



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ
Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Μελέτη των πολυμορφισμών P21R και H159Y του TNFRSF13C/BAFFR στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Καμηνιώτη Αικατερίνη

Βιολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σπελέτας Ματθαίος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

(επιβλέπων)

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Ανοσολογίας

Ευθυμία Πετεινάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ευχαριστίες

Η διπλωματική μου εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ματθαίο Σπελέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Με πολύ εκτίμηση, θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αναστάσιο Γερμενή, που με δέχτηκε ως μέλος του εργαστηρίου του και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα, από τα καλύτερα εξοπλισμένα, ερευνητικό εργαστήριο για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασία. Ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, θα ήθελε να ευχαριστήσω για την συμμετοχή της και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Ευθυμία Πετεινάκη.

Ανεκτίμητη υπήρξε η βοήθεια που μου προσέφεραν όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Ευαγγελία Γραμουσιάνου και Μαρία Ζαμανάκου, τις Αντιγόνη Μαμάρα και Νικολέτα Αργέντου και για τις πολύτιμες συμβουλές τους και καθοδηγήσεις τους και τις υποψήφιες διδακτορικές φοιτήτριες Ειρήνη Σεβδαλή και Φανή Τσαντούλα για την όμορφη συνεργασία τους. Ευχαριστώ και τη φοιτήτρια Ευαγγελία Κουβάτα καθώς ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής δουλειάς μου. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Ευαγγελία Καραμούτη, τεχνολόγο του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια της, όπως επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ευχαριστίες από καρδιάς θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερα στην αδερφή μου Έλενα, αλλά και στους γονείς μου Βάσω και Βασίλη για την υποστήριξη ψυχολογική και υλική που μου προσέφεραν όπως και για την αυτοθυσία τους προκειμένου να καταφέρω να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
<i>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	9
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
A.1. Διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων	10
A.2. Τα μόρια BAFF και BAFFR και ο ρόλος της σύνδεσης τους (BAFF-BAFFR) στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων	14
A.3. Ο ρόλος της σύνδεσης BAFF-BAFFR στα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα.....	18
A.4. Οι πολυμορφισμοί P21R και H159Y του <i>TNFRSF13C</i> /BAFFR	20
B. ΣΚΟΠΟΣ.....	25
<i>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	26
A. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	27
B. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ.....	28
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	30
Γ.1 Απομόνωση Γενομικού DNA	30
Γ.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	31
Γ.3 Πέψη με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες.....	33
Γ.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	36
Γ.5. Ανοσονεφελομετρία για τη μέτρηση της συγκέντρωσης τάξεων και υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών	36
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
Δ.1. Στατιστική ανάλυση.....	37
Δ.2. Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου	38
Δ.3. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό <i>TNFRSF13C</i> -P21R.....	39

Δ.5. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό <i>TNFRSF13C</i> -H159Y	43
Δ.6. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στον ορών ετερόζυγων για τον <i>TNFRSF13C</i> -P21R υγιών μαρτύρων.....	46
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ALL** (acute lymphoblastic leukemia) οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία
- APRIL** (a proliferation inducing ligand) συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
- BAFF** (B-cell activating factor) παράγοντας ενεργοποίησης των B-κυττάρων
- BAFFR** (B-cell-activating factor receptor) BAFF υποδοχέας
- B-ALL** (B-cell acute lymphoblastic leukemia) B οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία
- B-CLL** (B-cell chronic lymphocytic leukemia) B χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
- BCMA** (B-cell maturation antigen) αντιγόνο ωρίμανσης B-κυττάρων
- BCR** (B cell receptor) υποδοχέας του B-κυττάρου
- CRD** (cysteine rich domain) επικράτεια πλούσια σε κυστεΐνη
- CVID** (Common variable immunodeficiency) κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
- HL** (Hodgkin lymphoma) Λέμφωμα Hodgkin
- HSC** (Hematopoietic stem cell) πρόδρομο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο
- Ig** (immunoglobulin) ανοσοσφαιρίνη
- MM** (Multiple Myeloma) πολλαπλούν μυελώματος
- MZ** (marginal zone) οριακή ζώνη
- NF-κB** (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) πυρηνικός παράγοντας-κB
- NHL** (non-Hodgkin Lymphoma) μη - Hodgkin λέμφωμα
- PCR** (Polymerase chain reaction) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms) πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος
- SLE** (Systemic lupus erythematosus) Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
- SS** (Sjögren's syndrome) σύνδρομο του Sjögren
- TAC1** (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin-ligand interactor) διαμεμβρανικός ενεργοποιητής και παράγοντας αλληλεπίδρασης με την CAML
- Tdt** (Terminal deoxynucleotidyl transferase) τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση
- THD** (TNF homology domain) επικράτεια ομολογίας TNF
- TRAF** (TNF receptor-associated factor) παράγοντες που σχετίζονται με υποδοχείς TNF
- WM** (Waldenström's macroglobulinemia) μακροσφαιριναιμία του Waldenström

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο ανοσιακό σύστημα, όπου η εξάπλωση των κυτταρικών πληθυσμών, η απόκρισή τους σε παθογόνα και η επακόλουθη καθοδική ρύθμιση της απόκρισης είναι διαρκής, η ομοιόσταση τους είναι κρίσιμα εξαρτημένη από την ισορροπία μεταξύ σημάτων επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου. Η κυτταροκίνη BAFF (παράγοντας ενεργοποίησης Β-λεμφοκυττάρων) έχει αναγνωριστεί ως ο πιο ισχυρός παράγοντας επιβίωσης των περισσότερων Β-κυττάρων, καθώς μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες του είναι αδιαμφισβήτη η επίδρασή του στην επιβίωση και διαφοροποίηση τους.¹ Η πρωτεΐνη υποδοχέα του BAFF, BAFFR, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III, το γονίδιο *TNFRSF13C* που την κωδικοποιεί εδράζεται στη θέση 22q13.1–13.31 και αποτελείται από 3 εξόνια.² Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με τον συνδέτη και βρίσκεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, το εξόνιο 2 βρίσκεται στο διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα ενώ το εξόνιο 3 βρίσκεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του BAFFR όπου αλληλεπιδρά με τα μόρια TRAF ενεργοποιώντας κυρίως το εναλλακτικό σηματοδοτικό μονοπάτι του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ.¹ Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα BAFFR έχει σαν κύριο ρόλο την προστασία των Β-κυττάρων από την απόπτωση.¹ Μελέτες έχουν δείξει πως κακοήγη Β-κύτταρα από ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL), Non-Hodgkin λέμφωμα (NHL) και πολλαπλούν μύελωμα (MM) εκφράζουν ασυνήθιστα επίπεδα μορίων BAFF, τα οποία προστατεύουν αυτά τα κύτταρα από την αυθόρμητη ή την επαγόμενη από ουσίες απόπτωση.³ Σταθερή απρόσφορη έκφραση του BAFFR στα λευχαιμικά κύτταρα αποκαλύπτει μια στενή σύνδεση της κακοήθους φυσιολογίας αυτών των κυττάρων με το σύμπλοκο BAFF-BAFFR και παρέχει επίσης ένα πρόσθετο μηχανισμό επιβίωσης για τα κύτταρα που το εκφράζουν.⁴ Επίσης, αυξημένα επίπεδα του BAFF έχουν βρεθεί σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να παίζει ένα παθογενετικό ρόλο.⁵ Στο γονίδιο του υποδοχέα BAFFR έχουν χαρακτηριστεί δύο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που οδηγούν σε μη φυσιολογική σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου BAFF-BAFFR. Ο P21R (62C>G/wt, rs77874543), οδηγεί σε αντικατάσταση βάσης που συμβαίνει στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πολυμερισμού του υποδοχέα σε τριμερή επηρεάζοντας την ικανότητα του να δεσμεύει το συνδέτη BAFF. Ο H159Y (475C>T/wt, rs61756766), ταυτοποιήθηκε στο εξόνιο 3 στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα και έχει ως αποτέλεσμα στην ιδιосуστατική ενεργοποίηση του εναλλακτικού σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ.^{2,6}

Η Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (B-ALL) είναι μια κακοήθης διαταραχή των λεμφοειδών προγονικών κυττάρων, επηρεάζει τόσο τα παιδιά, στα οποία παρατηρείται κυρίως μεταξύ των ηλικιών 2 και 5 ετών, όσο και τους ενήλικες στους οποίους ευθύνεται για το 1-2% όλων των περιπτώσεων καρκίνου.^{7,3} Η B-ALL αναπτύσσεται με το μετασχηματισμό των φυσιολογικών προγονικών Β-κυττάρων στο

μυελό των οστών.⁷ Τα προ Β-κύτταρα εξαρτώνται από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους.³ Οι συνδέτες BAFF και APRIL εκφράζονται από τα κύτταρα λευχαιμίας όπως και από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Έχει περιγραφεί πως πρόδρομα λευχαιμικά Β-κύτταρα εκφράζουν απρόσφορα τους υποδοχείς του BAFF-συστήματος, δεδομένου του ότι η φυσιολογική τους έκφραση φάνηκε να περιορίζεται στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια των Β-κυττάρων. Φαίνεται πως η διέγερση των υποδοχέων από το BAFF ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων παρέχοντας έναν μηχανισμό επιβίωσης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση της συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου *TNFRSF13C/BAFFR* σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και στις ομάδες ελέγχου ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα και φυσιολογικών μαρτύρων.

Συμπερασματικά, από την παρούσα εργασία προκύπτει ότι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, P21R και H159Y, δεν είναι αιτιοπαθολογικοί της Β-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, καθώς εντοπίζονται και σε φυσιολογικά άτομα. Ωστόσο, μία οριακή σημαντικότητα έχει παρατηρηθεί όσον αφορά τους παραπάνω πολυμορφισμούς στους ασθενείς με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας, που χρήζει περαιτέρω μελέτης με αύξηση του αριθμού των εξεταζόμενων δειγμάτων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

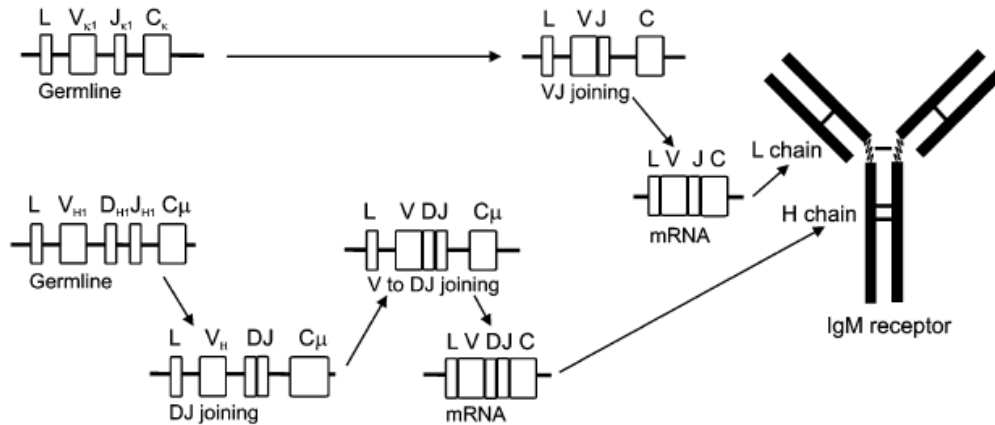
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι οι τελεστές της χυμικής ανοσίας και προστατεύουν, ως μέρος του ανοσιακού συστήματος, ενάντια μιας σχεδόν απεριόριστης ποικιλίας παθογόνων, μέσω της παραγωγής αντισωμάτων. Η χυμική ανοσιακή απάντηση μεσολαβείται από τα αντισώματα, τα οποία έχουν ως στόχο την εξουδετέρωση και την καταστροφή των αντιγόνων που προκάλεσαν την παραγωγή τους. Την εξειδικευμένη ανταπόκριση προς τα διάφορα αντιγόνα, τα Β-κύτταρα την επιτυγχάνουν με την μετάφραση των mRNA των γονιδίων των βαριών (H) και των ελαφρών αλύσων (κ ή λ) της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης τους, εκφράζοντας έτσι λειτουργικούς επιφανειακούς υποδοχείς, BCRs, και εκκρίνουν αντισώματα ικανά να αναγνωρίσουν περισσότερα από $5 * 10^{13}$ διαφορετικά αντιγόνα.^{8,9}

Η διαφοροποίηση και η ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων είναι μια ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα σε δύο κυρίως στάδια, που εντοπίζονται σε διαφορετικούς ιστούς. Κατά το πρώτο στάδιο συμβαίνει η διαφοροποίηση των Β-κυττάρων από το πρόδρομο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο (HSC) προς παρθένα Β-λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών¹⁰ και στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ωρίμανση τους σε μνημονικά και δραστικά κύτταρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα.^{11,12}

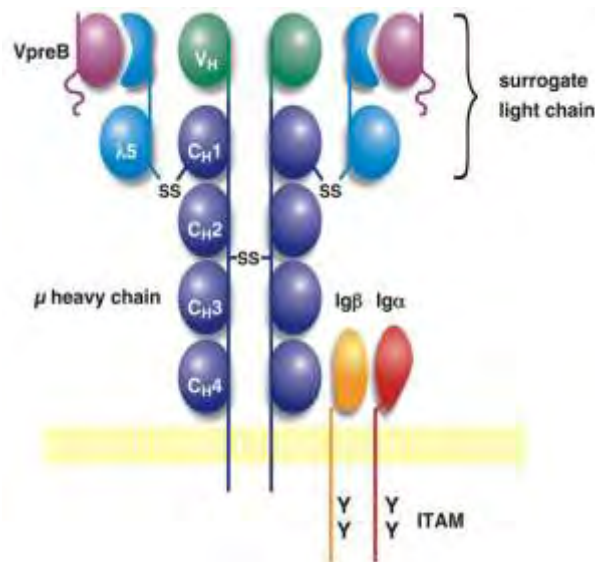
Τα πρόωρα αναπτυξιακά στάδια του Β-κυττάρου συμβαίνουν στον μυελό των οστών και εξαρτώνται από τη λειτουργική διαδικασία της αναδιάταξης γονιδιακών τμημάτων της ανοσοσφαιρίνης.¹³ Πιο συγκεκριμένα στο προ-προ-Β-κύτταρο, αρχικά συμβαίνει μία αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων D_H με τα τμήματα J_H της βαριάς αλύσου, η οποία ακολουθείται από τη σύνδεση ενός V_H τμήματος με το D_HJ_H (**Εικόνα 1**). Η επιτέλεση των γονιδιακών αναδιατάξεων τόσο των βαριών όσο και των ελαφρών αλύσων των ανοσοσφαιρινών των Β-κυττάρων, απαιτεί τη λειτουργία των ρεκομπινασών RAG-1 και RAG-2 οι οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια των σταδίων του προγονικού (προ-προ-Β-κυττάρου) και του πρόδρομου (προ-Β-κυττάρου) και του ενζύμου Tdt (τελική δεοξυνουκλεοτιδική μεταφοράση) που προσθέτει νουκλεοτίδια στις περιοχές συνδέσεων των γονιδιακών τμημάτων. Το κύτταρο αυτό περιέχει κυτταροπλασματικές αλυσίδες μ με σταθερή και μεταβλητή περιοχή, αλλά δεν εκφράζει στην μεμβράνη του λειτουργική IgM, αφού δεν συνθέτει ακόμη ελαφρές αλύσους. Κατά συνέπεια το προ-προ-Β-κύτταρο δεν αναγνωρίζει και δεν απαντά στο αντιγονικό ερέθισμα.



Εικόνα 1: Σύνθεση ανοσοσφαιρινών - ανασυνδυασμός βαριάς και ελαφράς IgM αλύσου

Κατόπιν, τα προ-προ-B-κύτταρα παράγουν δύο σταθερές «προσωρινές» ελαφρές αλύσους, τις πρωτεΐνες λ5 και V_{προB}, οι οποίες συνδέονται μη ομοιοπολικά για να σχηματισθεί μία δομή που προσομοιάζει με την ελαφριά άλυσσο. Οι «προσωρινές» ελαφρές αλύσοι μοιράζονται από κοινού μια δομική ομοιότητα με την ελαφριά άλυσσο και μπορούν να ζευγαρώσουν με την βαριά μ άλυσσο.

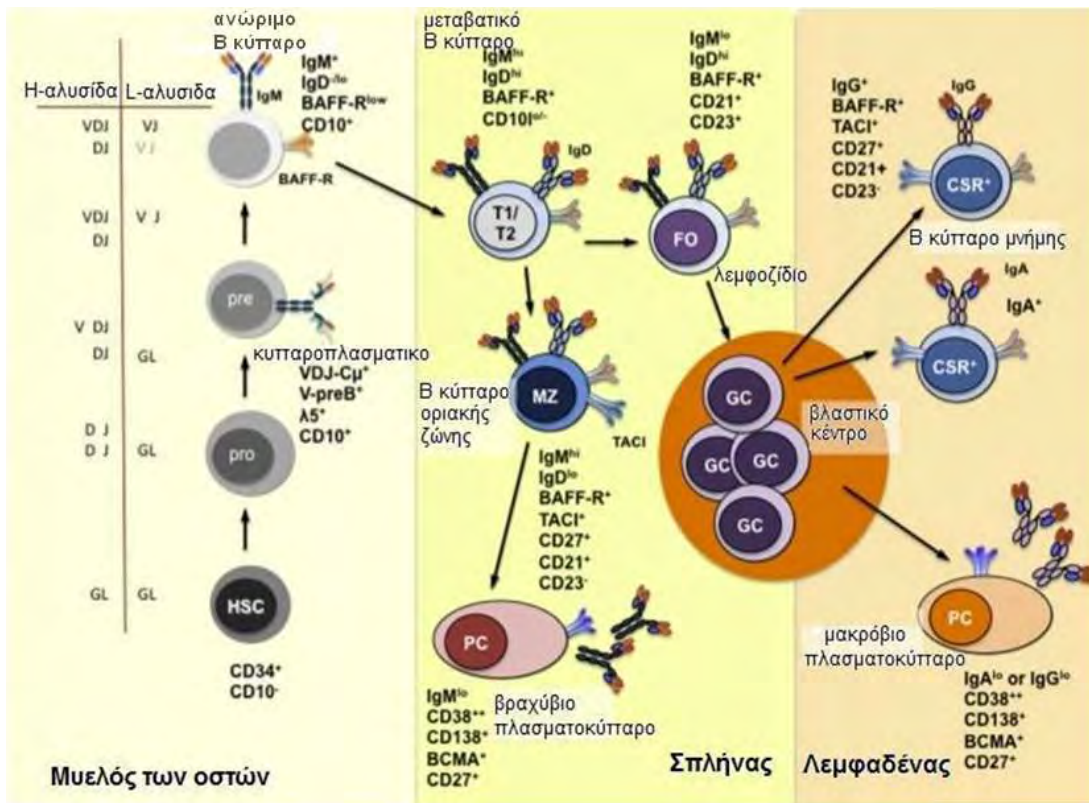
Το μεμβρανικό σύμπλοκο της βαριάς μ αλύσου και της «προσωρινής» ελαφριάς αλύσου, εμφανίζεται στα προ-B-κύτταρα να συνδέεται με το ετεροδιμερές Iga-Igβ, ώστε να σχηματίσει τον προ-B κυτταρικό υποδοχέα (προ-BCR). Ο προ-BCR είναι ικανός να μεταγάγει στο εσωτερικό του κυττάρου σήματα ουσιώδη για την περαιτέρω ανάπτυξη των B-κυττάρων. Μόνο τα προ-B-κύτταρα, που εκφράζουν μεμβρανικές βαριές αλυσίδες μ σε συνδυασμό με τις «προσωρινές» ελαφρές αλυσίδες, είναι ικανά να συνεχίσουν την οδό ωρίμανσης. **(Εικόνα 2)** Η συναρμολόγηση του προ-B-κυτταρικού υποδοχέα σηματοδοτεί την μετάβαση από το προγονικό στο πρόδρομο B-κύτταρο και φαίνεται να μην απαιτεί την παρουσία κάποιου αντιγόνου ή άλλου εξωγενούς συνδέτη. Η φάση αυτή αποτελεί την αντιγονο-ανεξάρτητη φάση της ανάπτυξης των B-κυττάρων.



Εικόνα 2: προ-B κυτταρικός υποδοχέας (προ - BCR)

Στο επόμενο στάδιο η αντικατάσταση των «προσωρινών» ελαφρών αλυσών με τις κ ή λ ελαφρές αλυσούς είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ανάπτυξη των ανώριμων B-κυττάρων.¹⁴ Το προ-B-κύτταρο συνθέτει πλέον κ και λ ελαφρές αλυσούς, που θα ζευγαρώσουν με μία βαριά μ αλυσίδα, σχηματίζοντας πλήρη IgM μόρια που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και τα οποία συνδέονται με τις πρωτεΐνες Igα και Igβ για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό σύμπλοκο του υποδοχέα αντιγόνου BCR.

Η φάση της B-κυτταρικής ανάπτυξης μέσα στο μυελό των οστών φτάνει στο αποκορύφωμά της με την παραγωγή ενός ανώριμου B-κυττάρου που φέρει IgM. Κατόπιν εναλλακτικού ματίσματος του mRNA που προέρχεται από το αναδιαταγμένο γονίδιο της βαριάς αλυσίδας, τα ανώριμα B-κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση μεμβρανικής IgD. Σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης το B-κύτταρο δεν είναι πλήρως λειτουργικό και η επαφή με ένα αντιγόνο επάγει το θάνατό του ή την «ανεργία» του, παρά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του. Η IgD είναι ένας χαρακτηριστικός επιφανειακός δείκτης των ώριμων παρθένων B-κυττάρων, αλλά δεν θεωρείται απαραίτητη ούτε για την ανάπτυξη των B-κυττάρων, ούτε για την αντιγονική τους εξειδίκευση (**Εικόνα 3**).¹⁵



Εικόνα 3: Ανάπτυξη του B-κυττάρου και των B-κυτταρικών υποσυνόλων

Η τυχαία συναρμολόγηση των V, D και J γονιδιακών τμημάτων της ανοσοσφαιρίνης (Ig) στα αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τεράστιου αριθμού διαφορετικών BCRs ικανών να αναγνωρίζουν ποικίλα αντιγόνα. Ωστόσο, αυτή η τυχαία συναρμολόγηση των BCRs μπορεί να οδηγήσει και στο σχηματισμό Ig υποδοχέων που θα είναι είτε αυτοδραστικοί είτε λειτουργικά ανεπαρκείς. Τα κύτταρα που δεν εκφράζουν λειτουργικούς BCRs αποκλείονται από τη δεξαμενή των ώριμων B-κυττάρων με αρνητική επιλογή. Τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να επιβιώσουν μέσω της θετικής επιλογής αν δεν γίνει κατάλληλα η αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφράς αλυσού. Επιπλέον ανώριμα B-κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση απόπτωσης μέσω της αρνητικής επιλογής, αν η ανοσοσφαιρίνη τους (IgM) αναγνωρίσει αυτοαντιγόνα. Η θετική επιλογή με τη μορφή της συνεχούς σηματοδότησης του BCR, είναι σημαντική για την επιβίωση τόσο των ανώριμων όσο και των ώριμων B-κυττάρων.^{16,17}

Από τη στιγμή που θα εκφράσουν πλήρη μεμβρανική IgM και έναν πλήρως λειτουργικό υποδοχέα BCR¹⁸ και κατά συνέπεια θα έχουν ειδικότητα, τα ανώριμα B-κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών προς το αίμα και τους λεμφικά όργανα όπου συνεχίζουν να ωριμάζουν, ακόμη και χωρίς την παρουσία αντιγονικού ερεθίσματος.

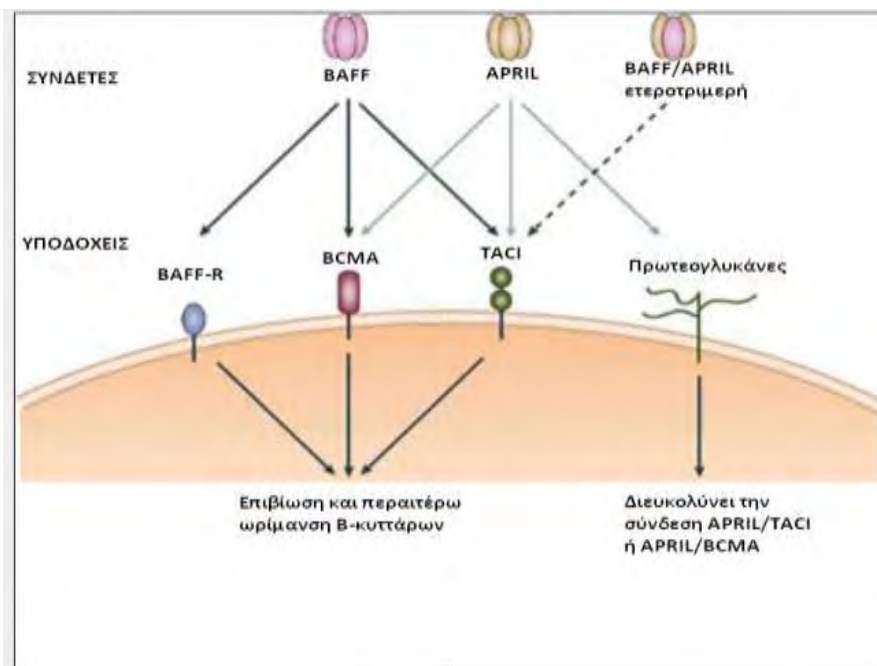
Τα ανώριμα B-κύτταρα εισέρχονται στο σπλήνα μέσα από δύο μεταβατικά στάδια πριν την διαφοροποίησή τους σε παρθένα ώριμα B-κύτταρα.¹⁹ Εκεί εξελίσσονται μέσω των δύο μεταβατικών

σταδίων, T1 και T2, για να γίνουν είτε ώριμα Β-κύτταρα των λεμφοζιδίων που μπορούν να φύγουν από το σπλήνα και να μπουν στην κυκλοφορία είτε να γίνουν μη κυκλοφορούντα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης (MZ) **(Εικόνα 3)**.^{20,21}

Στη συνέχεια τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης αφού έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο και αλληλεπιδράσουν με τα ουδετερόφιλα διαφοροποιούνται σε βραχύβια κύτταρα του πλάσματος, ενώ τα λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα ενεργοποιούνται κατόπιν επαφής τους με το αντιγόνο και τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται μέσω της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου σε Β-κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα.^{11,12} Αδρανή μνημονικά Β-κύτταρα παραμένουν να επανακυκλοφορούν στη περιφέρεια είτε μεταναστεύουν σε ιστούς που έχουν εξαντληθεί από αντιγόνα.²² Εν τω μεταξύ, οι πλασμαβλάστες αναζητούν θέσεις επιβίωσης στο μυελό των οστών για να ολοκληρώσουν τη διαφοροποίησή τους πλασματοκύτταρα, κύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα.²³

A.2. Τα μόρια BAFF και BAFFR και ο ρόλος της σύνδεσής τους (BAFF-BAFFR) στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων

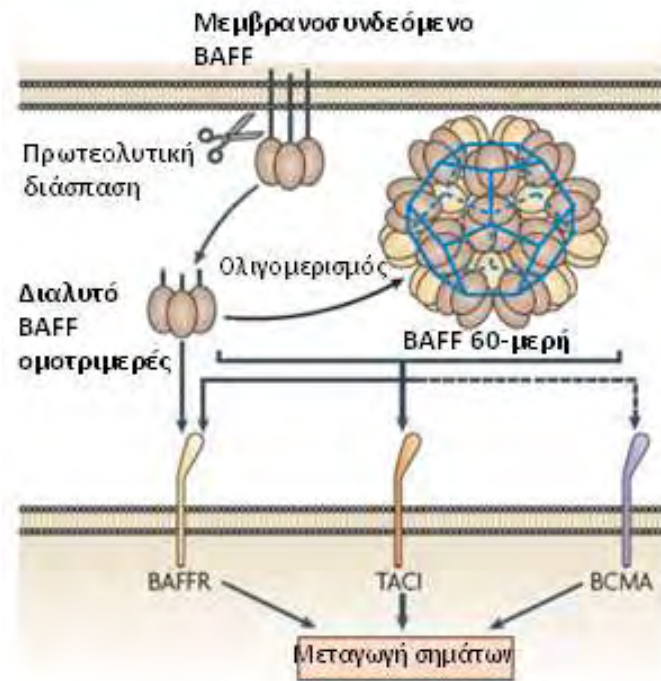
Οι υποδοχείς και οι συνδέτες της υπεροικογένειας του παράγοντα νέκρωσης όγκων, TNF, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην ομοίωση των Β-κυττάρων. Η οικογένεια BLyS, μέρος της υπεροικογένειας των TNF, περιλαμβάνει τρεις υποδοχείς: τον υποδοχέα BLyS 3 (BAFFR, που ονομάζεται επίσης και BR3), τον διαμεμβρανικό ενεργοποιητή και παράγοντα αλληλεπίδρασης με την CAML (TACI)²⁴ και το αντιγόνο ωρίμανσης Β-κυττάρων (BCMA)²⁵ που εκφράζονται κατά κύριο λόγο στα Β-κύτταρα.^{35,26,27} Το TACI εκφράζεται επίσης και σε ορισμένα Τ-κύτταρα.^{35,28,29,30,31,32} Στην οικογένεια BLyS επίσης συμπεριλαμβάνονται και οι συνδέτες BAFF και APRIL (συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό). Οι συγκεκριμένες κυτταροκίνες, οι οποίες εκφράζονται σε ποικίλους τύπους κυττάρων αρχικά συντίθενται ως μεμβράνο-συνδεδεμένα μονομερή που σχηματίζουν τριμερή και διασπώνται μέσω της δράσης μιας φουρίνης σε διαλυτές μορφές.³³ Οι BAFF και APRIL επηρεάζουν την ωρίμανση των Β-κυττάρων καθώς και την επιβίωσή τους σε διάφορα επίπεδα. Ο BAFF δεσμεύεται και από τους τρεις υποδοχείς (BAFFR, TACI και BCMA) με διαφορετική συγγένεια σύνδεσης προς τον καθένα, ενώ ο APRIL δεσμεύεται μόνο στους TACI και BCMA με την ίδια συγγένεια σύνδεσης **(Εικόνα 4)**.



Εικόνα 4: Σύνδεση συνδετών και υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια των Β-κυττάρων

Εκτός από τον BCR ο οποίος παρέχει συνεχώς σήματα επιβίωσης στα Β-κύτταρα, το μόριο BAFF είναι εξαιρετικά σημαντικό κατά τη μετάβαση από το στάδιο T1 στο στάδιο T2 των Β-κυττάρων. Η κυτταροκίνη αυτή, προσδιορίστηκε το 1999 και ραγδαία αναγνωρίστηκε ως ένας ισχυρός παράγοντας επιβίωσης για τα περισσότερα Β-κύτταρα.^{34,35,36,37,38} Σήματα που διαμεσολαβούνται από το BAFF συνεργάζονται με εκείνα που διαμεσολαβούνται από τον BCR για να ρυθμίσουν θετικά την έκφραση συγκεκριμένων στόχων και προϊόντων πολλαπλασιασμού.^{34,37,39,40}

Ο προσδέτης BAFF (γνωστός και ως BLyS, TALL-1, THANK και ztnf4) είναι μια κυτταροκίνη,³⁴ διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, 285 αμινοξέων. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFSF13C* το οποίο χαρτογραφείται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 13q32-34.^{34,37,41} και αποτελείται από 6 εξόνια. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική επικράτεια και τις πλευρικές περιοχές, το εξόνιο 2 τη θέση πρωτεόλυσης από τη φουρίνη και τα εξόνια 3 έως 6 την THD επικράτεια (επικράτεια ομολογίας TNF) στην οποία προσδέονται οι υποδοχείς. Η πρωτεΐνη BAFF είναι βιολογικά δραστική και στη μορφή που είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική επιφάνεια (μοριακού βάρους 31,2 kDa) και στη διαλυτή της μορφή που αποτελείται από 152 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 17 kDa. Η διαλυτή μορφή του BAFF απελευθερώνεται από τη πλασματική μεμβράνη κατόπιν διάσπασης του από πρωτεάσες μέλη της οικογένειας φουρίνης^{34,42} έτσι ώστε να εκκρίνεται από τα κύτταρα ως διαλυτός συνδέτης (**Εικόνα 5**).^{37,36}



Εικόνα 5: Δέσμευση της κυτταροκίνης BAFF στους υποδοχείς της επιφάνειας των Β-λεμφοκυττάρων.

Το BAFF εκφράζεται σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων, μονοκυττάρων, μακροφάγων, ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων, ουδετερόφιλων και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων.^{37,38,43,44} Η έκφραση του αυξάνεται από κάποιες κυτταροκίνες όπως, η ιντερλευκίνη-10, η ιντερφερόνη-α (IFN-α) και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ).^{34,38,45}

Το BAFF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των Β-κυττάρων, καθώς είναι ιδιαίτερα σημαντικό μόριο για την επιβίωση τους στα τελευταία μεταβατικά στάδια κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους στο σπλήνα.⁴⁶ Πρόωρα πειράματα έδειξαν ότι το BAFF επιμηκύνει την επιβίωση των Β-κυττάρων σε καλλιέργειες και, αντίστροφα, *in vivo* αναστολή του BAFF οδηγεί γρήγορα στην απώλεια των Β-κυττάρων.^{47,48} Ο μυελός των οστών σε ποντίκια με έλλειψη BAFF *-/-* παράγει και απελευθερώνει φυσιολογικά ανώριμα Β-κύτταρα, αλλά τα Β-κύτταρα αυτά αποτυγχάνουν να μεταβούν από το στάδιο τύπου 1 (T1) στο στάδιο τύπου 2 (T2) στο σπλήνα.^{49,50} Ως αποτέλεσμα, BAFF *-/-* ζώα είναι ουσιαστικά χωρίς ώριμα Β-κύτταρα και Β-κύτταρα οριακής ζώνης και είναι ανεπαρκή σε χυμικές αποκρίσεις. Είναι ενδιαφέρον, ότι απουσία BAFF (*-/-*) διατηρούνται τα Β1 κύτταρα.^{49,50} Συνεπώς, τα T2 Β-κύτταρα εξαρτώνται από τη δραστηριότητα του BAFF *in vitro*, σύμφωνα με την ιδέα ότι η έλλειψη των σημάτων επιβίωσης του BAFF, τα οδηγεί σε θάνατο *in vivo*.⁵¹ Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν έναν αναστολέα του BAFF (TACI-Ig) εμποδίζουν την ωρίμανση των Β-κυττάρων μεταξύ των T1 και T2 σταδίων.^{50,52}

Μελέτες δείχνουν ότι σήματα που προέρχονται από τον BCR αλλά και από το BAFF απαιτούνται για την ωρίμανση των Β-κυττάρων και την διατήρηση των ώριμων Β-κυττάρων στην περιφέρεια.^{16,17} Το

BAFF τριμερίζεται και δεσμεύεται από τον BAFFR στην κυτταρική επιφάνεια όπου εσωτερικεύεται με ενδοκύτωση μεσολαβούμενης του υποδοχέα.^{53,54} Η έλλειψη του BAFF ή του BAFFR οδηγεί σε ανεπάρκεια Β-κυττάρων παρά την φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα BCR.28 Συγκεκριμένα, ο BAFFR απαιτείται για την επιβίωση των μεταβατικών Β-κυττάρων στο σπλήνα, συνεπώς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο προσδιορισμός των ενδοκυττάρων μεσολαβητών αυτής της απόκρισης.

Ο υποδοχέας BAFFR κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF13C* το οποίο στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 22q13.1-13.31 και αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III, 184 αμινοξέων. Δομικά, ο BAFFR περιέχει μία εξωκυττάρια περιοχή CRD που αλληλεπιδρά με τον συνδέτη και μια ενδοκυττάρια περιοχή αναγνώρισης για το μόριο TRAF3. Όπως με τα περισσότερα μέλη της υπερικογένειας TNF, η πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα ξεκινά αλληλεπιδράσεις με ένα ή περισσότερα μόρια TRAF (παράγοντες που σχετίζονται με τους TNF υποδοχείς),^{55,56} που οδηγούν σε καταρράκτες καθοδικής σηματοδότησης που μπορούν να διαμορφώσουν την επιβίωση και τη διαφοροποίηση.⁵⁷ Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις με το TRAF3, μεσολαβούμενες από τον BAFFR, ξεκινούν και διατηρούν τη μετέπειτα σηματοδότηση.⁵⁵ Οι σηματοδοτικοί αυτοί στόχοι περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση της NIK κινάσης, την ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κΒ και μετέπειτα την έκφραση πολλαπλών πρωτεϊνών μελών της οικογένειας Bcl-2. Δεδομένου ότι η υπερέκφραση της διαγονιδιακής Bcl-2 σε BAFFR *-/-* ποντίκια επέτρεπε την ανάπτυξη των ώριμων Β-κυττάρων.⁵⁸

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των Β-κυττάρων, ο BAFFR εκφράζεται αρχικά στα ανώριμα Β-κύτταρα στο μυελό των οστών.⁵⁹ Η έκφραση του BAFFR διατηρείται και όταν τα μεταβατικά Β-κύτταρα διαφοροποιούνται σε Β-κύτταρα της οριακής ζώνης και σε Β-κύτταρα των λεμφοζιδίων.^{56,60}

Η έκφραση του BAFFR επάγεται κατόπιν της ενεργοποίησης του BCR.⁶¹ Η πρωτεΐνη BAFFR είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση των Β-κυττάρων και την ωρίμανσή τους στο σπλήνα, καθώς η κύρια λειτουργία της είναι να παρέχει σήματα επιβίωσης στα ανώριμα και στα ώριμα Β-κύτταρα, ρυθμίζοντας έτσι τον αριθμό των λεμφοζιδιακών Β-κυττάρων.^{62,34,51} Ο ρόλος του υποδοχέα BAFFR στην επιβίωση των Β-κυττάρων αποδείχθηκε πρώτα σε ποντίκια.²⁶²⁶ Αλληλεπιδράσεις BAFF-BAFFR έχουν αποδειχθεί ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση των πρωτογενών Β-κυττάρων, όπως φαίνεται καθαρά και σε *knock-out* και σε μεταλλαγμένα ποντίκια.^{63,26} Πιο συγκεκριμένα, τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν σημαντική μείωση στον αριθμό των Β-κυττάρων, ανικανότητα μετάβασης στο στάδιο T2, μειωμένα επίπεδα Ig και μειωμένες θυμοεξαρτώμενες και θυμοανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις.^{64,26⁶⁵} Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν πως η σύνδεση BAFF-BAFFR είναι η βασική κινητήρια δύναμη για την επιβίωση των Β-κυττάρων και την ωρίμανσή τους.^{64,26⁶⁵}

Πλην του ρόλου που διαδραματίζει η πρωτεΐνη BAFFR ως μεμβρανικός υποδοχέας, πρόσφατα ανακαλύφθηκε από τους Fu και συν., η παρουσία του στον πυρήνα των Β-κυττάρων και η δράση του ως

μεταγραφικός παραγόντας. Στους υποκινητές αρκετών γονιδίων (όπως των BAFF, CD154, Bcl-xL, IL-8 και Bfl-1), έχει βρεθεί θέση πρόσδεσης του BAFFR, γεγονός που υποδηλώνει τη σπουδαία δράση που διαδραματίζει η πρωτεΐνη στην επιβίωση τόσο φυσιολογικών, όσο και νεοπλασματικών Β-κυττάρων μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.⁶⁶

A.3. Ο ρόλος της σύνδεσης BAFF-BAFFR στα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα.

Έχει δειχθεί όμως πως συνεχιζόμενη υπερέκφραση του BAFF σχετίζεται με την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων και εμφανών αυτοάνοσων ασθενειών.⁴⁸ Η υπερβολική παραγωγή του BAFF οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρών αυτοάνοσων διαταραχών παρόμοιες με το Συστημικό Ερυθηματώδη Λύκο (SLE) και το Σύνδρομο Sjögren (SS).^{67,68} Επίσης, το BAFF διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην προώθηση της επιβίωσης τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών Β-κυττάρων. Κακοήθειες Β-κυττάρων μπορεί να προκύψουν σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης των Β-κυττάρων.⁶⁹ Μια σειρά μελετών έχουν περιγράψει το BAFF αλλά και το APRIL, ως πιθανούς συντελεστές σε κακοήθειες των ώριμων Β-κυττάρων όπως το NHL^{70,71,72} και τη Β-CLL^{73,74} και των πλασματοκυττάρων όπως είναι το MM^{75,76} και η μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM)⁷⁷ Η ικανότητα των BAFF και APRIL να δεσμεύονται στην επιφάνεια των κακοήθων Β-κυττάρων φαίνεται να έχει λειτουργική σημασία.

Μελέτες έδειξαν πως ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κακοήθων Β-κυττάρων εξαρτώνται και από κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών, του σπλήνα και των λεμφαδένων. Στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών υποστηρίζουν την ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων με την παραγωγή διαλυτών παραγόντων όπως οι CXCL12, ιντερλευκίνη-7 και οι Wnt πρωτεΐνες, καθώς και μέσω της προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου που προκαλείται από μόρια όπως τα VLA-4/VCAM1.^{78,79,80} Παλιότερα, είχε δειχθεί πως τα κύτταρα του στρώματος ασκεί μία προστατευτική δράση που συμβάλλει στην φτωχή απόκριση των λευχαιμικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.^{81,82,83}

Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί ότι εκτός από τα φυσιολογικά Β-κύτταρα και τα κακοήθη Β-κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα BAFFR και έτσι η σηματοδότηση μεσολαβούμενη από το BAFF συμμετέχει στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους.⁸⁴ Πράγματι, αρκετές μελέτες^{70,85} έχουν δείξει ότι το BAFF παράγεται σε περίσσεια σε ασθενείς με διάφορες κακοήθειες των Β-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, Πολλαπλούν Μυέλωμα, Λέμφωμα Hodgkin (HL), και διάφορα είδη Non-Hodgkin Λεμφωμάτων, είτε από τα ίδια τα κύτταρα του όγκου ή από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος τους, είτε και από τα δύο και συμπεριφέρεται ως αυτοκρινής και παρακρινής παράγοντας επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών Β-κυττάρων,^{86, 76, 75, 87, 88, 89, 90}

προστατεύοντάς τα από την απόπτωση είτε αυτή συμβαίνει αυθόρμητα είτε είναι επαγόμενη από φάρμακα^{91,75}

Οι οξείες και χρόνιες λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές αντιπροσωπεύουν τις πιο κοινές αιματολογικές κακοήθειες στις δυτικές χώρες, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) είναι πιο συχνή στην παιδική ηλικία ενώ η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και τα Non-Hodgkin λεμφώματα στην ενήλικη ζωή. Στην πλειοψηφία τους προέρχονται από τον μετασχηματισμό και την κλωνική επέκταση των B-κυττάρων σε διακριτά στάδια της διαφοροποίησης τους.^{7,92}

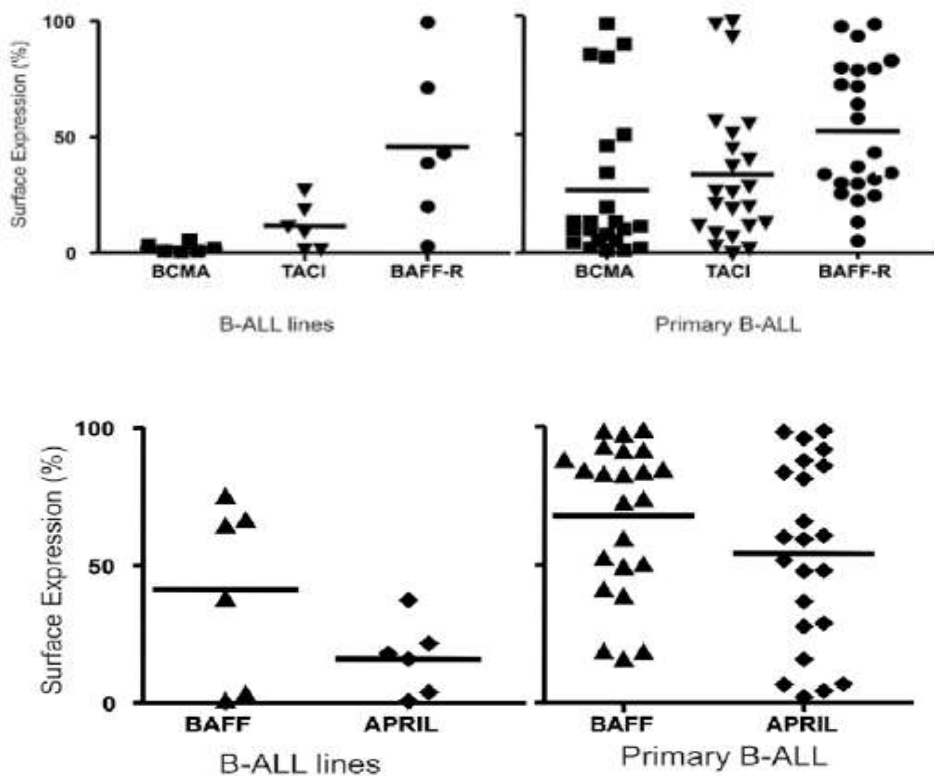
Η B-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (B-ALL) είναι μια κακοήθης διαταραχή των λεμφοειδών προγονικών κυττάρων που προκύπτει από τον μετασχηματισμό ενός προγονικού B-κυττάρου στο μυελό των οστών. Ευθύνεται για το 1-2% όλων των περιπτώσεων καρκίνου των ενηλίκων (περίπου 15% των περιπτώσεων λευχαιμίας), αλλά αποτελεί το 25% όλων των παιδιατρικών καρκίνων (περίπου 80% των περιπτώσεων λευχαιμίας) και αντιπροσωπεύει την πιο συχνή κακοήθεια στην παιδική ηλικία.^{7,93}

Πρόδρομα κύτταρα της B-ALL εξαρτώνται από κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους.^{94,95} Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσον οι περιοχές του μυελού των οστών πλούσιες σε BAFF και APRIL (όπως φαίνεται για τα B-κύτταρα του πλάσματος),⁹⁶ εμπλέκονται στη ρύθμιση των B-ALL κυττάρων. Η έκφραση των BAFF και APRIL από λευχαιμικά πρόδρομα B-κύτταρα υποδηλώνει την εμπλοκή της σηματοδότησης του BAFF-συστήματος, μέσω επαφής κυττάρου-κυττάρου ή μέσω αυτοκρινών μηχανισμών.

Η έκφραση του BAFFR αναφέρθηκε να περιορίζεται σε πιο ώριμα B-κύτταρα, ξεκινώντας από το T1 μεταβατικό στάδιο των B-κυττάρων.⁹⁷ Έτσι, ο BAFFR δεν είναι παρών σε προγονικά ή πρόδρομα B-κύτταρα ποντικού.⁹⁸ Σε συμφωνία με την προτεινόμενη έλλειψη σημασίας αυτού του υποδοχέα για την πρόωρη ανάπτυξη των B-κυττάρων, τα ποντίκια που στερούνται BAFFR ή BAFF έχουν κανονικούς πληθυσμούς προγονικών ή πρόδρομων B-κυττάρων.^{49,26} Επειδή τα Ρh-θετικά κύτταρα B-ALL τυπικά αντιπροσωπεύουν μετασχηματισμένα προ-B-κύτταρα τα οποία δεν παράγουν επιφανειακή IgM, η BAFF-BAFFR σηματοδότηση δεν θα πρέπει να αναμένεται να παίζει ρόλο στην επιβίωση ή την ανάπτυξη τους.³

Έχει παρατηρηθεί ότι τα πρόδρομα λευχαιμικά B-κύτταρα εκφράζουν απρόσφορα τους υποδοχείς του BAFF-συστήματος και ότι οι συνδέτες τους BAFF και APRIL εκφράζονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών καθώς και από τα κύτταρα λευχαιμίας. Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε την έκφραση του BAFFR στα B-ALL κύτταρα και έδειξε ότι η διέγερση μέσω του BAFF ενίσχυε την επιβίωση των κυττάρων λευχαιμίας, εξασθενώντας τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του nilotinib (αναστολέα κινάσης) σε Ρh-θετικές λευχαιμίες.³ Επίσης, οι Μαΐα και συν.,⁹⁹ έδειξαν ότι τα πρωταρχικά πρόδρομα B-κύτταρα B-ALL εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς του BAFF-συστήματος, BCMA, TACI και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τον BAFFR και πως η συγκέντρωση των μορίων διαλυτού BAFF είναι σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με λευχαιμία συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας (**Εικόνα 6**). Η διέγερση των

υποδοχέων από το BAFF ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και οδηγεί σε σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης, αποκαλύπτοντας ένα νέο ρόλο του BAFF-συστήματος στη βιολογία της B-ALL.⁹⁹ Επομένως, η έκφραση λειτουργικών υποδοχέων του BAFF-συστήματος από B-ALL κύτταρα ήταν απροσδόκητη δεδομένου του ότι η φυσιολογική τους έκφραση φάνηκε να περιορίζεται στα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια των B-κυττάρων.^{65,99}



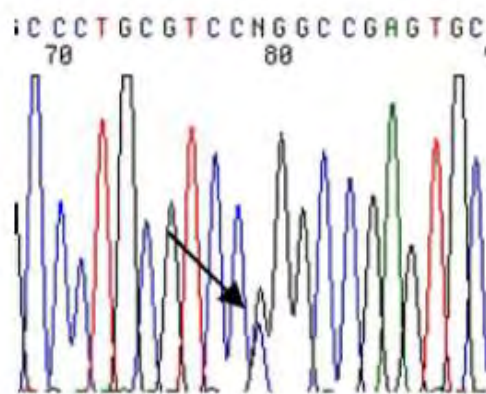
Εικόνα 6: έκφραση των υποδοχέων και των συνδετών του BAFF-συστήματος από τα πρόδρομα B-κύτταρα λευχαιμίας

A.4. Οι πολυμορφισμοί P21R και H159Y του *TNFRSF13C/BAFFR*

Οι Losi και συνεργάτες,² έπειτα από την ανάλυση αλληλούχισης σε όλο το γονίδιο *TNFRSF13C/BAFFR*, περιέγραψαν μεταλλάξεις, αλλά και πολυμορφισμούς. Μελετώντας το γονίδιο του BAFFR σε ασθενείς με CVID, περιέγραψαν μεταλλάξεις, αλλά και πολυμορφισμούς. Οι νέες παραλλαγές ήταν επίσης παρόντες σε υγιείς μάρτυρες και στους υγιείς γονείς των ασθενών και βρέθηκε πως δεν έχουν παθολογικό ρόλο καθώς δεν επηρεάζουν την έκφραση του BAFFR ούτε σε επίπεδο mRNA ούτε σε πρωτεϊνικό επίπεδο, γεγονός που υποδηλώνει ότι αντιπροσωπεύουν νέα πολλαπλά αλληλόμορφα του BAFFR γονιδίου, που μόνα τους δεν είναι αιτιολογικοί παράγοντες της εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, η ετεροζυγωτία αυτών των πολυμορφισμών έχει εντοπιστεί επίσης σε υγιείς μάρτυρες, υποδεικνύοντας πως

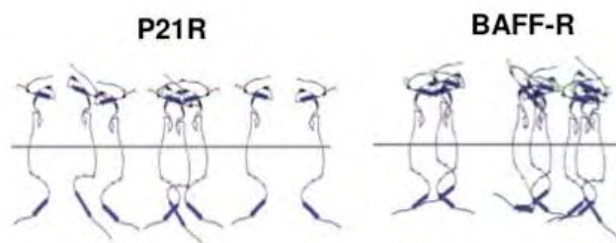
η παρουσία αυτών των πολυμορφισμών δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του κλινικού φαινοτύπου.²

Η πρώτη παραλλαγή προσδιορίστηκε στο πρώτο εξώνιο του γονιδίου του BAFFR, σε ασθενείς με COVID, με συχνότητα περίπου τρεις φορές υψηλότερη σε σύγκριση αυτής των υγιών μαρτύρων (10.4% έναντι 3.5%, αντίστοιχα). Βρέθηκε σε όλα τα δείγματα σε ετερόζυγη κατάσταση και συνίσταται από μια αντικατάσταση γουανίνης από κυτοσίνη στη θέση 62 (**Εικόνα 7**), με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος της προλίνης άγριου τύπου με μία αργινίνη στο κωδικόνιο 21 (P21R).²



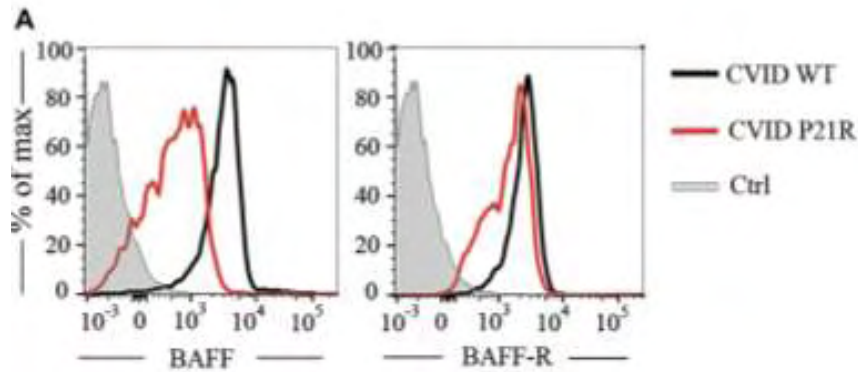
Εικόνα 7: Πολυμορφισμός P21R (62C>G/wt, rs77874543)

Η αλλαγή του αμινοξέος συμβαίνει στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης του υποδοχέα, όπου φυσιολογικά προσδέεται ο συνδέτης BAFF. Παρουσία όμως του πολυμορφισμού αυτού, ο υποδοχέας δεν είναι ικανός να σχηματίσει ομοτριμερή και έτσι το BAFF δεν μπορεί να προσδεθεί φυσιολογικά για να επάγει την σηματοδότηση. Άρα ο πολυμορφισμός P21R έχει μια αρνητική δράση αποτρέποντας την επίτευξη της πρόσδεσης του συνδέτη στον υποδοχέα για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος (**Εικόνα 8**).²



Εικόνα 8: Σχηματισμός τριμερών του υποδοχέα BAFFR χωρίς τον πολυμορφισμό P21R (δεξιά) και αδυναμία τριμερισμού του λόγω του πολυμορφισμού (αριστερά).

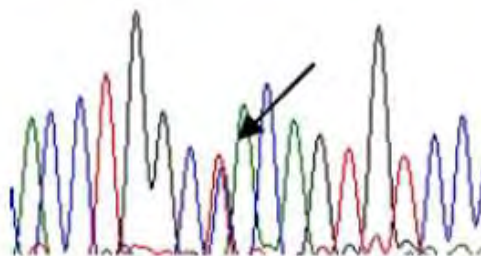
Χαρακτηριστικά όπως βλέπουμε και στην εικόνα 9, παρουσία του πολυμορφισμού (είτε σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία) ο συνδέτης BAFF αδυνατεί να προσδεθεί στον υποδοχέα BAFFR σε ασθενείς με CVID συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, ενώ η έκφραση του υποδοχέα BAFFR φαίνεται να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από την παρουσία του πολυμορφισμού.¹⁰⁰



Εικόνα 9: Ο πολυμορφισμός P21R και ο ρόλος της αντικατάστασης αμινοξέος στη δημιουργία BAFFR τριμερών

Στο τρίτο εξώνιο του BAFFR, οι Losi και συν.,² παρατήρησαν μια νέα παραλλαγή στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης του υποδοχέα BAFFR. Σ' αυτήν πραγματοποιείται μια αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 475 (**Εικόνα 10**), οδηγώντας στην αλλαγή του αμινοξέος της ιστιδίνης άγριου τύπου με μια τυροσίνη στο κωδικόνιο 159 (H159Y).

A C C T G G C N A C A G T G T C C I
168 170



Εικόνα 10: Πολυμορφισμός H159Y (475C>T/wt, rs61756766)

Η παραλλαγή αυτή βρέθηκε σε έναν ασθενή, τον ανοσολογικά φυσιολογικό πατέρα του και σε έναν υγιή μάρτυρα, με συχνότητα αλληλομόρφου περίπου 1%, ενώ και στα τρία παραπάνω δείγματα, ο πολυμορφισμός αυτός (H159Y) βρέθηκε να συνδέεται και με τον πολυμορφισμό στο εξώνιο 1 (P21R).²

Εκτός από περιπτώσεις CVID ασθενών, τα επίπεδα του BAFF βρέθηκαν αυξημένα και σε ορό ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα τα οποία συσχετίστηκαν με μια επιθετική πρόγνωση και μια φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία.⁸⁸ Υπάρχουν επίσης αυξανόμενα γενετικά στοιχεία, που υποδηλώνουν μια συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης των ανθρώπινων νοσημάτων με γενετικές παραλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν το BAFF και τους υποδοχείς του. Ο H159Y προσδιορίστηκε και από τους Hildebrand και συν.,⁶ σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη τους, όπου εξέτασαν σε μια ομάδα ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα τα γονίδια των υποδοχέων (BAFFR, TACI και BCMA) και των συνδετών (BAFF και APRIL) με σκοπό να προσδιορίσουν νέες γενετικές παραλλαγές που μπορεί να σχετίζονται με κίνδυνο ανάπτυξης της συγκεκριμένης νόσου.

Η κρυσταλλική δομή ενός θραύσματος 24-καταλοίπων από την κυτταροπλασματική επικράτεια του BAFFR όπου δεσμεύεται το σύμπλοκο TRAF3 έχει προσδιοριστεί από τους Ni και συνεργάτες¹⁰¹ και η δομή του αποκάλυψε ότι η ακολουθία 162-PVPAT-166 στο BAFFR χρησιμεύει ως το μοτίβο αναγνώρισης για τη δέσμευση του TRAF3. Επειδή ο πολυμορφισμός H159Y βρίσκεται στην ισχυρά συντηρημένη κυτταροπλασματική περιοχή του BAFFR, που γειτνιάζει με το μοτίβο πρόσδεσης του μορίου TRAF3 στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, PVPAT (**Εικόνα 11**), οι Hildebrand και συν., εξέτασαν εάν ο H159Y οδηγεί σε αλλαγή της BAFFR σηματοδότησης που επάγεται από το BAFF.⁶ Τα αποτελέσματα τους υποδηλώνουν ότι η αύξηση της δραστηριότητας του NF-κΒ που επάγεται από το BAFF_{H159Y} μπορεί να είναι, εν μέρει, αποτέλεσμα της αυξημένης προσέλευσης των μορίων TRAFs. Η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου NHL¹⁰² και η ικανότητα του BAFFR_{H159Y} να ενεργοποιήσει αυτό το σηματοδοτικό καταρράκτη θα μπορούσε να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην ενίσχυση της ενεργοποίησης του NF-κΒ σε ένα υποσύνολο ασθενών.⁶ Είναι ενδιαφέρον πως η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του NF-κΒ λειτουργεί ως μοριακή υπογραφή που έχει αναφερθεί σε αρκετές κακοήθειες Β-κυτταρικού τύπου, συμπεριλαμβανομένων των B-ALL κυττάρων.^{103,104}



Εικόνα 11: Προσδιορισμός του H159Y SNP. Μία πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθίας αμινοξέων του BAFFR σε δείγματα θηλαστικών, δείχνοντας την εξελικτική διατήρηση του κυτταροπλασματικού τμήματος και το σημείο της αντικατάστασης της ιστιδίνης (H) από τυροσίνη (Y) στο κωδικόνιο 159. Τα σύμβολα κάτω από την ευθυγράμμιση αλληλουχίας υποδεικνύουν πως τα υπολείμματα σε όλη είδη κωδικοποιούν για ταυτόσημα (*), συντηρημένα (:), ή ημισυντηρημένα (.) αμινοξέα.

Η αυξημένη συχνότητα του μεταλλαγμένου υποδοχέα BAFFR_{H159Y} σε ετερόζυγη κατάσταση που εντοπίστηκε σε ασθενείς NHL (6.2%), υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει μια σπάνια παραλλαγή που αυξάνει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη Β-κυτταρικών λεμφωμάτων.⁶

Αξίζει να σημειωθεί πως ο H159Y πολυμορφισμός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό του πρώτου εξωνίου του BAFFR καθώς ανιχνεύεται πάντα σε συσχέτιση με τον P21R. Με την συνεχή ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ, που επάγεται από τη σηματοδότηση του μεταλλαγμένου υποδοχέα BAFFR_{H159Y}, παρατηρείται αυξημένη ενίσχυση του σήματος του μονοπατιού του NF-κΒ, έχοντας ως αποτέλεσμα να αντιρροπείται η αρνητική δράση του P21R από τον H159Y στους ασθενείς που είναι φορείς και των δύο πολυμορφισμών.²

B. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση της συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου TNFRSF13C/BAFFR σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και στις ομάδες ελέγχου ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα και φυσιολογικών μαρτύρων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Η μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13C/BAFFR* πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με Β-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού και χαμηλού βαθμού κακοήθειας και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Τα δείγματα των ασθενών με υψηλού βαθμού αιματολογικές κακοήθειες, προήλθαν από την εθνική βάση δεδομένων ασθενών NARECHEM του Εργαστηρίου Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Συγκεκριμένα, το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας περιελάμβανε 314 δείγματα DNA ασθενών με Β οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (αναλογία ανδρών/γυναικών: 170/144, μέση ηλικία: 5.4 έτη, ηλικιακό εύρος: 0.5 έως 20 έτη). Ως ομάδες ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν η ομάδα των υγιών δοτών και οι ομάδες των ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού και χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Αναλυτικά, μελετήθηκαν 379 δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες (αναλογία ανδρών/γυναικών: 207/172, μέση ηλικία: 52.9 έτη, ηλικιακό εύρος: 0.5 έως 92 έτη), 56 δείγματα DNA ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (αναλογία ανδρών/γυναικών: 43/13, μέση ηλικία: 9 έτη, ηλικιακό εύρος: 2.6 έως 17.2 έτη) και υλικό 30 δειγμάτων περιφερικού αίματος ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (αναλογία ανδρών/γυναικών: 19/11, μέση ηλικία: 75 έτη, ηλικιακό εύρος: 51 έως 91 έτη). Τα δείγματα ασθενών Non-Hodgkin λεμφώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας καθώς και οι ενήλικες υγιείς δότες, ήταν στην διάθεση μας από συλλογή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα).

Στο πλαίσιο διαφόρων μελετών που έχουν λάβει μέρος στο εργαστήριο σε κάποια από τα δείγματα των υγιών μαρτύρων, υπήρχαν δεδομένα μετά από πλήρη ανοσοφαινοτυπικό και ορολογικό τους έλεγχο.

Β.ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός εξοπλισμός και αναλώσιμα υλικά καθώς και μία σειρά αντιδραστηρίων, διαθέσιμων από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους Πίνακες 1 και 2 αντίστοιχα.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά εργαστηριακού εξοπλισμού και αναλώσιμων υλικών.

Εξοπλισμός και αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2 μL	0,2-2 μL pipette, sterile	F144801	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10 μL	1-10 μL pipette, sterile	F144802	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20 μL	2-20 μL pipette, sterile	F123600	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100 μL	20-100 μL pipette, sterile	F123615	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200 μL	50-200 μL pipette, sterile	F123601	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000 μL	200-1000 μL pipette, sterile	F123602	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 μL	10 μL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 μL	1000 μL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL	200 μL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	683201	GREINER BIO-ONE, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1.5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile	430791	Corning, USA
Sterile Disposable Scalpel	Shangai Medex International	GRF-2980	MedExSupply, USA

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Kit εκχύλισης DNA	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen, UK
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMOS.A, Greece
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂	PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂)	-	BIORON, Germany
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	100Mm MgCl ₂	P041311-M	BIORON, Germany
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP	P/N 55082	Invitrogen, UK
	100mM dCTP	P/N 55083	
	100mM dGTP	P/N 55084	
	100mM dTTP	P/N 55084	
DMSO	Dimethyl sulfoxide> 99,5%	D5879-1L	Sigma-Aldrich, EU
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON, Germany
Περιοστική ενδονουκλεάση EagI	EagI Restriction Enzyme	R0505S	New England Biolabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση MscI	MscI Restriction Enzyme	R0534S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα TBE	TBE buffer (10X)	A0972, 1000	Applichem, USA
Αγαρόζη	peqGOLD Universal- Agarose	35-1020	Peqlab, Deutschland
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	25-2010	PEQLAB, Deutschland
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion, UK

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Γ.1 Απομόνωση Γενομικού DNA

Για την απομόνωση του γενομικού DNA τόσο των ασθενών όσο και των υγιών μαρτύρων που αναφέρθηκαν παραπάνω, από περιφερικό αίμα ή/ και μυελικό ελαιώρημα, χρησιμοποιήθηκε το kit PureLink® Genomic DNA που είναι εμπορικά διαθέσιμο από την εταιρία Invitrogen. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας ήταν η απομόνωση καθαρού DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, αφού είχαν απομακρυνθεί πρωτεΐνες, άλατα και άλλα μόρια που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ανασταλτικά στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, σε σωληνάρια φυγοκέντρησης των 1.5mL μεταφέρθηκαν 200μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό παράγοντα K₃EDTA. Στη συνέχεια εναποτέθηκαν 20μL πρωτεΐνάσης K, για την απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA και 20μL RNAάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστέθηκαν 200μL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55°C για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο. Έπειτα προστέθηκαν 200μL αιθανόλης 96-100% που σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης επιτρέπει υψηλό βαθμό πρόσδεσης του DNA στη στήλη και το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Ακολούθησαν μία φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό και δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό και στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τα άχρηστα προϊόντα από τη λύση των κυττάρων (πρωτεΐνες, RNA και ενζυμικοί αναστολείς). Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1.5mL όπου και προστέθηκαν 100μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) σε αυτή. Μετά από επώαση 1 λεπτού, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 1 λεπτό, η τελική συγκέντρωση του DNA ανερχόταν περίπου στα 50-200ng/μL. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους 2 – 8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως στην δική μας περίπτωση.

Γ.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction PCR), με εκκινητές προερχόμενους από τη διεθνή βιβλιογραφία,² με σκοπό την ενίσχυση των 2 εκ των τριών εξωνίων του γονιδίου *TNFRSF13C* (εξώνια 1 και 3). Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ένα μικρό σωληνάριο PCR σε τελικό όγκο μείγματος 30μL το οποίο περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.01% ζελατίνη), 100mM MgCl₂, 2.5mM από κάθε dNTP, 50pmol/μL από κάθε εκκινητή (πρόσθιο και οπίσθιο) (10μL) (Thermo Fisher Scientific), DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε ποσοστό 12%, 0.8μL του ενζύμου Taq πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H₂O. Το DMSO απαιτείται γιατί το ποσοστό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων G-C στα εξώνια είναι μεγαλύτερο από 60% και η παρουσία αυτής της ένωσης βοηθά στην καλύτερη αποδιάταξη των δύο αλυσίδων DNA της διπλής έλικας. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ετοιμασία ενός κύριου μείγματος για την PCR και ενός μείγματος Taq πολυμεράσης δίνονται στους Πίνακες 3 και 4 αντίστοιχα.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler της Applied Biosystem ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονταν ένα σωληνάριο μάρτυρας με dH₂O αντί γενετικού υλικού (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Η νουκλεοτιδική σύσταση και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο PCR καθώς και το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 ενώ οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 3: Υλικά κύριου μείγματος για την ενίσχυση των εξωνίων 1 & 3 του BAFFR.

	Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
Εξώνιο 1 του BAFFR	dH ₂ O	199.3
	10xPCR Buffer	50
	dNTPs (2.5mM)	40
	MgCl ₂ (100mM)	7.5
	Primer F (50 pmol/μL)	10
	Primer R (50pmol/μL)	10
	DMSO 12%	43.2

Πίνακας 3 (συνέχεια): Υλικά κύριου μείγματος για την ενίσχυση των εξωνίων 1 & 3 του BAFFR.

	Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
Εξώνιο 3 του BAFFR	dH ₂ O	192.5
	10xPCR Buffer	50
	dNTPs (2.5mM)	40
	MgCl ₂ (100mM)	7.5
	Primer F (50 pmol/μL)	10
	Primer R (50pmol/μL)	10
	DMSO 12%	50

Πίνακας 4: Υλικά μείγματος Taq πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
dH ₂ O	50
Taq polymerase	2.4

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις PCR.

	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
Εξώνιο 1	Πρόσθιος: 5' - GTTCTCCCCGAGCTGCCG - 3'	19	223
	Οπίσθιος: 5' - AGCCTCAGTCCCCGAGCT - 3'	19	
Εξώνιο 3	Πρόσθιος: 5' - CCTCCAGAGGAGTCTTCTAG - 3'	20	323
	Οπίσθιος: 5' - TCCAAGCCCCTGACTGGG - 3'	18	

Πίνακας 6: Οι συνθήκες των PCR για την ενίσχυση των εξωνίων του BAFFR.

Πολυμορφισμοί				
P21R (62C>G/wt, rs77874543)			H159Y (475C>T/wt, rs61756766)	
Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2 min	94°C	2 min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30 sec	94°C	15 sec
Υβριδισμός (Annealing)	60°C	30 sec	51°C	15 sec
Επέκταση (Extension)	72°C	30 sec	72°C	40 sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5 min	72°C	5 min
Κύκλοι	35		39	

Γ.3 Πέψη με Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Η ανίχνευση των παραλλαγών P21R (62C>G/wt, rs77874543) και του H159Y (475C>T/wt, rs61756766), έγινε έπειτα από πέψη των προϊόντων PCR με ένζυμο περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLP), το EagI και το MscI αντίστοιχα.

Για την ανίχνευση της P21R παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο EagI το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E. Coli που φέρει το EagI γονίδιο που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Enterobacter agglomerans*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου EagI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEBuffer3 το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μL του μείγματος πέψης. Η επώαση του μείγματος έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες (over night). Στην Εικόνα 12 απεικονίζεται η αλληλουχία του δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το EagI, ενώ οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μείγματος της πέψης με το συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο φαίνονται στον Πίνακα 7.



Εικόνα 12: Θέση κοπής περιοριστικής ενδονουκλεάσης EagI.

Πίνακας 7: Υλικά μείγματος για την πέψη του εξωνίου 1 του γονιδίου του BAFFR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
dH ₂ O	150
10x NEBuffer 3	30
EagI	5

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3.5%. Αναλυτικά όπως φαίνεται και στην εικόνα 13, στο εξώνιο 1 του BAFFR η αλληλουχία που αναγνωρίζει και κατατέμνει το EagI υπάρχει δύο φορές, οπότε, απουσία του πολυμορφισμού, το ένζυμο περιορισμού κατατέμνει το προϊόν της PCR στις δύο θέσεις κοπής και ανιχνεύονται τρεις δέσμες προϊόντων PCR στις 101, 62 και 60bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος που προκύπτει από το αρχικό προϊόν. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας, το ένζυμο αναγνωρίζει μόνο τη μία από τις δύο θέσεις κατάτμησης, οπότε ανιχνεύονται δύο δέσμες, στις 168 και 60bp, έπειτα από ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τέσσερις δέσμες στις 168, 101, 62 και 60bp. Ως θετικοί μάρτυρες της πέψης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η απουσία του πολυμορφισμού με την τεχνική ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.



Εικόνα 13: Αποτελέσματα πέψης του εξωνίου 1 με περιοριστική ενδονουκλεάση EagI.

Για την ανίχνευση της H159Y παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο MscI το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E. Coli που φέρει το MscI γονίδιο που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Micrococcus species*. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου MscI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEBuffer 4 το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή. Για την πέψη 6μL του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μL του μείγματος πέψης. Η επώαση του μείγματος έγινε σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες (over night). Στην Εικόνα 14 απεικονίζεται η αλληλουχία του δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το MscI, ενώ οι

ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μείγματος της πέψης με αυτή την περιοριστική ενδονουκλεάση φαίνονται στον Πίνακα 8.

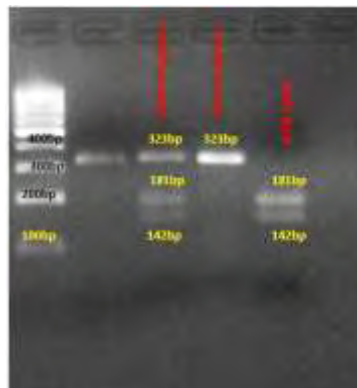


Εικόνα 14: Θέση κοπής περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MscI*.

Πίνακας 8: Υλικά μείγματος για την πέψη του εξωνίου 3 του γονιδίου του *BAFFR*.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
dH ₂ O	135
10x NEBuffer 4	30
<i>MscI</i>	20

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3.5%. Αναλυτικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 15, στο εξώνιο 3 του *BAFFR* η αλληλουχία που αναγνωρίζει και κατατέμνει το *MscI* υπάρχει μία φορά, οπότε, απουσία του πολυμορφισμού, το περιοριστικό ένζυμο κατατέμνει το προϊόν της PCR στη θέση κοπής και ανιχνεύονται δύο δέσμες προϊόντων PCR στις 181 και 142bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος που προκύπτει από το αρχικό προϊόν. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας, το ένζυμο δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία κατάτμησης στο DNA, οπότε διακρίνεται μόνο μία δέσμη προϊόντος PCR στις 323bp (προϊόν εξωνίου), έπειτα από ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τρεις δέσμες στις 323, 181 και 142bp. Ως θετικοί μάρτυρες της πέψης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η απουσία του πολυμορφισμού με την τεχνική ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.



Εικόνα 15: Αποτελέσματα πέψης του εξωνίου 3 με περιοριστική ενδονουκλεάση *MscI*.

Γ.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθώς και ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγιναν ορατοί με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% (w/v) και 3.5% (w/v) αντίστοιχα, επί παρουσίας ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE.

Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5μL δείγματος, 1μL χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min αν πρόκειται για προϊόντα PCR και για 50 έως 70 λεπτά αν ηλεκτροφορούνται προϊόντα πέψης. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

Γ.5. Ανοσονεφελομετρία για τη μέτρηση της συγκέντρωσης τάξεων και υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgM, IgA, IgG και των υποτάξεων (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) των φυσιολογικών δοτών, στα πλαίσια ερευνητικών μελετών στο εργαστήριο είχε πραγματοποιηθεί με νεφελομετρία. Η νεφελομετρία είναι μια εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραπάνω και πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων αντιορών, αφού πρώτα στα δείγματα έγινε αυτόματα αρχική αραίωση με ειδικό διάλυμα (N Diluent D).

Ο νεφελομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά υγρά στηρίζεται στη σχέση της τελευταίας με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης (αντιγόνου) και του προστιθέμενου αντίστοιχου αντισώματος. Συγκεκριμένα, τα συμπλέγματα αυτά, <<διασκορπίζουν>> μια δέσμη φωτός που διαπερνά το δείγμα προς ανάλυση, όπου η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της υπό εξέτασης πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται έπειτα από σύγκριση με μια γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνη.

Η διαδικασία απομόνωσης ορού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα τεχνική περιελάμβανε λήψη περιφερικού αίματος σε ειδικά σωληνάρια και φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 5min, ενώ τα δείγματα ορού που ελήφθησαν, αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Τα δείγματα ορού, έπειτα από την απόψυξή τους και πριν τη χρήση τους, παρέμειναν στους 4°C για 2-4 hrs και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ειδικά διάφανα σωληνάρια RIA.

Η καμπύλη αναφοράς (reference curve), βάσει της οποίας γίνεται ο νεφελομετρικός προσδιορισμός, σχηματίζεται ως συνάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και της γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα πρότυπα διαλύματα (standards). Συγκεκριμένα, η καμπύλη αναφοράς προκύπτει με βαθμονόμηση πολλαπλού σημείου, έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις μιας πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (N Protein Standard SL). Μετά τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, γίνεται εσωτερικός έλεγχος ποιότητας με τη χρήση των N/T Protein Controls SL/M τα οποία αναλύονται και εκτιμώνται, όπως αναλύονται και τα δείγματα των ασθενών.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1. Στατιστική ανάλυση

Η χ^2 (chi-square) ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της διαφοράς συχνοτήτων μεταξύ διακριτών μεταβλητών (όπως η ύπαρξη ή μη του εκάστοτε πολυμορφισμού) ανάμεσα στις ομάδες μελέτης, όπως επίσης και για τη σύγκριση των συχνοτήτων των πολυμορφικών αλληλίων μεταξύ των ασθενών και των ομάδων ελέγχου. Όπου χρειάστηκε, χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος Fisher, ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (odds ratio, OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences 19, SPSS 19.0, (SPSS Inc., Chicago, USA). Σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν $p < 0,05$

Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές και συνεχείς μεταβλητές έγιναν με Mann-Whitney U- test μη παραμετρικό έλεγχο και τα γραφήματα έγιναν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6 (GraphPad software, USA).

Δ.2. Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου

Στον Πίνακα 9, παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου κάθε πολυμορφισμού μεταξύ των μελετούμενων κάθε φορά ομάδων, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p value) και ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio, OR). Όλες οι παραλλαγές που εξετάστηκαν ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg, εκτός από τον πολυμορφισμό H159Y στην ομάδα των Non-Hodgkin λεμφώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10. Η τιμή p value < 0,05 υποδηλώνει σημαντική απόκλιση από τις παρατηρούμενες γενοτυπικές συχνότητες της ισορροπίας Hardy-Weinberg.

Πίνακας 9: Συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφικών αλληλίων των P21R και H159Y του γονιδίου BAFFR στις ομάδες των ασθενών και στους υγιείς μάρτυρες.

	TNFRSF13C - P21R			TNFRSF13C - H159Y		
	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου %	p value	OR (95% CI)	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου %	p value	OR (95% CI)
B Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	8.5	0,0570	0.6686 (0.4417-1.0120)	1.75	0,6565	0.8260 (0.3557-1.9181)
Υγιείς Δότες	5.8			1.45		
B Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	8.5	0,1706	1.5499 (0.8282-2.9005)	1.75	0,2177	2.0774 (0.6496-6.6436)
Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας	12.5			3.58		
B Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	8.5	0,2070	1.6691 (0.7532-3.6989)	1.75	0,5755	0.4438 (0.0258-7.6240)
Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας	13.34			0		
Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας	12.5	0,0097	0.4314 (0.2280-0.8160)	3.58	0,1198	0.3976 (0.1244-1.2709)
Υγιείς Δότες	5.8			1.45		
Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας	13.34	0,0258	0.4006 (0.1792-0.8952)	0	0,6684	1.8615 (0.1084-31.9756)
Υγιείς Δότες	5.8			1.45		

Πίνακας 10: Ισορροπία Hardy-Weinberg

Ισορροπία Hardy-Weinberg				
<i>p value</i>				
Πολυμορφισμός	B-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας	Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας	Υγιείς Δότες
P21R	0,8629	0,1693	0,3994	0,7947
H159Y	0,7521	0,0003	0,3994	0,7744

Δ.3. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C*-P21R

Από το σύνολο των 314 ασθενών με B-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, οι 49 ήταν ετερόζυγοι - φορείς του πολυμορφισμού και οι 2 παρουσίασαν σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. Η ομάδα των ασθενών βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.8629$]. Από το σύνολο των 379 υγιών δοτών είχαμε 42 ετερόζυγα και 1 ομόζυγο άτομο για τον πολυμορφισμό του BAFFR και βρίσκεται επίσης σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.7947$]. Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την εμφάνιση του πολυμορφισμού P21R μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των υγιών μαρτύρων [$p = 0.157, \chi^2 \text{ test}$] (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με B-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	B Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
<i>TNFRSF13C</i>-P21R				
Γονότυπος, n (%)			0.157	1.515 (0.979-2.345)
G/G Wt	263 (83.76)	336 (88.65)		
G/C Hetero	49 (15.60)	42 (11.08)		
C/C Homo	2 (0.64)	1 (0.26)		
Αλληλίο, n (%)			0.0570	0.6686 (0.4417 - 1.0120)
G	575 (91.5)	714 (94.19)		
C	53 (8.5)	44 (5.8)		

Στην ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας, από το σύνολο των 56 ασθενών, οι 10 ήταν ετερόζυγοι-φορείς του πολυμορφισμού και οι 2 παρουσίασαν σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. Η ομάδα ελέγχου των ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.1693$]. Συγκρίνοντας τους ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών [$p = 0.129, \chi^2 \text{ test}$] (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και Non-Hodgkin λεμφώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας.

Πολυμορφισμός	Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (n=56)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-P21R				
Γονότυπος, n (%)			0.129	0.711 (0.351-1.439)
G/G Wt	263 (83.76)	44 (78.57)		
G/C Hetero	49 (15.60)	10 (17.86)		
C/C Homo	2 (0.64)	2 (3.57)		
Αλληλίο, n (%)			0.1706	1.5499 (0.8282-2.9005)
G	575 (91.5)	98 (87.5)		
C	53 (8.5)	14 (12.5)		

Στην ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, από το σύνολο των 30 ασθενών, οι 8 ήταν ετερόζυγοι-φορείς του πολυμορφισμού ενώ δεν βρέθηκαν άτομα που να παρουσίασαν σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. Η ομάδα ελέγχου των ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.3994$]. Συγκρίνοντας τους ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε στη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών [$p = 0.061, \chi^2 \text{ test}$] (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και Non-Hodgkin λεμφώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας.

Πολυμορφισμός	Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (n=30)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C - P21R				
Γονότυπος, n (%)			0.276	0.533 (0.225-1.264)
G/G Wt	263 (83.76)	22 (73.33)		
G/C Hetero	49 (15.60)	8 (26.67)		
C/C Homo	2 (0.64)	0		
Αλληλία, n (%)			0.2070	1.6691 (0.7532-3.6989)
G	575 (91.5)	52 (86.67)		
C	53 (8.5)	8 (13.34)		

Στη συνέχεια συγκρίναμε την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας με την ομάδα των υγιών μαρτύρων καθώς η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη συχνότητα του αλληλίου αυτού στο πλήθος των υγιών ατόμων. Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού P21R [$p = 0.006$, χ^2 test] (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Non-Hodgkin λεμφώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας και σε υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (n=56)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-P21R				
Γονότυπος, n (%)			0.006	2.131 (1.045-4.347)
G/G Wt	44 (78.57)	336 (88.65)		
G/C Hetero	10 (17.86)	42 (11.08)		
C/C Homo	2 (3.57)	1 (0.26)		
Αλληλία, n (%)			0.0097	0.4314 (0.2280-0.8160)
G	98 (87.5)	714 (94.19)		
C	14 (12.5)	44 (5.8)		

Στη συνέχεια συγκρίναμε την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας με την ομάδα των υγιών μαρτύρων καθώς η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου ήταν

μεγαλύτερη σε σχέση με τη συχνότητα του αλληλίου αυτού στο πλήθος των υγιών ατόμων. Όπως φαίνεται κ στον παρακάτω πίνακα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού P21R [$p = 0.042$, χ^2 test] (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Non-Hodgkin λεμφώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας και σε υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (n=30)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-P21R				
Γονότυπος, n (%)			0.042	2.841 (1.191-6.777)
G/G Wt	22 (73.33)	336 (88.65)		
G/C Hetero	8 (26.67)	42 (11.08)		
C/C Homo	0	1 (0.26)		
Αλληλία, n (%)			0.0258	0.4006 (0.1792-0.8952)
G	52 (86.67)	714 (94.19)		
C	8 (13.34)	44 (5.8)		

Δ.5. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C-H159Y*

Από το σύνολο των 314 ασθενών με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, οι 11 ήταν ετερόζυγοι - φορείς του πολυμορφισμού ενώ κανένα άτομο δεν παρουσίασε σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. Η ομάδα των ασθενών βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.7521$]. Από το σύνολο των 379 υγιών δοτών είχαμε οι 11 ήταν ετερόζυγοι - φορείς του πολυμορφισμού ενώ κανένα άτομο δεν παρουσίασε σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. και βρίσκεται επίσης σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.7744$]. Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την εμφάνιση του πολυμορφισμού H159Y μεταξύ των ασθενών με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και των φυσιολογικών μαρτύρων [$p = 0.653$, χ^2 test] (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του *BAFFR* σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
<i>TNFRSF13C-H159Y</i>				
Γονότυπος, n (%)			0.653	1.215 (0.519-2.840)
T/T Wt	303 (96.50)	368 (97.10)		
T/C Hetero	11 (3.5)	11 (2.90)		
C/C Homo	0	0		
Αλληλίο, n (%)			0.6565	0.8260 (0.3557 - 1.9181)
T	617 (98.25)	747 (98.55)		
C	11 (1.75)	11 (1.45)		

Στην ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας, από το σύνολο των 56 ασθενών, οι 2 ήταν ετερόζυγοι - φορείς του πολυμορφισμού και ένας παρουσίασε σε ομόζυγη κατάσταση το πολυμορφικό αλληλίο. Η ομάδα ελέγχου των ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.0003$] και περαιτέρω μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη. Συγκρίνοντας τους ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε στη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών [$p = 0.060$, χ^2 test] (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και Non-Hodgkin λεμφώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας.

Πολυμορφισμός	Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (n=56)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-H159Y				
Γονότυπος, n (%)			0.060	0.711 (0.351-1.439)
T/T Wt	303 (96.50)	53 (94.64)		
T/C Hetero	11 (3.5)	2 (3.57)		
C/C Homo	0	1 (1.79)		
Αλληλία, n (%)			0.2177	2.0774 (0.6496-6.6436)
T	617 (98.25)	108 (96.43)		
C	11 (1.75)	4 (3.58)		

Στην ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, από το σύνολο των 30 ασθενών, κανένα άτομο δεν παρουσίασε το πολυμορφικό αλληλίο που είναι υπεύθυνο για τον πολυμορφισμό, ούτε σε ετερόζυγη ούτε σε ομόζυγη κατάσταση. Η ομάδα ελέγχου των ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [$p=0.3994$]. Συγκρίνοντας τους ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού H159Y [$p = 0.061$, χ^2 test] (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και Non-Hodgkin λεμφώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας.

Πολυμορφισμός	Β Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (n=314)	Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (n=30)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C - H159Y				
Γονότυπος, n (%)			0.297	1.036 (1.015-1.058)
T/T Wt	303 (96.50)	30 (1)		
T/C Hetero	11 (3.5)	0		
C/C Homo	0	0		
Αλληλία, n (%)			0.5755	0.4438 (0.0258-7.6240)
T	617 (98.25)	60 (1)		
C	11 (1.75)	0		

Στη συνέχεια συγκρίναμε την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας με την ομάδα των υγιών μαρτύρων καθώς η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη συχνότητα του αλληλίου αυτού στο πλήθος των υγιών ατόμων. Κατόπιν στατιστικής ανάλυσης φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού H159Y [$p = 0.032$, χ^2 test] (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Non-Hodgkin λεμφώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας και σε υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	Non-Hodgkin Λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας (n=56)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-H159Y				
Γονότυπος, n (%)			0.032	1.894 (0.512-7.009)
T/T Wt	53 (94.64)	368 (97.10)		
T/C Hetero	2 (3.57)	11 (2.90)		
C/C Homo	1 (1.79)	0		
Αλληλία, n (%)			0.1198	0.3976 (0.1244-1.2709)
T	108 (96.43)	747 (98.55)		
C	4 (3.58)	11 (1.45)		

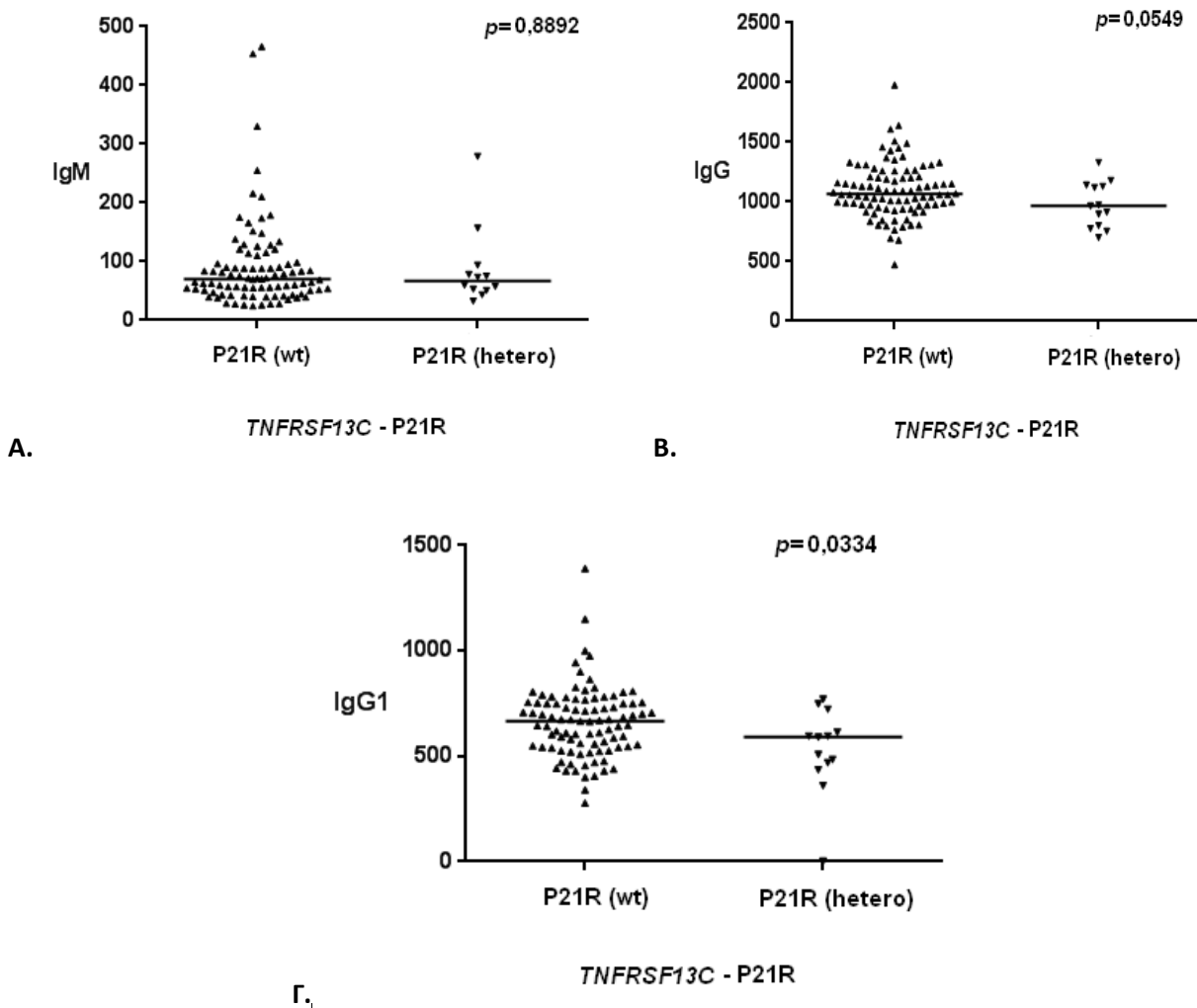
Τέλος, συγκρίναμε την ομάδα ελέγχου Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας με την ομάδα των υγιών δοτών καθώς η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη συχνότητα του αλληλίου αυτού στο πλήθος των υγιών ατόμων. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπάρχει στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού H159Y μεταξύ των δύο μελετούμενων ομάδων ελέγχου [$p = 0.344$, χ^2 test] (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Συχνότητα των πολυμορφισμών P21R και H159Y του γονιδίου του BAFFR σε ασθενείς με Non-Hodgkin λεμφώματος χαμηλού βαθμού κακοήθειας και σε υγιείς δότες.

Πολυμορφισμός	Non-Hodgkin Λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (n=30)	Υγιείς Δότες (n=379)	P value	OR (95% CI)
TNFRSF13C-H159Y				
Γονότυπος, n (%)			0.344	0.971 (0.954-0.988)
T/T Wt	30 (1)	368 (97.10)		
T/C Hetero	0	11 (2.90)		
C/C Homo	0	0		
Αλληλία, n (%)			0.6684	1.8615 (0.1084-31.9756)
T	60 (1)	747 (98.55)		
C	0	11 (1.45)		

Δ.6. Στατιστική ανάλυση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στον ορόν ετερόζυγων για τον *TNFRSF13C*-P21R υγιών μαρτύρων

Σε κάποιους υγιείς δότες η ανάλυση των δεδομένων του ορολογικού τους ελέγχου σε σχέση με τους πολυμορφισμούς, έδειξε πως παρουσία του πολυμορφισμού δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgM στον ορό ($p=0.8892$) (Εικόνα 16Α) ενώ τα επίπεδα της IgG ανοσοσφαιρίνης εμφανίζουν μία μικρή μείωση ($p=0.0549$) (Εικόνα 16Β). Αναλύοντας περαιτέρω τις 4 υποτάξεις της IgG (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) συγκριτικά με τον πολυμορφισμό P21R βρήκαμε μία πιο αισθητή μείωση της συγκέντρωσης της IgG1 στον ορό στα ετερόζυγα άτομα. Παρουσία του πολυμορφισμού P21R, τα επίπεδα της υποτάξης IgG1 που παρατηρούνται στον ορό είναι χαμηλότερα ($p=0.0334$). (Εικόνα 16Γ)



Εικόνα 16: Σύγκριση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών IgM (Α), IgG (Β) και IgG1 (Γ) σε υγιείς δότες απουσία (P21R wt) και παρουσία (P21R hetero) του πολυμορφισμού P21R του γονιδίου του BAFFR.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι η πρώτη φορά στη βιβλιογραφία που ο πολυμορφισμός P21R του BAFFR μελετήθηκε σε ασθενείς με Β-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. Ο πολυμορφισμός P21R σχετίζεται με τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης BAFFR μιας και παρεμποδίζει τη δημιουργία τριμερών. Η αλλαγή του αμινοξέος που συμβαίνει στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης του υποδοχέα ως αποτέλεσμα του πολυμορφισμού P21R, επηρεάζει τη φυσιολογική πρόσδεση του συνδέτη BAFF στον υποδοχέα. Παρουσία του P21R, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες του υποδοχέα δεν μπορούν να συναρμολογηθούν σε πολυμερή και έτσι το BAFF δεν μπορεί να προσδεθεί φυσιολογικά για να επάγει την σηματοδότηση. Επομένως, ο πολυμορφισμός P21R έχει μια αρνητική δράση αποτρέποντας την επίτευξη της πρόσδεσης του συνδέτη στον υποδοχέα για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος.² Η συχνότητα εμφάνισής του δεν είναι υψηλότερη στους ασθενείς με Β-ALL παρόλο που το μόριο φαίνεται να σχετίζεται με τη νόσο μιας και απρόσφορη έκφραση αυτού έχει δημοσιευτεί πρόσφατα. Μελέτη στο εργαστήριο μας έδειξε ότι ασθενείς με Β-ALL εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη έκφραση του mRNA του *TNFRSF13C/BAFFR*, που κυμαίνεται από απουσία έκφρασης σε προγονικά κύτταρα Β-ALL σε υψηλότερη έκφραση σε Β-πρόδρομα Β-ALL. Λαμβάνοντας υπόψη ότι *TNFRSF13C/BAFFR* μετάγραφα ήταν παρόν κυρίως σε λυμφοβλάστες Β-ALL, η έκφραση του *TNFRSF13C/BAFFR* αυξάνεται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης των νεοπλασματικών λυμφοβλαστών. Σε μία 20χρονη ασθενή, που εμφάνιζε σχετικά υψηλή έκφραση *TNFRSF13C/BAFFR* αλλά η έκφραση της πρωτεΐνης στα νεοπλασματικά της Β-κύτταρα δεν ήταν ανιχνεύσιμη, αναλύθηκε η αλληλουχία ολόκληρου του *TNFRSF13C/BAFFR* της και προσδιορίστηκε η παρουσία του P21R σε ομόζυγη κατάσταση. Ακόμη έχοντας εντοπίσει πρόσφατα ότι άτομα με αυτόν τον πολυμορφισμό εμφανίζουν "χαμηλή ή καθόλου έκφραση BAFFR" παρά την παρουσία επαρκών επιπέδων *TNFRSF13C/BAFFR* mRNA, βρήκαμε πως το εύρημα αυτό οφείλεται σε μία αδύναμη δέσμευση του BAFF από τον BAFFR και όχι σε μια μεταφραστική τροποποίηση του υποδοχέα.¹⁰⁰

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C*-P21R στα δείγματα που μελετήσαμε δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης ανάμεσα στους ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και στους υγιείς δότες ($p=0.157$). Ενώ μελετώντας τα δείγματα τις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας συγκριτικά με τις άλλες ομάδες ελέγχου, NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας και NHL χαμηλού βαθμού κακοήθειας, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της εμφάνισης του πολυμορφισμού ($p=0.129$) και ($p=0.276$) αντίστοιχα. Ωστόσο, ο P21R δεν φαίνεται να είναι αιτιοπαθολογικός της νόσου καθώς ετερόζυγα και ομόζυγα άτομα ως προς το πολυμορφικό αλληλίο βρέθηκαν τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των υγιών δοτών. Στις ομάδες ελέγχου με Non-Hodgkin λέμφωμα φαίνεται να είναι αυξημένη η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλίου που είναι υπεύθυνο για τον πολυμορφισμό P21R (12,5% και 13,33% αντίστοιχα) συγκριτικά με τους υγιείς δότες

(5,8%). Επίσης, βρέθηκε μία στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της εμφάνισης του πολυμορφισμού και της νόσου NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας και NHL χαμηλού βαθμού κακοήθειας ($p=0.006$) και ($p=0.042$) αντίστοιχα, στις ομάδες των NHL λεμφωμάτων και των υγιών δοτών που αναλύσαμε.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό H159Y δε βρήκαμε συσχέτιση με τις B-ALL αλλά με τα NHL επιβεβαιώνοντας τη μελέτη των Hildebrand και συν.⁶ οι οποίοι βρήκαν πως ο H159Y έχει συσχετισθεί με Non-Hodgkin λέμφωμα καθώς η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του NF-κB είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου και η ικανότητα του BAFF-R_{H159Y} να ενεργοποιεί αυτό το σηματοδοτικό καταρράκτη θα μπορούσε να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην ενίσχυση της ενεργοποίησης του NF-κB σε ένα υποσύνολο ασθενών. Στη μελέτη των Hildebrand και συν.,⁶ η συχνότητα του BAFFR_{H159Y} ήταν 6,2% στο DNA του όγκου NHL ασθενών συγκριτικά με 0% που ήταν στους 100 φυσιολογικούς μάρτυρες που μελέτησαν. Στην παρούσα μελέτη επίσης η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου που είναι υπεύθυνο για τον H159Y που παρατηρήθηκε στις ομάδες ελέγχου NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας και NHL χαμηλού βαθμού κακοήθειας (3,58% και 0% αντίστοιχα), ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη συχνότητα που παρατηρήθηκε στους υγιείς δότες (1,45%). Σύμφωνα και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η αυξημένη συχνότητα του μεταλλαγμένου υποδοχέα BAFFR_{H159Y} σε ετερόζυγη κατάσταση που εντοπίστηκε σε ασθενείς NHL, υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει μια σπάνια παραλλαγή που ενισχύει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη B- κυτταρικών λεμφωμάτων.⁶ Αξίζει να σημειωθεί πως ο H159Y πολυμορφισμός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό του πρώτου εξωνίου του BAFFR καθώς ανιχνεύεται πάντα σε συσχέτιση με τον P21R. Αντισταθμίζοντας την αρνητική δράση του P21R σε ασθενείς - φορείς και των δύο πολυμορφισμών. Με την διαρκή ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, που επάγεται από τη σηματοδότηση του μεταλλαγμένου υποδοχέα BAFFR_{H159Y}.⁶

Όσον αφορά τη μελέτη για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C*-H159Y δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης ($p=0.653$) ανάμεσα σε ασθενείς με Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και υγιείς δότες. Όταν συγκρίναμε τους ασθενείς με Β-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία με τις ομάδες ελέγχου με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας και Non-Hodgkin λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.060$) και ($p=0.297$) αντίστοιχα. Ωστόσο, ο H159Y δεν φαίνεται να είναι αιτιοπαθολογικός της Β-Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας καθώς ετερόζυγα ως προς το πολυμορφικό αλληλόμορφο βρέθηκαν τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των υγιών δοτών, ενώ σε ομόζυγη κατάσταση για το πολυμορφικό αλληλόμορφο βρέθηκε μόνο ένα άτομο με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας. Επίσης, συγκρίνοντας τις άλλες ομάδες ελέγχου μεταξύ τους, βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού και της νόσου μεταξύ ασθενών με NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας και υγιειών δοτών ($p=0.032$), σε αντίθεση με τους ασθενείς NHL χαμηλού βαθμού κακοήθειας όπου δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ($p=0.344$).

Στη μελέτη των Hildebrand και συν.,⁶ η συχνότητα του BAFFR_{H159Y} ήταν 6,2% στο DNA του όγκου NHL ασθενών συγκριτικά με 0% που ήταν στους 100 φυσιολογικούς μάρτυρες που μελέτησαν. Στην παρούσα μελέτη επίσης η συχνότητα του πολυμορφικού αλληλομόρφου που είναι υπεύθυνο για τον H159Y που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας (3,58%), ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη συχνότητα που παρατηρήθηκε στους υγιείς δότες (1,45%). Σύμφωνα και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η αυξημένη συχνότητα του μεταλλαγμένου υποδοχέα BAFFR_{H159Y} σε ετερόζυγη κατάσταση που εντοπίστηκε σε ασθενείς NHL, υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει μια σπάνια παραλλαγή που ενισχύει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη B- κυτταρικών λεμφωμάτων.⁶ Η μεγαλύτερη εμφάνιση συχνότητας των πολυμορφικών αλληλομόρφων στην ομάδα ελέγχου με Non-Hodgkin λέμφωμα συγκριτικά με τους ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία φαίνεται ότι πιθανόν οι πολυμορφισμοί αυτοί να επιδρούν στον φαινότυπο της νόσου. Βέβαια θα πρέπει να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να επιβεβαιωθεί η διαφορά αυτή.

Αναλύοντας τον πολυμορφισμό P21R σε φυσιολογικά άτομα βρήκαμε πως παρουσία του πολυμορφισμού δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgM στον ορό ενώ τα επίπεδα της IgG ανοσοσφαιρίνης εμφανίζουν μία μικρή μείωση. Αναλύοντας περαιτέρω τις 4 υποτάξεις της IgG συγκριτικά με τον πολυμορφισμό P21R βρήκαμε ότι σχετίζεται με τα επίπεδα IgG1 καθώς παρατηρήθηκε μία πιο αισθητή μείωση της συγκέντρωσης της IgG1 στον ορό ετερόζυγων ατόμων. Σε πρόσφατη μελέτη όπου συμμετείχαν πολλά ερευνητικά κέντρα μεταξύ των οποίων και το δικό μας¹⁰⁰ φάνηκε ότι σε ασθενείς με COVID ,τα επίπεδα της IgM ανοσοσφαιρίνης ήταν αυξημένα στα ετερόζυγα άτομα για τον P21R σε σύγκριση με τα άτομα που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε όσον αφορά τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgG όπου στα ετερόζυγα άτομα παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισής της απ' ότι στα άτομα που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό. Το γεγονός ότι η μείωση της έκκρισης της IgG1 εμφανίζεται και σε φυσιολογικά άτομα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς φαίνεται να μην γίνεται αποτελεσματικά η μεταστροφή της ανοσοσφαιρίνης IgM σε IgG λόγω της μη σωστής σηματοδότησης του BAFFR.

Συμπερασματικά, από την παρούσα εργασία προκύπτει ότι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου του BAFFR, P21R και H159Y, δεν είναι αιτιοπαθολογικοί της Β-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, καθώς εντοπίζονται και σε φυσιολογικά άτομα. Ενώ, μία οριακή σημαντικότητα έχει παρατηρηθεί όσον αφορά τους παραπάνω πολυμορφισμούς στους ασθενείς με Non-Hodgkin λέμφωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας, που χρήζει περαιτέρω μελέτης με αύξηση του αριθμού των εξεταζόμενων δειγμάτων. Τέλος, το εύρημα ότι σε ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό P21R υγιείς δότες παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση της IgG και μεγαλύτερη μείωση της IgG1, δείχνει ότι ο πολυμορφισμός μπορεί να οδηγεί στην εμφάνιση μη αποτελεσματικής απάντησης έναντι αντιγόνων και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επίπλέον, παρόλο που φάνηκε ότι για τη μεταστροφή με IgG κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει η πρωτεΐνη TAC1 από την έρευνα μας προκύπτει ο σημαντικός ρόλος που παίζει και το BAFFR στη συγκεκριμένη διαδικασία.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Schneider P and Tschopp J. BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunology Letters* 88 (2003) 57-62
- ² Losi CG et al. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2005, 25(5):496-502
- ³ Parameswaran R, Müschen M, Kim YM, Groffen J, Heisterkamp N. A functional receptor for B-cell-activating factor is expressed on human acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res* 2010;70(11):4346-56.
- ⁴ Stephen A. Mihalcik, Renee C. Tschumper and Diane F. Jelinek. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. *Cell Cycle* 2010, 9:24, 4884-4892
- ⁵ Novak AJ et al. Genetic Variation in B-Cell-Activating Factor Is Associated with an Increased Risk of Developing B-Cell Non -Hodgkin Lymphoma *Cancer Res* 2009, 69:4217-4224
- ⁶ Hildebrand JM et al. A BAFF-R mutation associated with non-Hodgkin lymphoma alters TRAF recruitment and reveals new insights into BAFF-R signaling. *J Exp Med* 2010, 22;207(12):2569-79
- ⁷ Pui CH et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008, 371: 1030-43
- ⁸ Hesslein DG, Schatz DG. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol* 2001;78:169-232.
- ⁹ Nemazee D. Receptor editing in B cells. *Adv Immunol* 2000;74:89-126.
- ¹⁰ Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006;6:107-116.
- ¹¹ Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190-202.
- ¹² McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487-513.
- ¹³ Tonegawa S. [Molecular biology of immunologic recognition]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1987;32:239-50.
- ¹⁴ Zou X, Piper TA, Smith JA, Allen ND, Xian J, Bruggemann M. Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Iγkappa and Iλbda light chain. *J Immunol* 2003; 170 : 1354.
- ¹⁵ Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 959-971.
- ¹⁶ Lam, K. P., Kuhn, R. and Rajewsky, K., In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997. 90: 1073-1083.
- ¹⁷ Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. and Rajewsky, K., Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Iγalpha/ beta heterodimer. *Cell*. 2004. 117: 787-800.
- ¹⁸ van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60B:1-13.
- ¹⁹ Loder, F. et al. B-cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B-cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190, 75-89 (1999).
- ²⁰ Cancro, M. P. Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunol. Rev.* 197, 89-101 (2004).
- ²¹ Rathmell, J. C. B cell homeostasis: digital survival or analog growth? *Immunol. Rev.* 197, 116-128 (2002).
- ²² Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009;39:2065-2075.
- ²³ Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F. Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006;6:741-750.
- ²⁴ von Bulow, G. U., & Bram, R. J. (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*, 278, 138-141.
- ²⁵ Madry, C., Laabi, Y., Callebaut, I., Roussel, J., Hatzoglou, A., Le Coniat, M., et al. (1998). The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *International Immunology*, 10, 1693-1702.
- ²⁶ Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, et al. BAFFR, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001;293:2108-11.
- ²⁷ Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, McCabe S, Qiu WR, Kornuc M, Xia XZ, Guo J, Stolina M, Boyle WJ, Sarosi I, Hsu H, Senaldi G, Theill LE. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat. Immunol.* 2000; 1(3):252-6.
- ²⁸ Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, Wang L, Lefevre EA, Cachero TG, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med* 2000;192:129-35.

-
- ²⁹ Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, et al. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med* 2000;192:137–43.
- ³⁰ Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A. Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol* 2000;10:785–8.
- ³¹ Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1147–54.
- ³² Rennert P, Schneider P, Cachero TG, Thompson J, Trabach L, Hertig S, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 2000;192:1677–84.
- ³³ Bodmer, J. L., Schneider, P., & Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 19–26.
- ³⁴ Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189:1747–56.
- ³⁵ Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, et al. (2000) TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404: 995–999.
- ³⁶ Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu GL, Aggarwal BB. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(23):15978–81.
- ³⁷ Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999; 285:260–263.
- ³⁸ Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *Biol.* 1999; 65(5):680-3.
- ³⁹ Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA. Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* 2003;101(11):4464-71
- ⁴⁰ Kanakaraj P, Migone TS, Nardelli B, Ullrich S, Li Y, Olsen HS, Salcedo TW, Kaufman T, Cochrane E, Gan Y, Hilbert DM, Giri J. BLYS Binds to B cells with high affinity and induces activation of the transcription factors NF-kappaB and ELF-1. *Cytokine* 2001;13(1):25-31.
- ⁴¹ Jiang Y, Ohtsuji M, Abe M, Li N, Xiu Y, Wen S, et al. Polymorphism and chromosomal mapping of the mouse gene for B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (Baff) and association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics* 2001;53:810–13.
- ⁴² Chen Y, Molloy SS, Thomas L, Gambee J, Bachinger HP, Ferguson B, et al. Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7218–23.
- ⁴³ Batten M, Fletcher C, Ng LG et al (2004) TNF deficiency fails to protect BAFF transgenic mice against autoimmunity and reveals a predisposition to B cell lymphoma. *J Immunol* 172:812–822
- ⁴⁴ Scapini, P., Bazzoni, F., & Cassatella, M. A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLYS) expression in human neutrophils. *Immunology Letters* 2008; 116, 1–6.
- ⁴⁵ Nardelli, B. et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 97, 198–204 (2000).
- ⁴⁶ Meyer-Bahlburg A, Andrews SF, Yu KOA, Porcelli SA and Rawlings DJ. 2008. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *JEM.* 205(1):155-168.
- ⁴⁷ Mackay F and Ambrose C. 2003. The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:311.
- ⁴⁸ Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat. Immunol.* 2002; 2(7):465-75.
- ⁴⁹ Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, et al. (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293: 2111–2114.
- ⁵⁰ Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, Rixon M, Schou O, Foley KP, Haugen H, McMillen S, Waggie K, Schreckhise RW, Shoemaker K, Vu T, Moore M, Grossman A, Clegg CH. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity* 2001; 15(2):289-302.
- ⁵¹ Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, et al. (2000) BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192: 1453–1466.
- ⁵² Schneider P, Takatsuka H, Wilson A, Mackay F, Tardivel A, Lens S, Cachero TG, Finke D, Beermann F, Tschopp J. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J. Exp. Med.* 2001; 194(11):1691-1697.
- ⁵³ Nimmanapalli, R., Lyu, M. A., Du, M., Keating, M. J., Rosenblum, M. G. and Gandhi, V. (2007) The growth factor fusion construct containing B-lymphocyte stimulator (BLYS) and the toxin rGel induces apoptosis specifically in BAFFR-positive CLL cells. *Blood*, 109, 2557–2564.

-
- ⁵⁴ Lyu, M.A., Cheung, L.H., Hittelman, W.N., Marks, J.W., Aguiar, R.C. and Rosenblum, M.G. (2007) The rGel/BLyS fusion toxin specifically targets malignant B-cells expressing the BLyS receptors BAFFR, TACI, and BCMA. *Mol. Cancer Ther.*, 6, 460–470.
- ⁵⁵ Gardam S., Sierro F., Basten A., Mackay F., & Brink R. (2008). TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity*, 28, 391–401.
- ⁵⁶ Grech, A. P., Amesbury, M., Chan, T., Gardam, S., Basten, A., & Brink, R. (2004). TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity*, 21, 629–642.
- ⁵⁷ Do, R. K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M. R., Hilbert, D., & Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *Journal of Experimental Medicine*, 192, 953–964.
- ⁵⁸ Sasaki Y, Casola S, Kutok JL, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and –independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* 2004; 173: 2245-2252.
- ⁵⁹ Mihalczik SA, Huddlestone PM 3rd, Wu X, Jelinek DF. The structure of the TNFRSF13C promoter enables differential expression of BAFFR during B cell ontogeny and terminal differentiation. *J Immunol* 2010;185:1045-54.
- ⁶⁰ Ng L, Sutherland A, Qian F, Cachero TG, Scott M, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Zimmer S, Newton R et al.: BAFFR is the principal BAFF receptor facilitating BAFF co-stimulation of T and B cells. *J Immunol* 2004, 173:807-817.
- ⁶¹ Smith SH, Cancro MP. B cell receptor signals regulate BLyS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors. *J Immunol* 2003; 170:5820–5823.
- ⁶² Harless SM, Lentz VM, Sah AP, Hsu BL, Clise-Dwyer K, Hilbert DM, Hayes CE, Cancro MP. Competition for BLyS-mediated signalling through Bcnd/BR3 regulates peripheral B-lymphocyte numbers. *Curr Biol* 2001; 11: 1986–1989.
- ⁶³ Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, MacKay F, et al. (2004) B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 173: 2331–2341.
- ⁶⁴ Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, et al. (2001) Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11: 1547–1552.
- ⁶⁵ Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning JL: BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003, 21:231-264.
- ⁶⁶ Fu L Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Ford RJ. BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKKbeta and NF-kappaB/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Blood* 2009; 113: 4627-4236.
- ⁶⁷ Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, et al. (1999) Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190: 1697–1710.
- ⁶⁸ Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109: 59–68.
- ⁶⁹ Schaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM: Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:920-932.
- ⁷⁰ Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo A, Yoshimura L, Ford RJ. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2006; 107:4540–4548.
- ⁷¹ He, B., A. Chadburn, E. Jou, E. J. Schattner, D. M. Knowles, and A. Cerutti. 2004. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J. Immunol.* 172: 3268–3279.
- ⁷² Briones J, Timmerman JM, Hilbert DM, Levy R. BLyS and BLyS receptor expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 2002; 30:135–141.
- ⁷³ Kern, C. et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103, 679–688 (2004).
- ⁷⁴ Novak, A. J., R. J. Bram, N. E. Kay, and D. F. Jelinek. 2002. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 100: 2973–2979.
- ⁷⁵ Moreaux J, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 2004; 103:3148–3157.
- ⁷⁶ Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W, Gross JA, Greipp PR, Jelinek DF: Expression of BCMA, TACI, and BAFFR in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 2004, 103:689-694.
- ⁷⁷ ElSawa SF, et al. B-lymphocyte stimulator (BLyS) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2006; 107:2882–2888.
- ⁷⁸ Juarez J, Dela Pena A, Baraz R, et al. CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia* 2007;21:1249–57.
- ⁷⁹ Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ. Activation of Wnt/ β -catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;138:338–48.

-
- ⁸⁰ Bendall LJ, Baraz R, Juarez J, Shen W, Bradstock KF. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1 α in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005;65:3290–8.
- ⁸¹ Mishra S, Zhang B, Cunnick JM, Heisterkamp N, Groffen J. Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 2006;66:5387–93.
- ⁸² Bradstock KF, Gottlieb DJ. Interaction of acute leukemia cells with the bone marrow microenvironment: implications for control of minimal residual disease. *Leuk Lymphoma* 1995;18:1–16.
- ⁸³ Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1996;92:97–103.
- ⁸⁴ Mackay F, Silveira PA, Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19:327–36.
- ⁸⁵ Ju S, Zhang D, Wang Y et al (2006) Correlation of the expression levels of BlyS and its receptors mRNA in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem* 39:1131–1137
- ⁸⁶ Haiat S, Billard C, Quiney C, Ajchenbaum-Cymbalista F, Kolb JP. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2006;118:281–92.
- ⁸⁷ Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109:729–39.
- ⁸⁸ Novak AJ, Grote DM, Stenson M, et al. Expression of BlyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*. 2004;104:2247–53.
- ⁸⁹ Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Mackay CR, Dorfman DM. BAFFR, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol*. 2005;36:1113–9.
- ⁹⁰ Wada K, Maeda K, Tajima K, Kato T, Kobata T, Yamakawa M. Expression of BAFF-R and TACI in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas. *Histopathology*. 2009;54:221–32.
- ⁹¹ Abe M, Kido S, Hiasa M, et al. BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1313–5.
- ⁹² Staudt LM, Wilson WH. Focus on lymphomas. *Cancer Cell* 2002;2:363–6
- ⁹³ Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50(3):223–61.
- ⁹⁴ Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;79:2370–7.
- ⁹⁵ Manabe A, Murti KG, Coustan-Smith E, et al. Adhesion-dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells. *Blood* 1994;83:758–66.
- ⁹⁶ Kimberley FC, Hahne M, Medema JP (2009) APRIL hath put a spring of youth in everything”: Relevance of APRIL for survival. *J Cell Physiol* 218: 1–8.
- ⁹⁷ Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 2004;15:807–17.
- ⁹⁸ Trembl JF, Hao Y, Stadanlick JE, Cancro MP. The BlyS family: toward a molecular understanding of B cell homeostasis. *Cell Biochem Biophys* 2009;53:1–16.
- ⁹⁹ Maia S, Pelletier M, Ding J, Hsu Y-M, Sallan SE, et al. (2011) Aberrant Expression of Functional BAFF-System Receptors by Malignant B-Cell Precursors Impacts Leukemia Cell Survival. *PLoS ONE* 6(6): e20787.
- ¹⁰⁰ Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, Kraus H, Salzer U, Fiala GJ, Schamel WW, Lougaris V, Plebani A, Hammarstrom L, Recher M, Germeis AE, Grimbacher B, Warnatz K, Rolink AG, Schneider P, Notarangelo LD, Eibel H. A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; pii: S0091-6749:01840-X. doi: 10.1016. Epub ahead of print.
- ¹⁰¹ Ni, C.Z., G. Oganessian, K. Welsh, X. Zhu, J.C. Reed, A.C. Satterthwait, G. Cheng, and K.R. Ely. 2004. Key molecular contacts promote recognition of the BAFF receptor by TNF receptor-associated factor 3: implications for intracellular signaling regulation. *J. Immunol.* 173:7394–7400.
- ¹⁰² Vallabhapurapu, S., and M. Karin. 2009. Regulation and function of NFkappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27:693–733. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- ¹⁰³ Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheiderei C. Transcription factor NF- κ B is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2000;14:399–402.
- ¹⁰⁴ Munzert G, Kirchner D, Ottmann O, Bergmann L, Schmid RM. Constitutive NF- κ B/Rel activation in Philadelphia chromosome positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Lymphoma* 2004;45:1181–4.