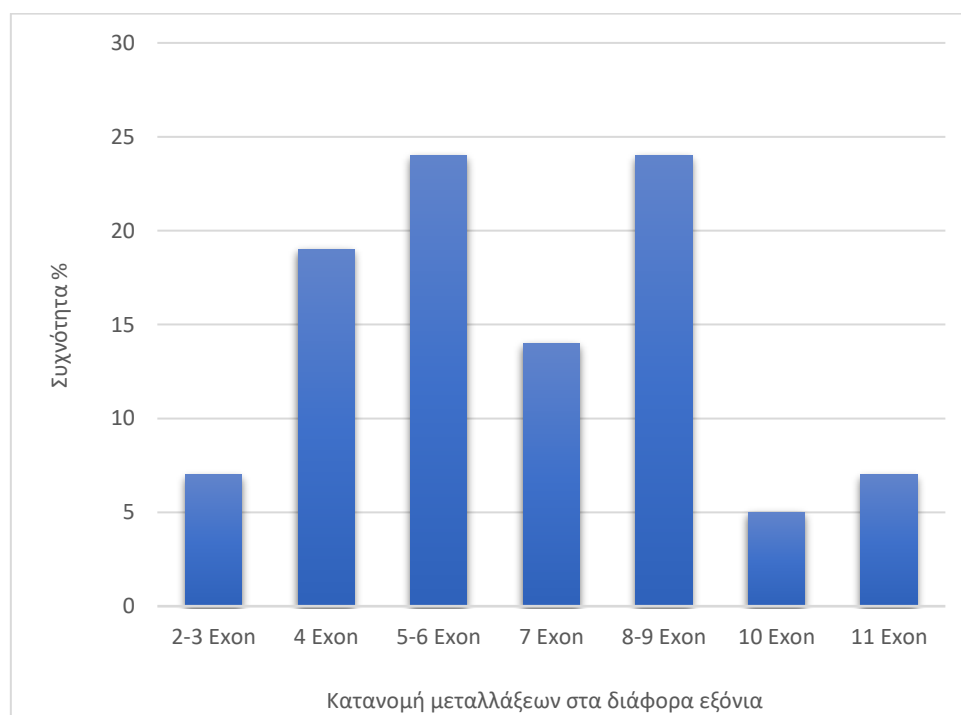


**Εικόνα 11:** Αρνητικές περιπτώσεις με Sanger ή FISH.

**Πίνακας 4:** Σύνολο περιπτώσεων

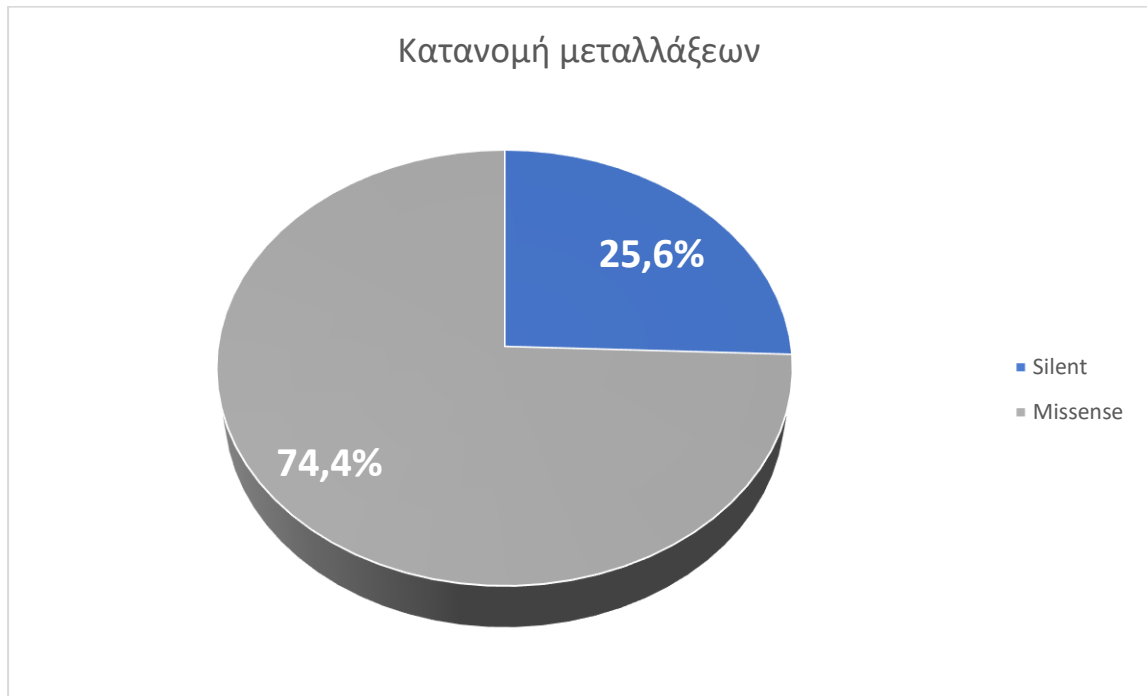
|  |     |
|--|-----|
| Σύνολο περιπτώσεων                             | 151 |
| Αρνητικές περιπτώσεις για TP53<br>μικροκλώνους | 108 |
| Θετικές περιπτώσεις για TP53<br>μικροκλώνους   | 43  |
| Παθογόνες μεταλλάξεις                          | 10  |
| Μεταλλάξεις άγνωστης κλινικής<br>σημασίας      | 26  |
| Και τα δύο είδη μεταλλάξεων                    | 7   |

Από το σύνολο των μεταλλαγών που ανιχνεύθηκαν οι περισσότερες εντοπίστηκαν σε γνωστά από την βιβλιογραφία επίκεντρα (hot spots) μεταλλάξεων στην κεντρική περιοχή πρόσδεσης του DNA, στα εξόνια 4-10 του γονιδίου TP53 (Εικόνα 12).



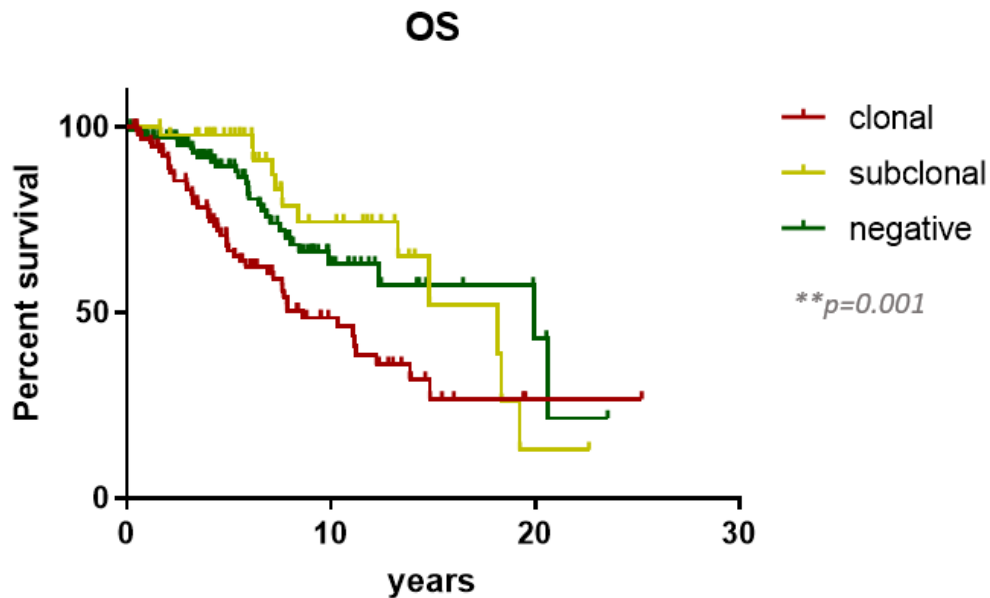
**Εικόνα 12:** Κατανομή μεταλλάξεων στα διάφορα εξόνια

Σε 32/43 μεταλλαγμένες περιπτώσεις (74,4%) η παραλλαγή οδηγούσε σε αλλαγή της αμινοξικής ακολουθίας (missense mutations) (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Κατανομή μεταλλάξεων

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε τις μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου σε σχέση με την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) των συγκεκριμένων ασθενών συγκριτικά με αυτούς που δεν έφεραν καμία παραλλαγή. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου παρουσίασαν μικρότερη ολική επιβίωση, αφού είχαν ολική επιβίωση 18,1 έτη ενώ οι ασθενείς που δεν έφεραν καμία παραλλαγή είχαν ολική επιβίωση 19,9 έτη. Επιπλέον, οι ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, ανιχνεύσιμες με αλληλούχηση κατά Sanger, παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη ολική επιβίωση (Εικόνα 14).



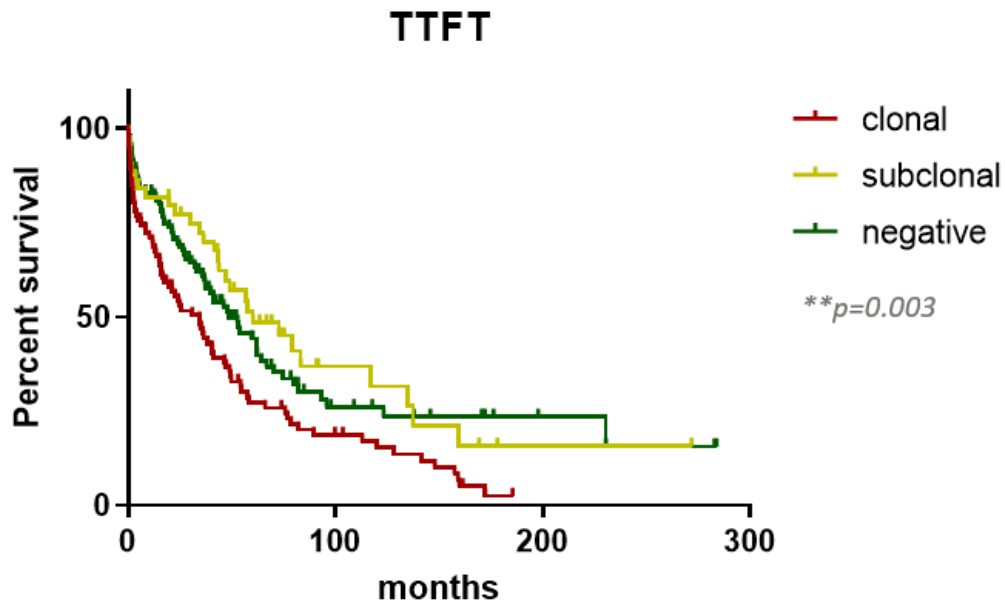
**Εικόνα 14:** Διάγραμμα ολικής επιβίωσης

(Όπου *clonal*: ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, ανιχνεύσιμες με αλληλούχηση κατά Sanger,

*subclonal*: ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου,

*negative*: ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις ανιχνεύσιμες με NGS)

Τέλος, οι ασθενείς με χαμηλής συχνότητας μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη χρονική περίοδο έως την πρώτη γραμμή θεραπείας (time-to-first-treatment, TTFT) σε σύγκριση με τις αρνητικές περιπτώσεις (Εικόνα 15).



*Εικόνα 15: Διάγραμμα TTFT*

*(Όπου Clonal: ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, ανιχνεύσιμες με αλληλούχηση κατά Sanger,*

*subclonal: ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου,*

*negative: ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις ανιχνεύσιμες με NGS)*

## 4. Συζήτηση

Η νεοπλασματική εκτροπή είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Αύξηση του πολλαπλασιασμού ή ελαττωμένη απόπτωση ή και τα δύο μαζί προάγουν την ανάπτυξη νεοπλασίας. Η ΧΛΛ αποτελεί υπόδειγμα για τη μελέτη των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης σε κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού, με δεδομένο ότι τόσο η έναρξη όσο και η εξέλιξη της νόσου συνδέονται άμεσα με αλληλεπιδράσεις μεταξύ εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μηχανισμών που επηρεάζουν το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων.

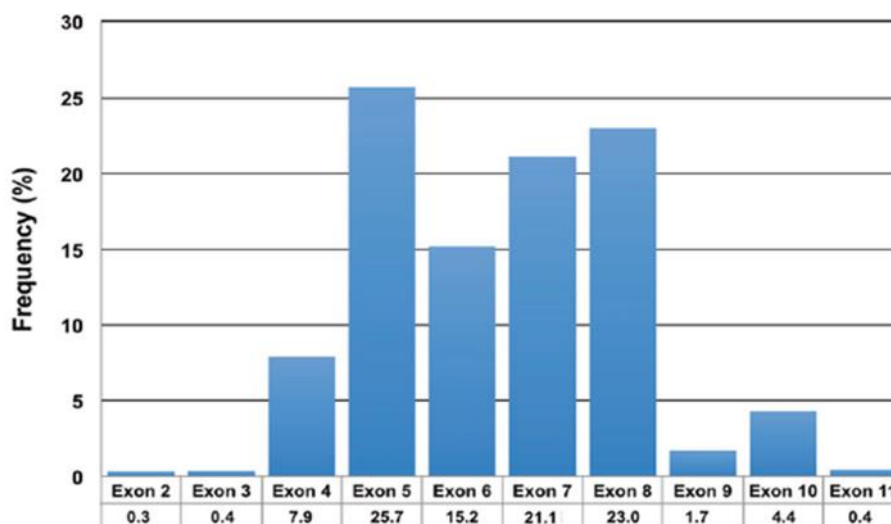
Κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της ΧΛΛ διαδραματίζει ο αντιγονικός υποδοχέας των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων (B-cell receptor, BcR). Ειδικότερα, το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αποτελεί σήμερα έναν από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες για τον καθορισμό της πρόγνωσης των ασθενών με ΧΛΛ, καθώς οι ασθενείς με A-ΧΛΛ έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση προς τους ασθενείς με M-ΧΛΛ.

Ενδοκυττάριοι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου περιλαμβάνουν ενεργοποίηση μέσω μεταλλάξεων σε ογκογονίδια (π.χ. *NOTCH1*) ή/και μειωμένη λειτουργία ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *TP53* και *ATM*). Μεταξύ των συγκεκριμένων γενετικών βλαβών, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* που οδηγούν σε απορρύθμιση του φαίνεται να σχετίζονται ισχυρά με την έκβαση του ασθενούς, καθώς προδιαγράφουν δυσμενή κλινική πορεία.

Οι μοριακές αλλαγές του γονιδίου *TP53* περιλαμβάνουν μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς. Για τον έλεγχο του γονιδίου *TP53* απαιτείται η αλληλούχηση των εξωνίων 4-10 τουλάχιστον, αφού οι περισσότερες μεταλλάξεις (>95%) εντοπίζονται στις συγκεκριμένες περιοχές. Ωστόσο, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με NGS οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μεταλλάξεις εντοπίζονται και στα εξόνια 2, 3 και 11 αλλά σε μικρότερη συχνότητα (Εικόνα 16). Επομένως, ιδανικά χρειάζεται η αλληλούχηση των εξωνίων 2-11 για να καλυφθεί ολόκληρη η κωδική περιοχή.



Επιπλέον, μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν και στις περιοχές ματίσματος, οι οποίες εντοπίζονται στην αρχή και στο τέλος κάθε εξωνίου. Επομένως, απαιτείται η αλληλούχηση +2/-2 ιντρονικών νουκλεοτιδίων ώστε να περιλαμβάνονται οι περιοχές ματίσματος και να εντοπίζονται τυχόν μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μάτισμα και κατά συνέπεια μπορεί να οδηγήσουν σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. <sup>27,42,47-49</sup>



**Εικόνα 16:** Συχνότητα παραλλαγών του γονιδίου TP53 στα διαφορετικά εξόνια.

(Προέλευση: Malcikova, J., Stamatopoulos, K., Ghia, P., et al. (2018). ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia - Update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*, 32(5), 1070–1080.)

Η αλληλούχηση μπορεί να γίνει είτε με Sanger είτε με NGS. Μελέτες έδειξαν πως όλες οι παραλλαγές που εντοπίζονται με Sanger μπορούν να εντοπιστούν και με NGS, ενώ με την αλληλούχηση NGS υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού παραλλαγών, οι οποίες ανευρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά και δε μπορούν να εντοπιστούν με Sanger αλληλούχηση. <sup>42,49</sup>

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν 151 ασθενείς ΧΛΛ με πρόοδο νόσου, οι οποίοι ήταν αρνητικοί για TP53 μικροκλώνους έπειτα από αλληλούχηση κατά Sanger. Έπειτα από την αλληλούχηση NGS, στο 28,5% των περιπτώσεων ανιχνεύθηκαν παραλλαγές στο γονίδιο TP53 με συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (VAF) κυμαινόμενο

μεταξύ 11,3% και 0,9% (υποκλωνική υποομάδα). Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στα εξόνια 4-10, όπως αναμενόταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Επιπλέον, στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι μεταλλάξεις οδηγούσαν σε αλλαγή του αμινοξέος στην πρωτεΐνη (missense mutation). Ακόμη, έπειτα από την συσχέτιση με την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και την χρονική περίοδο έως την πρώτη γραμμή θεραπείας (time-to-first-treatment, TTFT), παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου παρουσίασαν μικρότερη ολική επιβίωση, ενώ εμφάνισαν μεγαλύτερο TTFT σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν υποκλωνικές μεταλλάξεις.

Συνεπώς, η ανάλυση με NGS εμφανίζει μεγαλύτερη ακρίβεια και ειδικότητα, καθώς επίσης η παρουσία μεταλλάξεων *TP53* με χαμηλή συχνότητα αλληλομόρφου αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα στην εξέλιξη της νόσου. Χάρη στην υψηλή ευαισθησία της νέας αυτής τεχνικής καθίσταται εφικτό η ανεύρεση μικρών μεταλλαγμένων υποκλώνων. Έτσι, η αλληλούχηση επόμενης γενιάς θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο για την ολοκληρωμένη εκτίμηση του ασθενούς.

## Βιβλιογραφία

1. Kuby, J, Immunology 6<sup>th</sup> edition, W.H. Freeman and Company, 2007
2. Sherwood, L, Introduction to Human Physiology 8<sup>th</sup> edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013
3. Kumar H, Akira S, Kawai T. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(4):621-5
4. Μαμούρης, Ζ, Ζίφα, Α, Μούτου, Κ, Βιολογία 2<sup>η</sup> έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, 2011
5. Ζίφα Α, Διακυτταρική επικοινωνία- Μεταγωγή σήματος 3<sup>η</sup> έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, 2017
6. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. (2014). B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14(5):434
7. Meffre E, Davis E, Schiff C, Cunningham-Rundles C, Ivashkiv LB, Staudt LM et al. (2001). Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nat Immunol*, 1:207-213
8. Wang Y, Liu J, Burrows P, Wang JY. (2020). B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol*, 1254:1-22
9. Monroe J, Dorshkind K. (2007). Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Adv Immunol*, 95:1-50
10. Kelsoe G. (2015). Heavy-chain receptor editing unbound. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(8):2297–2298.
11. Nemazee D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*, 6(10):728–740.
12. McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. (2001). Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol*, 8(1):52-59.

13. De Silva NS, Klein U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, 15:137–148.
14. Mesin L, Ersching J, Victora GD. (2016). Germinal center B cell dynamics. *Immunity*, 45:471–482.
15. Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 22–33.
16. Huang C. (2020). Germinal Center Reaction. *Adv Exp Med Biol*, 1254:47-53.
17. Prieto JMB, Felipe MJB (2017) Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 54:38–44.
18. Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. (2000). Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev*, 175:70-79.
19. Baliakas, P., Moysiadis, T., Hadzidimitriou, A., Xochelli, A., Jeromin, S., Agathangelidis, A., Mattsson, M., Sutton, L. A., Minga, E., Scarfò, L., Rossi, D., Davis, Z., Villamor, N., Parker, H., Kotaskova, J., Stalika, E., Plevova, K., Mansouri, L., Cortese, D., Stamatopoulos, K. (2019). Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104(2), 360–369.
20. Kipps T, Stevenson F, Wu C, Croce C, Packham G, Wierda W, O'Brien S, Gribben J, Rai K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 3:17008.
21. Nabhan, C., Aschebrook-Kilfoy, B., Chiu, B. C. H., Smith, S. M., Shanafelt, T. D., Evens, A. M., & Kay, N. E. (2014). The impact of race, ethnicity, age and sex on clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis in the modern era. *Leukemia and Lymphoma*, 55(12), 2778–2784.
22. Molica S. (2006). Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma*. 47:1477-1480.
23. Munir, T. (2015). Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 20(4), 245–246.

24. Scarfò L, Ferreria A, Ghia P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 104:169-82.
25. Hallek M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, 94(11):1266-1287.
26. Dohner H, et al. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*, 343:1910–1916.
27. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111:5446–56.
28. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:15524-15529.
29. Abruzzo L, Herling C, Calin G, Oakes C, Barron L, Banks H, Katju V, Keating M, Coombes K. (2018). Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*, 103(12):2069-2078.
30. Binet JL, Leporier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. (1977). A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer Immunol Immunother*, 40(2):855-864.
31. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 46(2):219-234.
32. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526:525-530.
33. Catherwood, M. A., Gonzalez, D., Donaldson, D., Clifford, R., Mills, K., & Thornton, P. (2019). Relevance of *TP53* for CLL diagnostics. *Journal of Clinical Pathology*, 343–346.
34. Kruse JP, Gu W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609–622.

35. Whibley, C., Pharoah, P. D. P., & Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: Cancer implications. *Nature Reviews Cancer*. 9(2), 95–107.
36. Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-Suppressor Functions of the *TP53* Pathway, *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(5):1–16.
37. Moll, U. M., & Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*. 1001–1008.
38. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704.
39. Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends in Molecular Medicine*, 23(4), 310–319.
40. Salvador, M. J., Brown-Clay, D. J., Fornace Jr, J. A. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 793:1-19.
41. Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). *TP53* Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1–17.
42. Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D., Sutton, L. A., Soussi, T., Zenz, T., Kater, A. P., Niemann, C. U., Gonzalez, D., Davi, F., Gonzalez Diaz, M., Moreno, C., Gaidano, G., Stamatopoulos, K., Rosenquist, R., Stilgenbauer, S., Ghia, P., & Pospisilova, S. (2018). ERIC recommendations for *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia - Update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*, 32(5), 1070–1080.
43. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. (2011). Mutational Status of the *TP53* Gene As a Predictor of Response and Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: Results From the LRF CLL4 Trial. *JCO* 29:2223–9.
44. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. (2015). Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of *TP53* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29:877–85.
45. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152:714–26.

46. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal *TP53*, *SF3B1*, *BIRC3*, *NOTCH1* and *ATM* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127:2122–30.
47. Pospisilova, S., Gonzalez, D., Malcikova, J., Trbusek, M., Rossi, D., Kater, A. P., Cymbalista, F., Eichhorst, B., Hallek, M., Döhner, H., Hillmen, P., Van Oers, M., Gribben, J., Ghia, P., Montserrat, E., Stilgenbauer, S., & Zenz, T. (2012). ERIC recommendations on *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 26(7), 1458–1461.
48. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. (2017). Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of *TP53* variants in clinical practice. *Cancer Res*, 77:1250–60.
49. Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Brusca, A., Famà, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Wang, J., Gattei, V., Guarini, A., Foà, R., Rabadan, R., & Gaidano, G. (2014). Clinical impact of small *TP53* mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123(14), 2139–2147.