



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του γονιδίου *BTK* στην Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton και σε Χρόνια Β-Λεμφοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα

Τσιάλτα Ιωάννα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας
- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Study of *BTK* gene in Bruton’s Agammaglobulinemia and in Chronic B-cell
Lymphoproliferative Neoplasias

By
Tsialta Ioanna

Three-member exam committee :

- Speletas Matthaïos, Professor of Medical Immunology, Supervisor
- Peteinaki Euthimia, Professor of Biopathology - Clinical Microbiology
- Dardiotis Euthimios, Assistant Professor in Neurology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larisa , October, 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	8
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Η αγαμμασφαιριναιμία του Bruton	12
1.1.1 Γενικά και Ιστορικά στοιχεία	12
1.1.2 Επιδημιολογία	12
1.1.3 Παθοφυσιολογία, Παθογένεση και Κλινική εικόνα νόσου	13
1.1.4 Διάγνωση της νόσου	15
1.1.5 Αιτιολογία της νόσου	15
1.1.6 Θεραπεία	18
1.2 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	19
1.2.1 Παθογένεση, διάγνωση και θεραπεία	19
1.3 Γονίδιο <i>BTK</i> και πρωτεΐνη	23
1.3.1 Έκφραση της <i>BTK</i> στα κύτταρα του αίματος και η θέση της στα μονοπάτια σηματοδότησης	24
1.3.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>BTK</i>	28
1.4 Η σημασία της <i>BTK</i> στην εποχή των νέων στοχευμένων βιολογικών θεραπειών, Ibrutinib - anti- <i>BTK</i> θεραπείες, δομή φαρμάκου και ενδείξεις θεραπείας	32
1.4.1 Ανταπόκριση στη θεραπεία και ανεπιθύμητες παρενέργειες	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	37

<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	38
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
1.1 Ασθενείς και μάρτυρες	39
1.2 Υλικά και μέθοδοι	40
1.2.1 Απομόνωση DNA	40
1.2.2 PCR για το γονίδιο <i>BTK</i>	41
1.2.3 Παρασκευή γέλης αгарόζης και ηλεκτροφόρηση προϊόντων	44
1.2.4 Καθαρισμός των PCR προϊόντων	46
1.2.5 Αλληλούχιση κατά Sanger	47
1.2.6 Απομόνωση PBMC's με φικόλη	49
1.2.7 Απομόνωση RNA από στοιβάδα κυττάρων	49
1.2.8 Σύνθεση cDNA	50
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
2.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου <i>BTK</i> σε ασθενείς με XLA	54
2.2 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου <i>BTK</i> σε ασθενείς με XLA	57
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

Ευχαριστίες

Αρχικά, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή Σπελέτα Ματθαίο, την Καθηγήτρια Πετεινάκη Ευθυμία και τον Επίκουρο Καθηγητή Δαρδιώτη Ευθύμιο. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Καθηγητή Ματθαίο Σπελέτα, που με δέχθηκε στο Εργαστήριο και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, καθώς επίσης για την υλικοτεχνική εργαστηριακή υποδομή. Ακόμη, τον ευχαριστώ για τη συνεχή υποστήριξη, εμπιστοσύνη και καθοδήγηση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Στον Καθηγητή Αναστάσιο Γερμενή θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου για τη συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Γιαννακούλα Νικόλαο για την άριστη συνεργασία και την παροχή υλικού κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τους Γερασιμίνα Τσιντή, Σοφία Ραφτοπούλου, Αθανασία Φουσίκα, Αθανασία Μαρίνα Περιστέρη, Μακρή Σοφία και την υπόλοιπη ομάδα του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία όλο αυτό το διάστημα, καθώς και για την καθημερινή βοήθεια, ενθάρρυνση και υπομονή τους. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ειρήνη Σεβδαλή για την αμέριστη υποστήριξη και τη σημαντική συμβολή της στα πρώτα μου βήματα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για τη συνεχή συμπαράσταση όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Εισαγωγικά: Το γονίδιο *BTK*, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα X, κωδικοποιεί μία κινάση τυροσίνης (BTK), η οποία παίζει ρόλο ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη του B-λεμφοκυττάρου και πιο συγκεκριμένα στο στάδιο του πρόδρομου B-κυττάρου. Μεταλλάξεις του *BTK* είναι η αιτία της Αγαμμασφαιριναιμίας του Bruton ή της Συνδεδεμένης με το χρωμόσωμα X Αγαμμασφαιριναιμίας (X-linked agammaglobulinemia, XLA). Αναστολείς της BTK, όπως το Ibrutinib (Imbruvica), έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία ασθενών με B-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *BTK* έχουν βρεθεί σε ασθενείς που εκδηλώνουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία, υποδηλώνοντας ότι η ανάλυση των μεταλλάξεων του *BTK* θα μπορούσε να συνιστά ένα σημαντικό εργαλείο για την επιλογή υποψήφιων ασθενών για τέτοιου είδους θεραπείες.

Υλικά και Μέθοδοι: Με τη βοήθεια των μεθόδων PCR και αλληλούχισης κατά Sanger μελετήθηκαν τρεις άρρενες ασθενείς με XLA και δώδεκα ασθενείς με B-αιματολογικές κακοήθειες (δέκα με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, ένας με Μακροσφαιριναιμία Waldenström και ένας με Τριχωτή Λευχαιμία), πριν λάβουν θεραπεία με Ibrutinib σύμφωνα με τα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκαν τρεις διακριτές μεταλλάξεις σε ασθενείς με XLA, ειδικότερα στις θέσεις c.1176 (p.Tyr392fs), c.1176 (p.Tyr392Ter), και c.1039 (p.Ala347Pro), παρέχοντας οριστική διάγνωση της νόσου. Όσον αφορά τους ασθενείς με B-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις που να αιτιολογούν την ανθεκτικότητα στο φαρμακευτικό παράγοντα Ibrutinib. Μία από τις ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία έφερε σε ετεροζυγωτία μία συνώνυμη μετάλλαξη στο εξόνιο 17 στη θέση c.1899 (p.Cys633=), χωρίς ωστόσο να αποτελεί παθολογικό εύρημα.

Συμπέρασμα: Η ανάλυση μεταλλάξεων του *BTK* είναι υψίστης σημασίας για την οριστική διάγνωση της XLA, ενώ σε ασθενείς με B-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα δε φαίνεται να απαιτείται μελέτη του γονιδίου *BTK* προ της έναρξης αντι-BTK θεραπείας. Μελέτη του γονιδίου προφανώς και ενδείκνυται μόνο σε ασθενείς με ανθεκτικότητα ή προοδευτική απώλεια της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Λέξεις κλειδιά: *BTK*, πρωτοπαθής αντισωματική ανεπάρκεια, XLA, B-κύτταρα, ανοσοσφαιρίνες, μεταλλάξεις, B-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, αναστολέας, ανοσοθεραπεία, ανθεκτικότητα, Ibrutinib, PCR, αλληλούχιση Sanger.

Abstract

Background: *BTK* gene, which is located in chromosome X, encodes a tyrosine kinase (BTK) that plays a crucial role in B-cell development at the pre-B-cell stage. *BTK* defects are the cause of Bruton's agammaglobulinemia or XLA (X-linked agammaglobulinemia), namely the most common form of agammaglobulinemia in childhood. On the other hand, BTK inhibitors, such as Ibrutinib (Imbruvica), have been proven to be effective in the treatment of patients with B-cell neoplasias. Interestingly, somatic *BTK* mutations have been found in patients with treatment-resistant disease, suggesting that *BTK* mutational analysis could offer a tool for the selection of candidate patients for such treatments.

Materials and methods: PCR - Sanger sequencing techniques were performed in three male-patients with XLA and 12 patients with B-cell malignancies (ten with Chronic Lymphocytic Leukaemia, one with Waldenström's Macroglobulinemia and one with Hairy Cell Leukaemia), before receiving Ibrutinib according to standard protocols.

Results: Three distinct genetic defects, namely c.1176 (p.Tyr392fs), c.1176 (p.Tyr392Ter), and c.1039 (p.Ala347Pro), were observed in XLA patients, providing a definite diagnosis of the disease. As for the patients with B-cell neoplasias no pathological mutations were found in *BTK* gene. In one female patient with CLL a silent mutation was detected in exon 17 c.1899 (p.-Cys633=), but it does not consist a pathological finding.

Conclusion: *BTK* mutational analysis is of high importance for the definite diagnosis of XLA, while for patients with B-cell neoplasias study of the gene seems not to be required before the initiation of anti-BTK therapy. Study of the BTK gene is obviously required when patients manifest resistance to therapy or progressive loss of therapy response.

Key words: *BTK*, immunodeficiency, XLA, B-cells, immunoglobulins, genetic defects, B-cell malignancies, inhibitor, immunotherapy, resistance, Ibrutinib, PCR, Sanger sequencing.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AID (Activation-induced cytidine deaminase) Επαγόμενη από ενεργοποίηση απαμινάση κυτιδίνης

ASO's (Antisense oligonucleotides) Μη-νοηματικά νουκλεοτίδια

ATM (protein kinase ataxia-telangiectasia mutated) Μεταλλαγμένη πρωτεϊνική κινάση αταξίας - τελαγγειεκτασίας

ATP (adenosine triphosphate) Τριφωσφορική αδενοσίνη

BCR (B cell receptor) Υποδοχέας του Β-κυττάρου

BLNK (B-cell linker protein) Β-κυτταρική συνδετική πρωτεΐνη

BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) Κινάση τυροσίνης του Bruton

CD (cluster of differentiation) Σύμπλεμα διαφοροποίησης

CLL (Chronic Lymphocytic Leukaemia) Χρόνια λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

dNTP (Deoxynucleoside triphosphate) Τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο

FcR (Fc receptors) Υποδοχείς Fc

FDA (U.S. Food and Drug Administration)

GEP (Gene Expression Profiling Data) Δεδομένα για το Προφίλ της Γονιδιακής Έκφρασης

GVHD (Graft - versus - host disease) Νόσος μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή

H αλυσίδα (heavy chain) βαριά αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)

HLA (Human Leukocyte Antigen) Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο

Ig (immunoglobulin) ανοσοσφαιρίνη

IKK (IkB Kinase) Κινάση IkB

ITAM (immunoreceptor tyrosine- based activation motif) μοτίβο ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέα βασισμένο σε τυροσίνη

ITIM (immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif) ανασταλτικό μοτίβο ανοσοϋποδοχέα βασισμένο σε τυροσίνη

IVIG (intravenous immunoglobulin) Ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης

L αλυσίδα (light chain) ελαφρά αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)

NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) Παράγοντας NF-κB

PADs (Primary Antibody Deficiencies) Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες

PBMC's (Peripheral Blood Mononuclear cells) Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος

PCR (Polymerase Chain Reaction) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PH (Plecstrin Homology) Ομολογία πλεξτρίνης

PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) 3,4,5 Τριφωσφορική Φωσφατίδυλοϊνοσιτόλη

PLCγ (Phospholipase C gamma) Φωσφολιπάση Cγ

Pre-B Πρόδρομα B-κύτταρα

Pro-B Προγονικά B-κύτταρα

PTK (Protein Tyrosine Kinase) Πρωτεϊνική Κινάση Τυροσίνης

SH (Src homology) Ομολογία Src

src (Rous sarcoma virus) Ιός σαρκώματος Rous

SYK (Spleen tyrosine kinase) Κινάση Τυροσίνης του Σπλήνα

TCR (T-cell Receptor) Υποδοχέας του T-κυττάρου

TH (Tec Homology) Ομολογία Tec

TK (tyrosine kinase) Κινάση Τυροσίνης

TLR (Toll-like Receptor) Υποδοχέας τύπου Toll

TP53 (tumor protein p53) Ογκογόνος πρωτεΐνη p53

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) Προσδέτης σχετιζόμενος με τον TNF που επάγει την απόπτωση

UV (Ultraviolet) Υπεριώδης ακτινοβολία

XLA (X-Linked Agammaglobulinemia) Συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα X Αγαμμασφαιριναμία

ZAP-70 (Zeta-chain-associated Protein Kinase 70) Σχετιζόμενη με τη ζήτα αλυσίδα πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης 70

ΛΜ Λέμφωμα Μανδύα

MW Μακροσφαιριναμία του Wandelström

ΧΛΛ Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton

1.1.1 Γενικά και ιστορικά στοιχεία

Η αγαμμασφαιριναιμία του Bruton είναι η πρώτη ανοσοανεπάρκεια που περιγράφηκε στον άνθρωπο. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1952, σε ένα οχτάχρονο αγόρι που υπέφερε από πνευμονία, από το στρατιωτικό γιατρό Ogden C. Bruton. Ο γιατρός διαπίστωσε την πλήρη απουσία γ σφαιρινών κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού, με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες να εμφανίζονται φυσιολογικές. Οι γ σφαιρίνες ήταν παρούσες στον ασθενή μόνο στην περίπτωση που χορηγούνταν ενδομυϊκά ανθρώπινες σφαιρίνες του ορού και με την πάροδο έξι εβδομάδων εξαφανίζονταν ξανά. Το γεγονός αυτό υπέδειξε ότι κάποιος μηχανισμός για την παραγωγή των γ σφαιρινών είχε τροποποιηθεί, επηρεάζοντας την ικανότητα του οργανισμού να συνθέτει αντισώματα.(1) Ο φαινότυπος της νόσου χαρακτηρίζεται από σχεδόν παντελή απουσία όλων των τύπων των ανοσοσφαιρινών και σημαντική μείωση του αριθμού των B- κυττάρων στην περιφέρεια.(2)

Το 1993 δημοσίευση στο περιοδικό *Nature* ανέφερε ότι το γονίδιο που εμπλέκεται στην αγαμμασφαιριναιμία του Bruton ανήκει στην οικογένεια των src πρωτο-ογκογονιδίων και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας των κινασών τυροσίνης. Σήμερα είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι η BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), κωδικοποιείται από το γονίδιο *BTK*, και πήρε το όνομά της προς τιμήν του Bruton.(2) Επίσης, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη δημοσίευση, για πρώτη φορά συσχετίζονται μεταλλάξεις src γονιδίου με γενετική ασθένεια του ανθρώπου.(3)

1.1.2 Επιδημιολογία

Η νόσος κληρονομείται με υπολειπόμενο φυλοσύνδετο τρόπο, συνεπώς αν μία μητέρα είναι φορέας της νόσου οι υιοί της έχουν 50% πιθανότητα να νοσήσουν. Λόγω του τρόπου κληρονόμησης αναφέρεται και ως συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα X αγαμμασφαιριναιμία. Εμφανίζεται προσεγγιστικά με συχνότητα 1:380,000 γεννήσεις και εκδηλώνεται στους 6 μήνες με δύο χρόνια ζωής ενός βρέφους όταν σταματά η προστατευτική δράση των μητρικών ανοσοσφαιρινών.(4, 5) Το 70%-80% των ασθενών έχουν θετικό για τη νόσο οικογενειακό ιστορικό, ενώ 20%-30% των περιπτώσεων οφείλονται σε μεταλλάξεις *de novo*.(2)

Οι ετερόζυγες θήλεις φορείς της νόσου είναι υγιείς, καθώς τα B-κύτταρα που εκφράζουν τη φυσιολογική πρωτεΐνη BTK πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν κανονικά. Η επιλεκτική αδρανοποίηση του παθολογικού X χρωμοσώματος και η διατήρηση του υγιούς υπογραμμίζει το εξελικτικό μειονέκτημα που παρουσιάζουν τα προγονικά B- κύτταρα, τα οποία φέρουν το παθολογικό αλληλίο.(6) Ωστόσο, μία σπάνια εξαίρεση έχει περιγραφεί από τους Takada et al. και αποτελεί το περιστατικό μίας νεαρής γυναίκας, η οποία εμφάνιζε όλα τα συμπτώματα της XLA. Ο πατέρας της έπασχε από τη νόσο και μελέτες αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X έδειξαν ότι το ενεργό χρωμόσωμα ήταν του πατέρα, αυτό δηλαδή που έφερε τη μετάλλαξη του BTK.(7)

1.1.3 Παθοφυσιολογία, Παθογένεση και Κλινική εικόνα νόσου

Οι ανοσοανεπάρκειες υποδηλώνουν την ανικανότητα του ανοσιακού συστήματος να αποκριθεί φυσιολογικά στα ξένα αντιγόνα, είτε λόγω ελλειπών ανάπτυξης του είτε λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας του. Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι μία ετερογενής ομάδα, που περιλαμβάνει σπάνια νοσήματα τα οποία μπορεί να αφορούν τόσο την προσαρμοστική όσο και την έμφυτη ανοσία, αλλά το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι αυξάνουν την επιρρέπεια των ασθενών σε λοιμώξεις. Εκδηλώνονται νωρίς, συνήθως κατά την παιδική ηλικία. Η συχνότητά τους στις ΗΠΑ υπολογίζεται ως 1 στις 1,200 γεννήσεις με την IgA ανεπάρκεια να είναι η πιο κοινή με 1 στις 300-500 γεννήσεις. (8)

Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία είναι καίριας σημασίας για την εξέλιξη της εκάστοτε νόσου, ωστόσο υπάρχει υποδιάγνωση και ορισμένες φορές τα παιδιά πεθαίνουν πρώιμα από τις υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Οι δευτεροπαθείς ανοσοανεπάρκειες διαφέρουν από τις πρωτοπαθείς, καθώς εκδηλώνονται συνήθως σε μεγαλύτερη ηλικία και μπορεί να προκληθούν από λοιμώξεις, κακή διατροφή και χρήση φαρμάκων ή ανοσοκατασταλτικών. Οι περισσότερες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες κλινικά εκδηλώνονται με ασυνήθεις λοιμώξεις από ασυνήθεις μικροοργανισμούς ή μικροοργανισμούς που σε έναν οργανισμό με φυσιολογικό ανοσιακό σύστημα δε θα προκαλούσαν νόσο. Επίσης, η διάρκεια και η απόκριση στα αντιβιοτικά ποικίλουν και διαφέρουν από τα συνήθη.(9)

Ορισμένα βασικά κριτήρια που μπορεί να υποψιάσουν τον κλινικό γιατρό για την ύπαρξη ανοσοανεπάρκειας είναι τα ακόλουθα: ≥ 8 νέες λοιμώξεις των ωτών μέσα σε ένα χρόνο, ≥ 2 σοβαρές λοιμώξεις των ιγμορείων μέσα σε ένα χρόνο, ≥ 2 μήνες σε αντιβιοτικά με μικρό αποτέλεσμα, ≥ 2 πνευμονίες μέσα σε ένα χρόνο, αδυναμία του νεογνού να πάρει βάρος ή να αναπτυχθεί φυσιολογικά, υποτροπιάζοντα δερματικά ή οργανικά αποστήματα, επίμονο εξάνθημα στο στόμα ή σε άλλο σημείο του δέρματος μετά την ηλικία του ενός έτους, ανάγκη

χορήγησης ενδοφλέβιων αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, ≥ 2 εν τω βάθει λοιμώξεις, οικογενειακό ιστορικό πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας.(8)

Οι πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες, παρόλο που καθεμιά από αυτές έχουν διαφορετική αιτιολογία, συγκλίνουν στο ότι υπάρχει ανικανότητα διαμόρφωσης αποτελεσματικής χυμικής ανοσίας, ώστε αυτή να μπορεί να εξουδετερώσει τα παθογόνα που εισβάλλουν στον οργανισμό. Η ετερογένεια αυτών των νοσημάτων προσδίδει την ποικιλία στα επιμέρους συμπτώματα που εμφανίζεται σε καθένα από αυτά.(4)

Η XLA συμπεριλαμβάνεται στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, μία ομάδα που περιλαμβάνει πάνω από 200 νοσήματα, και εκδηλώνεται κατά την παιδική ηλικία, συνήθως μέχρι τα δύο πρώτα έτη, αλλά υπάρχουν και σπάνιες περιπτώσεις ενηλίκων οι οποίοι έχουν αγαμμασφαιριναιμία και στους οποίους ανευρίσκονται μεταλλάξεις στο *BTK* μετά τη διάγνωση κάποιου συγγενούς άρρενος με τη νόσο.(7, 9) Είναι μονογονιδιακή νόσος που αφορά τον προσαρμοστικό κλάδο του ανοσιακού συστήματος και συγκεκριμένα τα B- κύτταρα και το γονίδιο *BTK*. Η συχνότητα της νόσου αναφέρεται προσεγγιστικά ως 1 περιστατικό στα 380,000. (4) Οι ανοσοανεπάρκειες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των B- κυττάρων οδηγούν συνήθως σε διαταραχές της αντισωματικής απόκρισης και αποτελούν το 50% των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συμπτώματα συνήθως μετά την ηλικία των 6 μηνών, καθώς τότε σταματά η δράση των προστατευτικών ανοσοσφαιρινών της μητέρας. Στους ασθενείς αυτούς τα επίπεδα των τάξεων των αντισωμάτων στον ορό είναι ελάχιστα ή απόντα ή ακόμη μπορεί να είναι φυσιολογικά ή αυξημένα χωρίς να έχουν, όμως, φυσιολογική λειτουργία.(8)

Απουσία της *BTK*, τα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν σε ώριμα B-κύτταρα.(10) Συνεπώς, οι ασθενείς έχουν πολύ λίγα B-κύτταρα στην κυκλοφορία και τα αντισώματα είναι σχεδόν απόντα στον ορό. (11) Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα δευτερογενή λεμφικά όργανα στα οποία λαμβάνει χώρα η ωρίμανση των B-κυττάρων, όπως ο σπλήνας, οι αμυγδαλές και οι περιφερικοί λεμφαδένες, να μειώνονται σε μέγεθος και να ατροφούν.(2) Επίσης, τα B-κύτταρα ελλείπει *BTK* έχουν αυξημένη πιθανότητα να οδηγηθούν στην απόπτωση, γεγονός που σχετίζεται με τη μείωση της επαγωγής του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-xL από τον BCR. (11)

Οι ασθενείς εμφανίζουν επίμονη ιγμορίτιδα, ωτίτιδες και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού. (11) Ακόμη, είναι επιρρεπείς σε λοιμώξεις από βακτήρια με καψίδιο, κυρίως του αναπνευστικού συστήματος και σε λοιμώξεις που προκαλούνται από εντεροϊούς, όπως η πολιομυελίτιδα. (5) Κάποια από τα παθογόνα από τα οποία μπορεί να προσβληθούν οι

ασθενείς είναι τα *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* και *Pseudomonas*. Κατά τη λοίμωξη από τον *Streptococcus pneumoniae* για παράδειγμα, δεν υπάρχουν αντισώματα που θα προσκολληθούν στον μικροοργανισμό, προκειμένου να προάγουν την οψωνινοποίηση και επακόλουθη φαγοκυττάρωσή του. Επίσης, έχουν ενοχοποιηθεί μυκοπλάσματα και το *Ureaplasma* για την πρόκληση αρθρίτιδας και ουρολοιμώξεων, αντίστοιχα. Ακόμη, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αυτοάνοσης νόσου και δερματικών μολύνσεων που μπορεί να προκληθούν από την Α ομάδα *streptococci* και τον *Staphylococcus aureus*. Ακόμη, είναι αυξημένος και ο κίνδυνος εμφάνισης λεμφωμάτων.(2)

1.1.4 Διάγνωση της νόσου

Καίριας σημασίας για τη διάγνωση της νόσου είναι η λήψη οικογενειακού ιστορικού, προκειμένου να διαπιστωθεί η συχνότητα εισαγωγών σε νοσοκομεία ή ο θάνατος αγοριών σε παιδική ηλικία που υποδεικνύουν την ύπαρξη της XLA. Επίσης, η παρουσία υποτροπιάζουσών λοιμώξεων, οι οποίες δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν κάποιες φορές με αντιβιοτικά και το μικρό μέγεθος των δευτερογενών λεμφικών οργάνων μπορούν να οδηγήσουν σε διάγνωσή της. Ένα ακόμη στοιχείο είναι η διάρροια που προκαλείται συχνά μετά από λοίμωξη με κοινούς μικροοργανισμούς, όπως οι *Giardia*, *C jejuni*, *Shigella*, και *Salmonella*. Επίσης, ένας δείκτης είναι η ύπαρξη κυτταρίτιδας των κάτω άκρων που μπορεί να συνοδεύεται από πυρετό, ο οποίος προκαλείται από το *Helicobacter bilis*.(2) Επιπλέον, για τη διάγνωση της XLA μπορούν να πραγματοποιηθούν ειδικά εργαστηριακά τεστ για τον τίτλο των αντισωμάτων στον ορό και κυτταρομετρία ροής για τη διαπίστωση απουσίας B-κυττάρων όταν η νόσος είναι παρούσα. Τέλος, καθίσταται ανάγκη να χρησιμοποιηθούν γενετικά τεστ, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και η αλληλούχιση του γονιδίου *BTK*, για την ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη νόσο.(5)

1.1.5 Αιτιολογία της νόσου

Η αγαμμασφαιριναιμία του Bruton οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *BTK*, που κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη.(2) Η BTK είναι κινάση τυροσίνης, δηλαδή φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της σε αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης και με αυτό τον τρόπο αλλάζει τη δραστηριότητα ή την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Αποτελεί ένα από τα πέντε μέλη των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης Tec που δεν εντάσσονται στην κατηγορία των υποδοχέων.(11) Ο ρόλος της πρωτεΐνης BTK στα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα έγκειται στην

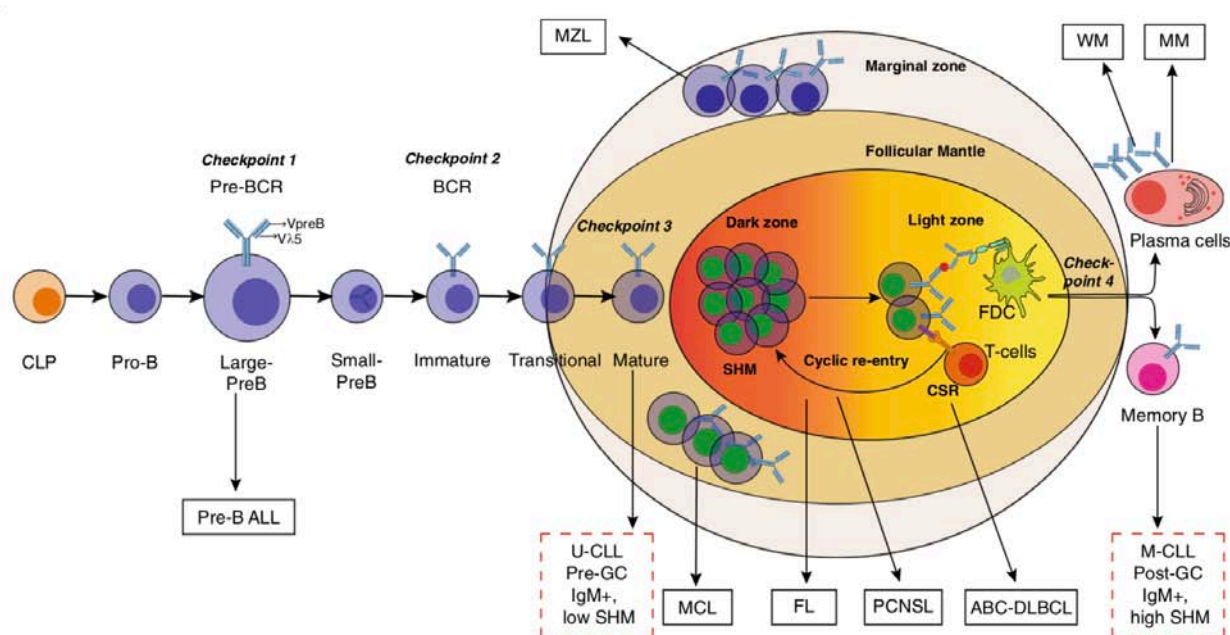
ωρίμανση τους και στα ώριμα B-λεμφοκύτταρα στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους. **(12)**

Τα B-κύτταρα προέρχονται από τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών κατά τη διάρκεια της ζωής. Προκειμένου να εκφράσουν ανοσοσφαιρίνες τα B-κύτταρα είναι απαραίτητο να προηγηθεί αναδιάταξη των βαρέων (IGH) και ελαφριών (IGL) γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Μετά τον παραγωγικό ανασυνδυασμό των τμημάτων V, D και J τμημάτων των γονιδίων των βαρέων αλυσίδων, εμφανίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ο υποδοχέας pre-BCR. Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα ισοτύπου μ και δύο αναπληρωματικές ελαφριές αλυσίδες, τις VpreB και $\lambda 5$. Το στάδιο του pre-BCR υποδοχέα αποτελεί ένα σημαντικό σημείο ελέγχου για τον έλεγχο της λειτουργικότητας της βαριάς αλυσίδας μ . Το φαινόμενο του αλληλόμορφου αποκλεισμού, δηλαδή η αναστολή της περαιτέρω VDJ αναδιάταξης, είναι μία σημαντική λειτουργία της pre-BCR σηματοδότησης. Η pre-BCR σηματοδότηση απαιτείται, επίσης, για τον πολλαπλασιασμό των pre-BCR κυττάρων και την αναστολή της περαιτέρω έκφρασης των γονιδίων των αναπληρωματικών ελαφριών αλυσίδων, οπότε τα pre-B κύτταρα μεταβαίνουν από των στάδιο των μεγάλων διαιρούμενων κυττάρων στο στάδιο των μικρών ήρεμων κυττάρων, ώστε να ξεκινήσει η αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. **(11)**

Η BTK δεν εκφράζεται στα προγονικά B-κύτταρα, αλλά είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τα πρώιμα προ-B (pro-B) στα πρόδρομα B (pre-B) και ανώριμα B-κύτταρα. Στα προγονικά B-κύτταρα η BTK είναι μη φωσφορυλιωμένη άρα και ενζυμικά ανενεργή. Στα προ-πρόδρομα, πρόδρομα και ανώριμα B-κύτταρα η απόκριση της BTK επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης της IL-7 με τον υποδοχέα και αλλαγών της κυτταρικής επιφάνειας. Στα ώριμα B-κύτταρα το έναυσμα για την ενεργοποίηση της BTK δίνεται από την πρόσδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα BCR. Στη συνέχεια, η BTK φωσφορυλιώνεται από την κινάση SYK στη θέση Y551, γεγονός που οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωσή της στη θέση Y223 στην επικράτεια SH3. Έτσι, σταθεροποιείται η ενεργή διαμόρφωση και δραστηριότητα της πρωτεΐνης, η οποία πριν την ενεργοποίησή της εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και αφού ενεργοποιηθεί μετακινείται κοντά στη μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. **(11)**

Στην XLA η ανάπτυξη των B-κυττάρων διακόπτεται στο στάδιο του πρόδρομου B-κυττάρου. Δηλαδή, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αυτών που πάσχουν εισέρχονται στη γενεαλογία του B-κυττάρου, αλλά δεν μπορούν να προχωρήσουν σε επόμενα στάδια. **(7)** Η BTK είναι καίριας σημασίας για την επαγωγή των μεταγράφων των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών της γαμετικής σειράς, που σχετίζονται με την προσβασιμότητα του επιτόπου.

Μελέτες σχετικές με το μεταγράφημα έχουν δείξει ότι pre-BCR κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη της BTK αποτυγχάνουν να ρυθμίσουν αποτελεσματικά πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Σε περίπτωση που η αναδιάταξη αυτή δεν είναι παραγωγική ή προκύψει ένας BCR ο οποίος είναι αυτοδραστικός τότε το B-κύτταρο υποβάλλεται σε μία διαδικασία επεξεργασίας του υποδοχέα (receptor editing), προκειμένου να πραγματοποιηθεί ξανά αναδιάταξη των ελαφριών αλυσίδων. (11)



Εικόνα 1. Ωρίμανση και διαφοροποίηση του B-κυττάρου.
(Pal Singh, S., Dammeijer, F. and Hendriks, R. (2018). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Molecular Cancer*, 17(1))

Στο στάδιο του ανώριμου πλέον B-κυττάρου, τα B-κύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο σπλήνα, όπου συνεχίζεται η επιλογή και ωρίμανση σε ένα σημείο που υπάρχουν τόσο T1 όσο και T2 (μεταβατικά στάδια των B-κυττάρων στο ποντίκι) B-κύτταρα. Στα ποντίκια, ένας μηχανισμός περιφερικής ανοχής φαίνεται ότι αποτελεί η διαφοροποίηση είτε προς T1 είτε προς T2 B-κύτταρα, με τα πρώτα να είναι ευαίσθητα στην απόπτωση. Απουσία της BTK, ο αριθμός των B-κυττάρων στην περιφέρεια μειώνεται κατά πολύ, καθώς τα T2 κύτταρα δεν παράγουν σήματα επιβίωσης με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει η μετάβαση στο στάδιο του ώριμου κυττάρου. Ακόμη, απουσία της BTK στα ποντίκια έχει δείξει ότι αυτά στερούνται του πληθυσμού B1 κυττάρων που απαντάται στην περιτοναϊκή και πλευρική κοιλότητα. (11)

Μετά την πρόσδεση του αντιγόνου και την ενεργοποίηση των B-κυττάρων κάποια από αυτά μεταναστεύουν στα βλαστικά κέντρα, όπου πολλαπλασιάζονται και υφίστανται σωματικές

υπερμεταλλάξεις παρουσία του ενζύμου AID. B-κύτταρα από τα βλαστικά κέντρα επιλέγονται μαζί με δενδριτικά και T-βοηθητικά κύτταρα βάση της συγγένειάς τους με το αντιγόνο. Σε ποντίκια που δεν εκφράζουν BTK οι T-αποκρίσεις δεν επηρεάζονται, σε αντίθεση με τις B. Σε ποντίκια που υπερεκφράζεται μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης δε δημιουργούνται βλαστικά κέντρα, ενώ σε ποντίκια που υπερεκφράζεται η φυσιολογική της μορφή βλαστικά κέντρα δημιουργούνται αυθόρμητα. Επομένως, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδηγεί σε αυτοανοσία που επάγεται από τα B-κύτταρα, διαταράσσει ωστόσο και την ομοιόσταση των T-κυττάρων. **(11)**

1.1.6 Θεραπεία

Θεραπεία για τη νόσο αυτή καθεαυτή δεν υπάρχει. Η θεραπεία υποκατάστασης που πλέον χρησιμοποιείται ευρέως και έχει θεαματικά αποτελέσματα στους ασθενείς είναι η ενδοφλέβια χορήγηση γ σφαιρινών ή θεραπεία με IVIG, ενώ η χορήγηση μπορεί να γίνει και υποδόρια (SCIG) όντας εξίσου αποτελεσματική. **(8)** Η προφύλαξη των ασθενών με την τήρηση καλής προσωπικής υγιεινής είναι σημαντική για την αποφυγή των λοιμώξεων. Όταν ένας ασθενής με XLA μολυνθεί με κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό χορηγούνται αντιβιοτικά κατά τη διάρκεια της ενεργούς λοίμωξης για 10-14 μέρες, ενώ στην πλειοψηφία των ασθενών ακολουθείται χρόνια προφυλακτική αγωγή με αντιβιοτικά. Άλλη μία εναλλακτική είναι η μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT), αν και έγκειται ο κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος και δράσης του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (Graft Versus Host Disease), ενώ η μέθοδος είναι επίπονη και η εύρεση συμβατού δότη εξαιρετικά δύσκολη.

Με τη βοήθεια της θεραπείας υποκατάστασης έχει μειωθεί ο αριθμός των εισαγωγών σε νοσοκομεία και των λοιμώξεων, μειώνοντας τη θνησιμότητα, ενώ ο αριθμός των ασθενών με XLA που ζουν μέχρι τη μέση ηλικία και πάνω έχει αυξηθεί. **(7)** Σε βρέφη που διαπιστώνεται η ύπαρξη της νόσου σε προγεννητικό στάδιο, λόγω της ύπαρξης οικογενειακού ιστορικού, η θεραπεία υποκατάστασης πρέπει να ξεκινά μεταξύ της 10ης και 12ης εβδομάδας. **(7)** Κάποια από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ο δότης από τον οποίο προέρχονται οι γ σφαιρίνες δεν έχει εκτεθεί σε όλα τα παθογόνα, οπότε δεν εξαιρείται η πιθανότητα λοίμωξης των ληπτών από κάποιους μικροοργανισμούς. Εκτός αυτού, υποκαθίστανται μόνο οι γ τύποι ανοσοσφαιρινών και όχι οι μ και α, οι οποίοι έχουν διαφορετικό δυναμικό από τις γ. Τέλος, η παθητική ανοσιακή απάντηση μέσω IVIG δεν είναι σίγουρα η ίδια με την αντισωματική απάντηση που παρατηρείται σε ένα υγιές άτομο μετά την επαφή με ένα ξένο αντιγόνο. **(5)** Στις

παρενέργειες της μεθόδου περιλαμβάνονται πονοκέφαλος, μυαλγία, ταχυκαρδία, πόνος χαμηλά στην πλάτη, ναυτία και υπόταση.

Μία εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση που θα μπορούσε μελλοντικά να λάβει χώρα είναι η γονιδιακή θεραπεία με τη βοήθεια της οποίας το φυσιολογικό *BTK* γονίδιο θα εισέρχεται στα προγονικά αιμοποιητικά B- κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο η ασθένεια θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί οριστικά. Η εισαγωγή στα κύτταρα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με φορείς, όπως οι ρετροϊοί και ειδικοί για την B- κυτταρική σειρά λεντοϊοί (Lentivirus). Ωστόσο, οι ρετροϊοί ενσωματώνονται τυχαία στο γονιδίωμα και θα μπορούσαν να διαταράξουν τη λειτουργία ενός πρωτο-ογκογονιδίου με αποτέλεσμα αυτό να μετατραπεί σε ογκογονίδιο και να οδηγήσει σε κακοήθεις διαταραχές, ενώ κατά τη διάρκεια προσπαθειών με τη χρήση λεντοϊών δεν ανιχνεύθηκε μετασχηματιστική δραστηριότητα.(13) Επιπλέον, η μελλοντική χρήση ASOs (Antisense Oligonucleotides) θα μπορούσε να βοηθήσει στη ρύθμιση του ματίσματος του πρόδρομου mRNA και τη διαφορική έκφραση γονιδίων. (14) Η γονιδιακή θεραπεία, μέσω της τροποποίησης του υπό μελέτη γονιδίου (gene editing), θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή προσέγγιση. Με τη μέθοδο αυτή θα μπορούσε να γίνει επιδιόρθωση του σχετιζόμενου με την ασθένεια γονιδίου στην περιοχή όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη πάνω στο χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να αποκαθίσταται η κανονική του λειτουργία και να επανακτάται η φυσιολογική του έκφραση.(15)

1.2 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

1.2.1 Παθογένεση, διάγνωση, θεραπεία

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι κοινή μορφή λευχαιμίας που παρουσιάζεται στους ενήλικες και χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, τον μυελό των οστών και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. (16) Είναι μία χρόνια λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι ο μονοκλωνικός B-κυτταρικός πολλαπλασιασμός.(17) Επίσης, χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ώριμων κυκλοφορούντων B-κυττάρων με χαμηλή έκφραση IgM και θετικά για το δείκτη CD5, και από ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του υποδοχέα BCR είτε αυτός συνδέεται είτε όχι με κάποιο αντιγόνο.(11)

Η ΧΛΛ έχει αναφερθεί ότι έχει γενετική βάση και εμφανίζεται σε οικογένειες, με την ηλικία εμφάνισης της νόσου στα παιδιά να είναι 20 χρόνια νωρίτερα σε σύγκριση με τους γονείς. Όσο για την επιδημιολογία της νόσου φαίνεται να αποτελεί το 25%-30% του συνόλου των

λευχαιμιών στις ΗΠΑ. Αν και η ΧΛΛ εμφανίζεται ελαφρώς πιο συχνά στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, στις γυναίκες φαίνεται ότι εκδηλώνεται με μία πιο επιθετική μορφή. Παρόλο που η ηλικία διάγνωσης είναι συνήθως κοντά στα 70 έτη μπορεί να προσβάλει και ενήλικες στην ηλικία των 30 ετών. Όσο για τη φυλετική προδιάθεση, αυτή είναι πιο συχνή στους Καυκάσιους και λιγότερο συχνή στους Ασιάτες με τους Αφροαμερικανούς να είναι μεταξύ των δύο. Ορισμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί είναι γνωστό ότι προδιαθέτουν κάποια άτομα να αναπτύξουν τη νόσο.(17)

Στη ΧΛΛ τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε συγκεκριμένα ανατομικά σημεία που ονομάζονται κέντρα πολλαπλασιασμού και αποτελούν το σήμα κατατεθέν των ιστοπαθολογικών ευρημάτων. Εκεί μαζί με άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και με τα στρωματικά κύτταρα δημιουργείται το μικροπεριβάλλον της νόσου. Στη ΧΛΛ υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποδεικνύουν τη σημαντικότητα του BCR μονοπατιού, όπως αυτά που προκύπτουν από GEP (Gene Expression Profiling), οι οποίες μετρούν την έκφραση χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα ώστε να σχηματιστεί μία εικόνα της λειτουργίας του κυττάρου, και καθιστούν το μονοπάτι σηματοδότησης του BCR κυρίαρχο σε ΧΛΛ κύτταρα που έχουν απομονωθεί από περιοχές πολλαπλασιασμού στους λεμφικούς ιστούς.(18)

Ένας από τους προγνωστικούς δείκτες γενετικού υπόβαθρου για τη νόσο είναι οι ελλείψεις χρωμοσωμικών περιοχών, όπως της 17p13 που περιέχει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, της 11q23 που περιέχει την πρωτεΐνη ATM η οποία είναι σημείο ελέγχου καταστροφής του DNA, της 13q14 και της τρισωμίας του χρωμοσώματος 12. Μετάλλαξη του TP53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου μπορεί να παρατηρηθεί στο εναπομείναν αλληλόμορφο όταν υπάρχει έλλειψη της περιοχής 17p στο άλλο, σε ποσοστό πάνω από 80%, καθιστώντας τους ασθενείς αυτούς ως “υψηλού κινδύνου” με συχνά μικρή απόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και απουσία της έλλειψης της 17p περιοχής σε ορισμένους ασθενείς.(11)

Οι BCRs σε ασθενείς με ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από διαφορετική χρήση των γονιδίων IGHV IGLVκ/λ, σε σχέση με τα φυσιολογικά B-κύτταρα,. Πολύ συχνά οι αναδιατάξεις των γονιδίων αυτών γίνονται με τρόπο τέτοιο ώστε να προκύπτουν παρόμοιες μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες και συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές 3 των βαρέων αλυσίδων, υποστηρίζοντας την αντίληψη ότι η επιλογή και επέκταση των καρκινικών κλώνων στη ΧΛΛ εξαρτάται από αντιγόνο. Μία από τις μοριακές γενετικές παραμέτρους που προσδιορίζουν την παθογονικότητα και την πρόγνωση της ΧΛΛ είναι η μεταλλαξιγένεση των γονιδίων VH. Στη ΧΛΛ με μη

μεταλλαγμένα VH γονίδια παρατηρείται ραγδαία εξέλιξη της νόσου, ενώ στη ΧΛΛ με μεταλλαγμένα VH γονίδια παρατηρείται αργή πρόοδος της νόσου και μακρά επιβίωση.(19)

Άλλος ένας προγνωστικός δείκτης της ΧΛΛ είναι η σχετιζόμενη με τη ζήτα αλυσίδα πρωτεϊνική κινάση 70 (ZAP-70). Η κινάση αυτή, αρχικά, ταυτοποιήθηκε στα T-κύτταρα και στη συνέχεια στα ενεργοποιημένα φυσιολογικά, αλλά όχι παρθένα, B-λεμφοκύτταρα και παίζει ρόλο στη σηματοδότηση που μεσολαβείται από τον TCR στα T- και από τον BCR στα B-κύτταρα, αντίστοιχα. Δομικά είναι όμοια με την κινάση SYK των B-κυττάρων και εκφράζεται σε ένα υποσύνολο ασθενών με ΧΛΛ. Σε ασθενείς των οποίων τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν τη ZAP-70 σε ποσοστό >20%, ο μέσος χρόνος που μεσολαβεί από τη διάγνωση στην αρχική θεραπεία είναι σχετικά λιγότερος, καθώς η ZAP-70 φαίνεται να αποτελεί ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου για επιθετική ΧΛΛ σε σύγκριση με την έλλειψη μεταλλάξεων στα IGHV γονίδια. Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής συνδέεται με αυξημένη αποκρισιμότητα σε ορισμένες χημειοκίνες, ευνοώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μετανάστευση των λευχαιμικών κυττάρων.(18)

Οι CCL3 και CCL4 είναι χημειοκίνες που επάγονται σε κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσιακού συστήματος. Η πρώτη αποτελεί προγνωστικό δείκτη στη ΧΛΛ, ο οποίος μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί με τη μέθοδο ELISA, και τα επίπεδά της σε ασθενείς με ΧΛΛ σχετίζονται με άλλους προγνωστικούς δείκτες για τη νόσο. Είναι σημαντικό ότι και οι δύο χημειοκίνες έχουν σχετιστεί με χειρότερη έκβαση της ΧΛΛ. Η μεταγωγή του σήματος γίνεται μέσω των υποδοχέων τους και έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων. Σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά B-κύτταρα και σε απόκριση στη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα BCR, προάγεται η ρύθμιση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη CCL3. Πιθανώς, η τελευταία να προσελκύει και άλλα κύτταρα δημιουργώντας ένα μικροπεριβάλλον κατάλληλο για την αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα T-κύτταρα, προκειμένου να λάβουν σήματα επιβίωσης.(18)

Για τη διάγνωση της ΧΛΛ μπορεί να πραγματοποιηθεί κυτταρομετρία ροής, σε περιφερικό αίμα, προκειμένου να προσδιοριστεί ο ανοσοφαινότυπος των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια. Χαρακτηριστικοί δείκτες για τα ΧΛΛ κύτταρα όπως τα CD19, CD5, CD20, CD23, χαμηλά επίπεδα των μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών IgM και IgD και υπεροχή ενός τύπου ελαφριάς αλυσίδας υποδεικνύουν τη μονοκλωνικότητα των λεμφοκυττάρων. (20) Η πορεία της ΧΛΛ ποικίλει και ο χρόνος επιβίωσης μπορεί να είναι μήνες ή δεκαετίες.(19) Η νόσος μπορεί να μην εκδηλώσει συμπτώματα, αλλά μπορεί και να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα. Οι ασθενείς συχνά διαγιγνώσκονται με λεμφοκυττάρωση, ενώ σε κάποιους παρατηρείται διόγκωση

των λεμφαδένων. Ένα μικρό ποσοστό των ασθενών παρουσιάζουν συμπτώματα όπως ο πυρετός, απώλεια βάρους, νυχτερινή εφίδρωση και κόπωση. Στα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται, επίσης, υπερευαισθησία σε δήγματα εντόμων, αυτοάνοσες αιμολυτικές αναιμίες και λοιμώξεις. Εκτός αυτών μπορούν να παρατηρηθούν σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία, καθώς και καρκίνος του δέρματος, που είναι συχνή επιπλοκή της ΧΛΛ.(17)

Η θεραπεία για τη ΧΛΛ εξαρτάται από τον ασθενή, καθώς σε κάποιους η νόσος δεν εμφανίζει συμπτώματα, ενώ σε άλλους παρατηρούνται σοβαρά συμπτώματα ή η εξέλιξή της είναι ραγδαία. Η χλωραμβουκίλη είναι η πιο παλιά και γνωστή θεραπεία για τη ΧΛΛ, χωρίς πλήρη ύφεση. Συνδυασμοί ανθρακυκλινών χρησιμοποιούνται συχνά με παρόμοιες ή ίσως και καλύτερες αποκρίσεις σε σχέση με τη χλωραμβουκίλη, αλλά χωρίς αλλαγή στην επιβίωση. Εκτός αυτών, ένα πουρινικό ανάλογο, το fludarabine, είναι το πιο ευρέως δοκιμασμένο και χρησιμοποιούμενο νουκλεοσιδικό ανάλογο στη ΧΛΛ. Επιπλέον, η συνέργεια μεταξύ αλκυλιωτικών και νουκλεοσιδικών αναλόγων που οδηγεί σε πρόκληση βλάβης στο DNA και αναστολή της επιδιόρθωσής του, έχει οδηγήσει σε δοκιμές με τον συνδυασμό αυτών των δύο. (19) Οι ασθενείς χωρίς συμπτώματα παρακολουθούνται κάθε τρεις μήνες, ενώ σε ασθενείς κάτω των 70 ετών η πιο δημοφιλής θεραπεία είναι το Ibrutinib. Όσοι δεν μπορούν να λάβουν το Ibrutinib τους χορηγούνται φάρμακα όπως η χλωραμβουκίλη και αντι-CD20 αντισώματα. Σε πολύ νέους ασθενείς με πολύ επιθετική μορφή της νόσου, λόγω έλλειψης του τμήματος 17p, συνίσταται μεταμόσχευση του μυελού των οστών από HLA συμβατούς δότες.(17) Ωστόσο, κάποια από τη μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η εκδήλωση τοξικότητας και το υψηλό κόστος. Ακόμη, υπάρχει ο κίνδυνος αντίδρασης του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (graft-versus-host disease).(19)

Αν και το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab (αντι-CD20) έχει εκδηλώσει θεαματικά αποτελέσματα σε ασθενείς με Β-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, αρχικά στη ΧΛΛ φάνηκε να μην έχει κάποιο αποτέλεσμα. Ωστόσο, εναλλακτικά σχήματα δόσεων και διαφορετικοί πληθυσμοί ασθενών απέδειξαν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στη νόσο. Παρόλα αυτά, πολλοί από τους ασθενείς που αποκρίνονται στο φάρμακο αποκρίνονται μερικώς και όχι πλήρως, με το μυελό των οστών να είναι το πιο δύσκολα θεραπεύσιμο σημείο. Ο συνδυασμός fludarabine και rituximab έχει δείχθει ότι έχει υψηλά ποσοστά απόκρισης σε ασθενείς με ΧΛΛ που δεν έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία. Ένα άλλο μονοκλωνικό ανθρώπινο IgG αντίσωμα το οποίο στοχεύει το δείκτη CD52, ο οποίος εκφράζεται στα φυσιολογικά Β-, Τ-κύτταρα, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα είναι το Alemtuzumab. Ωστόσο, η τοξικότητα που προκαλείται μετά από έγχυσή του έχει αναχαιτίσει τη χρήση του σε ασθενείς. Προκαλεί σημαντική

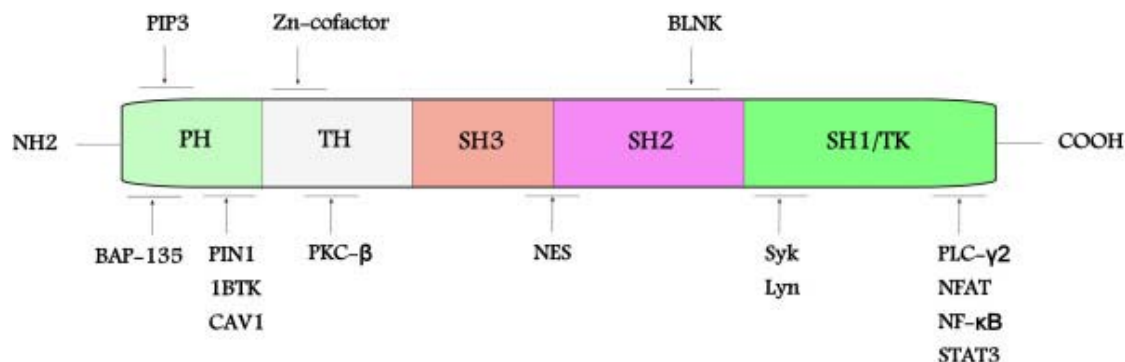
λεμφοπενία με αποτέλεσμα την επιρρέπεια των ασθενών σε μικροβιακές λοιμώξεις. Και σε αυτή την περίπτωση ο συνδυασμός του με το fludarabine έχει διερευνηθεί. Εξαιτίας της αυξημένης τους ειδικότητας τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν εγείρει το ερώτημα αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοενισχυτικά στη χημειοθεραπεία κατά τη ΧΛΛ. (19)

Υπάρχουν πολλές νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που αφορούν τη ΧΛΛ και βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών. Η πιο πολλά υποσχόμενη βασίζεται στο flavopiridol που είναι ένας αναστολέας κινάσης εξαρτώμενος από κυκλίνη. Επιπλέον, πολλά άλλα μονοκλωνικά αντισώματα υπεισέρχονται στη φάση των κλινικών δοκιμών, όπως αντι-CD20 τεχνητά αντισώματα, όπως τα Ofatumumab και Obinutuzumab που έχουν εγκριθεί από τον FDA(21), τα DR4 και DR5 εναντίον του υποδοχέα TRAIL και μόρια που μοιάζουν με αντισώματα και στοχεύουν το δείκτη CD37. Η ανοσοτοξίνη Ontak που είναι προσδέτης του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 έχει, επίσης, μπει σε δοκιμή αλλά η τοξικότητα και το υψηλό κόστος είναι περιοριστικοί παράγοντες. Τέλος, σε περίπτωση ανθεκτικότητας και μη ανοχής του Ibrutinib κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα των idelalisib, το οποίο είναι αναστολέας της PI3K με ειδικότητα έναντι της ισομορφής δ της καταλυτικής επικράτειας της κινάσης που εκφράζεται κατά προτίμηση στα λευκοκύτταρα, και venetoclax.(21) Συνολικά σε κάθε ασθενή θα πρέπει να ακολουθείται διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση η οποία εξαρτάται από το προσδόκιμο επιβίωσης, την ηλικία και την τοξικότητα του εκάστοτε παράγοντα που χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό μέσο.

1.3 Γονίδιο *BTK* και Πρωτεΐνη

Το γονίδιο *BTK* εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή Xq21.3-Xq22.(22) Συνολικά καλύπτει 37.5 kb και αποτελείται από 18 εξόνια.(23) Κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης του Bruton, η οποία στην ανενεργή μορφή της εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 659 αμινοξέα και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ωρίμανση, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των B-κυττάρων.(24) Όπως έχει αναφερθεί, ανήκει στην οικογένεια Tec των κινασών τυροσίνης που δεν εντάσσονται στην κατηγορία των υποδοχέων (non-receptor protein-tyrosine kinases) και φέρει 5 δομικές επικράτειες. Αυτές περιλαμβάνουν την επικράτεια πλεξτρίνης PH που φέρει την πρωτεΐνη κοντά στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μέσω πρόσδεσης στα λιπίδια φωσφατιδυλοϊνσιτόλης, και βοηθά την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες και μόρια που λειτουργούν ως δεύτερα μηνύματα,. Την πλούσια σε προλίνη επικράτεια TH που είναι χαρακτηριστική της οικογένειας των κινασών Tec και περιέχει την περιοχή δέσμευσης Zn^{+} ,

τρεις επικράτειες ομολογίας Src, τις SH2, SH3 που περιέχουν τις θέσεις αυτοφωσφορλίωσης και την SH1/TK. Η τελευταία αποτελεί την καταλυτική καρβοξυτελική επικράτεια κινάσης.(25)



BTK Structure and it's interacting proteins

Εικόνα 2. Δομή της BTK και πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης.
(Akintunde Akinleye, Yamei Chen, Nikhil Mukhi, Yongping Song and Delong Liu, Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development, Akinleye et al. Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:59)

1.3.1 Έκφραση της BTK στα κύτταρα του αίματος και η θέση της στα μονοπάτια σηματοδότησης

Ο χυμικός κλάδος του ανοσιακού συστήματος περιλαμβάνει την παραγωγή αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα, τα οποία αποτελούν το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των Β-κυττάρων και είναι ζωτικής σημασίας για την εξουδετέρωση πολλών παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως εξωκυττάρων. Το ταξίδι των Β-κυττάρων ξεκινά από τον μυελό των οστών, όπου αναπτύσσονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και υποβάλλονται σε μία σειρά αναπτυξιακών διαδικασιών μέχρις ότου να ωριμάσουν και να βγουν στην περιφέρεια. Μία από τις διαδικασίες αυτές περιλαμβάνει την αναδιάταξη των γονιδίων του υποδοχέα του Β-κυττάρου, BCR. Η επιτυχής έκφραση μίας βαριάς και μίας ελαφριάς αλυσίδας στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κυττάρου του επιτρέπουν να διαφοροποιηθεί περαιτέρω σε ώριμο, παρθένο Β-κύτταρο. (4)

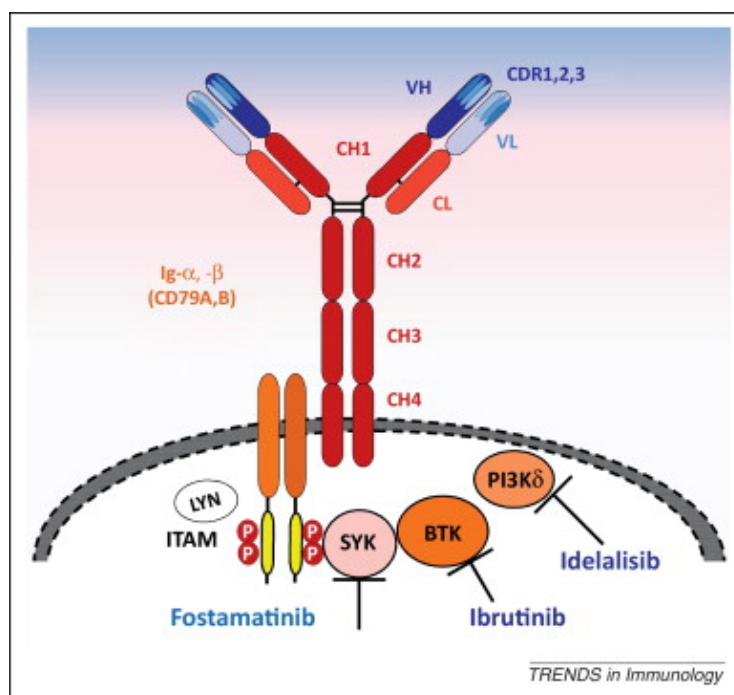
Αφού τα παρθένα B-κύτταρα βγουν στην περιφέρεια, μπορούν να έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο στους λεμφαδένες και να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και B-κύτταρα μνήμης. Τα πρώτα, είναι δραστικά κύτταρα τα οποία παράγουν τις ανοσοσφαιρίνες. Ο πρώτος τύπος ανοσοσφαιρίνης που παράγεται κατά τη μετάβαση στο στάδιο του ώριμου παρθένου B-λεμφοκυττάρου είναι η IgM και στη συνέχεια η IgD. Έπειτα, με τη διαδικασία της ισοτυπικής μεταστροφής κατά την οποία ο ισότυπος μίας ανοσοσφαιρίνης μπορεί να μετατραπεί σε άλλο, δηλαδή η σταθερή περιοχή του αντισώματος μπορεί να αλλάξει ενώ η μεταβλητή περιοχή παραμένει ίδια, παράγονται οι IgA, IgG και IgE ανοσοσφαιρίνες. Καθεμιά από αυτές έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο. Ειδικότερα, η IgM είναι σημαντική για την πρωτογενή απόκριση σε ένα αντιγόνο και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η IgE είναι παρούσα στις λοιμώξεις από παράσιτα και στις αλλεργικές αντιδράσεις, η IgA η οποία είναι παρούσα στις εκκρίσεις και η IgG, η οποία συμβάλλει στην οψωνινοποίηση των μικροοργανισμών, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και είναι ζωτικό συστατικό της ανοσολογικής μνήμης. (4)

Σε αντίθεση με τη μεμβρανική IgM, η μεμβρανική IgG περιέχει μια κυτταροπλασματική επικράτεια της οποίας η ουρά έχει ένα πλούσιο σε τυροσίνη μοτίβο (Ig tail tyrosine motif, ITT), που ενισχύει τη σηματοδότηση. Για τη φωσφορυλίωση της ITT απαιτείται η κινάση SYK, η οποία έπεται από την επιστράτευση της BTK μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα Grb2. Αυτό έχει ως απόρροια την ενίσχυση της κινητοποίησης του ασβεστίου αντιπροσωπεύοντας έναν εσωτερικό κυτταρικό μηχανισμό για τη γρήγορη ενεργοποίηση των B-κυττάρων που έχουν υποστεί ισοτυπική μεταστροφή.(11)

Η BTK εκφράζεται στα αιμοπετάλια, τα B-κύτταρα και γενικά σε όλα τα κύτταρα της ερυθράς και μυελικής σειράς. Εξάιρεση αποτελούν τα T-κύτταρα, τα διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα και τα NK κύτταρα, όπου το επίπεδο μεταγραφής είναι χαμηλό. (26) Η πρωτεΐνη λαμβάνει σήματα από υποδοχείς, όπως ο BCR στα B-κύτταρα, οι TLR8 και TLR9 στα κύτταρα της μυελικής σειράς, ενεργοποιείται και μεσολαβεί τη μεταγωγής μηνυμάτων που οδηγούν τη διαφοροποίηση των B-κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων. Εκτός αυτών, η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη σηματοδότηση τόσο από ενεργοποιητικούς όσο και ανασταλτικούς Fc υποδοχείς, η ισορροπία των οποίων ρυθμίζει αρκετές κυτταρικές διαδικασίες στα μυελοειδή κύτταρα.

Τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά B-κύτταρα η αρχική ενεργοποίηση του υποδοχέα BCR γίνεται στους λεμφικούς ιστούς, είτε με την αναγνώριση, μέσω των υπερμεταβλητών περιοχών, και πρόσδεση κάποιου αντιγόνου είτε με ανεξάρτητους από κάποιον προσδέτη μηχανισμούς. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ενός καταρράκτη

σηματοδοτικών γεγονότων με τελικό στόχο τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-κύτταρα. Επομένως, μέσω της θετικής επιλογής παράγονται κλώνοι B-κυττάρων ειδικοί για ξένα αντιγόνα και μέσω της αρνητικής επιλογής απαλείφονται αυτοδραστικοί κλώνοι.(18)



Όταν ένα αντιγόνο προσδένεται στη μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης των ITAM των Ig-α/Ig-β και την πυροδότηση ενός καταρράκτη σηματοδότησης μορίων καίριας σημασίας για την αρχική ενεργοποίηση του B-κυττάρου. Ένα από τα ανοδικά μόρια του καταρράκτη είναι η πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinase, PTK) SYK, η οποία φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη προσαρμογέα BLNK, που παρέχει θέσεις πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σύμπλεγμα σηματοδότησης. Όταν, λοιπόν, η BLNK φωσφορυλιωθεί από τη SYK αποτελεί πόλο έλξης για την BTK και την φωσφολιπάση PLCγ2. Ουσιαστικά η BLNK φέρνει κοντά τη SYK και την BTK, ώστε η πρώτη να ενεργοποιήσει την τελευταία. Η ενεργή πλέον BTK φωσφορυλιώνει την PLCγ2 και την καθιστά ενεργή. Η ενεργή PLCγ2 παίζει ουσιώδη ρόλο στην έναρξη της πρώιμης σηματοδότησης μέσω του ασβεστίου. Τα μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν κινάσες είναι η πιο συχνή μορφή αντιστρεπτής μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, η οποία ελέγχει πολλές πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας. **(11)** Οι παραπάνω ενέργειες έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κβ και το σχηματισμό δευτέρων μηνυμάτων, όπως η PIP3, με τελικό στόχο την κινητοποίηση του ασβεστίου, τις κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση του B-κυττάρου. **(18, 27)**

Στα B-κύτταρα η πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την εντόπιση τους σε ποικίλα σημεία του λεμφικού ιστού, καθώς αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς των χημειοκινών CXCR4 και CXCR5 και με μόρια προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες. **(18, 28)** Οι υποδοχείς αυτοί είναι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G και εκφράζονται στα B-κύτταρα σε διάφορα στάδια της αναπτυξιακής τους πορείας παίζοντας ουσιαστικό ρόλο στον εντοπισμό και την ομοιόστασή τους. Η πρόσδεση των χημειοκινών στους υποδοχείς τους έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της BTK, μέσω διαμορφωτικών αλλαγών της πρωτεΐνης G. Οι υπομονάδες Gα και Gβγ μπορούν, επίσης, να δεσμεύσουν άμεσα την BTK μέσω των PH και TH επικρατειών της. **(11)**

Στα αιμοπετάλια η επαγωγή της BTK επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης του κολλαγόνου στους υποδοχείς του ή διασταυρωτή σύνδεση του μορίου CD32 στους υποδοχείς αυτούς. **(29)** Στους οστεοκλάστες το σήμα που προέρχεται από το RANK έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, τμήμα του οποίου αποτελεί η BTK. **(30)** Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι πολύ είναι πολύ σημαντικός για τους οστεοκλάστες. Στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα η BTK είναι ουσιαστικό κομμάτι του φλεγμονοσώματος, καθώς αλληλεπιδρά με το NLRP3. **(31)**

Η σηματοδότηση μέσω της BTK μπορεί να επιτευχθεί, εκτός από τον BCR, και από τους TLR και Fc υποδοχείς. Όσον αφορά τους TLRs, οι οποίοι αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένες δομές των μικροοργανισμών, αφού ενεργοποιηθούν επιστρατεύουν την πρωτεΐνη προσαρμογέα MYD88, η οποία με τη σειρά της μπορεί να ενεργοποιήσει μία άλλη πρωτεΐνη προσαρμογέα, την TIR. Η BTK αλληλεπιδρά με τέσσερις πρωτεΐνες καθοδικά της TLR σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου των δύο προαναφερόμενων πρωτεϊνών, με συνέπεια την επαγωγή μεταγραφικών παραγόντων που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό, έκκριση αντισωμάτων, ισοτυπική μεταστροφή και παραγωγή κυτταροκινών από τα B- κύτταρα. Όσο για του Fc υποδοχείς, υπάρχουν τόσο διεγερτικοί όσο και ανασταλτικοί και η ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες. Η BTK αποτελεί κομμάτι της σηματοδότησης και των δύο τύπων υποδοχέων. Για παράδειγμα, ενεργοποιείται όταν IgE αντισώματα συνδέονται διασταυρωτά με FcεRI υποδοχείς σε σιτευτικά κύτταρα.(11)

Εκτός από τη θετική ρύθμιση της BTK υπάρχουν και αρνητικοί ρυθμιστές της, προκειμένου να διατηρείται η ομοιόσταση του B- κυττάρου. Ένας από τους παράγοντες αυτούς είναι οι φωσφατάσες, οι οποίες όπως και η BTK, στρατολογούνται στην πλασματική μεμβράνη. Στα B- κύτταρα εκτός από τους διεγερτικούς υπάρχουν και ανασταλτικοί υποδοχείς. Ένας από αυτούς είναι ο FcγRIIB, ο οποίος αντί για ITAM έχει ITIM στην κυτταροπλασματική του επικράτεια. Η πρόσδεση αντισωμάτων IgG στους υποδοχείς αυτούς έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των ITIMs από την κινάση LYN και την επιστράτευση φωσφατασών, όπως η SHIP1. Η τελευταία αποφωσφορυλιώνει την PIP3 με συνέπεια την αναστολή της επιστράτευσης στη μεμβράνη πρωτεϊνών με επικράτεια PH, όπως η BTK. Συνολικά, οι παραπάνω διαδικασίες έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αύξησης του ασβεστίου. Η αποφωσφορυλίωση της BTK μπορεί να επιτευχθεί και από μία φωσφατάση, που λέγεται SHP1 και δρα καθοδικά των CD22 και CD5, τα οποία λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης που μεσολαβείται από τον BCR.(11)

1.3.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου *BTK*

Συνολικά έχουν περιγραφεί πάνω από 600 μεταλλάξεις στο γονίδιο του BTK. Οι τύποι των μεταλλάξεων που παρατηρούνται μπορεί να είναι μικρής έκτασης, σε επίπεδο λίγων βάσεων, όπως παρερμηνεύσιμες (περίπου 34% του συνόλου), μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης, ελλείψεις και ενθέσεις βάσεων, αλλά και μεγάλης έκτασης σε επίπεδο χρωμοσώματος, όπως μεγάλες ελλείψεις και ενθέσεις.(32) Οι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο.

Αυτό, ανάλογα με τον τύπο του αμινοξέος που αντικαθιστά το αρχικό, μπορεί να έχει από ήπιες έως σοβαρές συνέπειες στη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Στις μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης λόγω της προσθήκης ή έλλειψης ενός ή παραπάνω νουκλεοτιδίων μπορεί να προκύψουν ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (non-sense mutations), δηλαδή να προκύψει πιο πρώιμα από το φυσιολογικό ένα κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, ή μεταλλάξεις, όπου το κωδικόνιο λήξης χάνεται και προστίθενται επιπλέον αμινοξέα στην πρωτεΐνη μέχρι να βρεθεί στην αλληλουχία επόμενο κωδικόνιο λήξης.

Όσο για τις προσθήκες και ελλείψεις σε ιντρονικές περιοχές αν δεν επηρεάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης, συνήθως δεν παρατηρείται κάποια ανωμαλία. Ενώ, μεταλλάξεις σε ιντρόνια που συμβαίνουν στις θέσεις ματίσματος μπορεί να έχουν σοβαρές επιπλοκές, καθώς δε συμβαίνει σωστά η συρραφή των εξόνων και μπορεί να χάνονται ή να προστίθενται βάσεις με αντίκτυπο στην πρωτεϊνική ακολουθία. Οι μεγάλες ελλείψεις και ενθέσεις έχουν ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ή προσθήκη μεγάλων τμημάτων του γονιδίου, οπότε μπορεί να χάνονται ολόκληρα εξόνια και να προστίθενται χιλιάδες βάσεις με αποτέλεσμα μη φυσιολογική μορφή ή απουσία της πρωτεΐνης.

Στο γονίδιο *BTK* έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς που σχετίζονται με την Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton και σωματικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο φάρμακο Ibrutinib.

Όσο για την XLA, μετά από μελέτη των μεταλλάξεων και στατιστική ανάλυση σε πρόσφατη δημοσίευση παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με ήπιες και σοβαρές μεταλλάξεις, ως προς την ένταση εκδήλωσης της νόσου, με βάση δημογραφικά και ανοσολογικά κριτήρια. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε κατά τη συσχέτιση της σοβαρότητας των μεταλλάξεων με την έκφραση της *BTK* πρωτεΐνης, με τις πιο σοβαρές να χαρακτηρίζονται από απόντα ή μειωμένα επίπεδα παραγωγής της πρωτεΐνης. Αντίθετα, οι ασθενείς με ήπιες μεταλλάξεις του γονιδίου *BTK* εμφάνισαν φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης σε σχέση πάντα με τους υγιείς μάρτυρες. Παρατηρήθηκαν βέβαια και εξαιρέσεις, όπου 4/10 ασθενείς με ήπιες μεταλλάξεις δεν είχαν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Όσο για τη συσχέτιση μεταξύ των επικρατειών της πρωτεΐνης με τη σοβαρότητα των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε αυτές και τα επίπεδα έκφρασης της *BTK*, η συγκεκριμένη έρευνα έδειξε ότι δεν είναι σημαντική. Το ίδιο ισχύει και για το γεγονός ότι μεταλλάξεις δε συμβαίνουν σε κάποια συγκεκριμένη επικράτεια με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα. Τελικά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κλινικής εικόνας των ασθενών και των μεταλλάξεων/πολυμορφισμών του γονιδίου *BTK*.(33)

Η δυσκολία συσχέτισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων με τη σοβαρότητα της νόσου αντικατοπτρίζεται και στη μελέτη των Conley et al. όπου αναφέρεται ότι εκτός από τη φύση της μετάλλαξης και τους γενετικούς παράγοντες, η ηλικία που γίνεται η διάγνωση μπορεί να επηρεάζεται από την περιβαλλοντική έκθεση σε λοιμώξεις, τη συχνότητα με την οποία ο θεράπων ιατρός χορηγεί αντιβιοτικά και την κλινική οξύνουα αυτού. Στην ίδια μελέτη, έγινε η παρατήρηση ότι όλοι σχεδόν οι ασθενείς με XLA έχουν μικρό έως και μηδενικό αριθμό B-κυττάρων στην περιφέρεια, γι' αυτό και θα μπορούσε να υποθεθεί ότι ο αριθμός των παρόντων B-κυττάρων αποτελεί μέτρο της σοβαρότητας. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό λόγω των τεχνικών διαφορών μεταξύ των εργαστηρίων που δυσχεραίνουν τη σύγκριση αποτελεσμάτων.(7)

Ασθενείς με σοβαρές μεταλλάξεις στο γονίδιο, όπως αυτές που οδηγούν στον πρόωρο σχηματισμό κωδικονίου λήξης ή σε βλάβες στο κωδικόνιο έναρξης μπορεί να εμφανίζουν ηπιότερη μορφή της ασθένειας, με την έννοια καθυστέρησης στην έναρξη της νόσου ή υψηλότερες των προσδοκώμενων συγκεντρώσεις ανοσοσφαιρινών στον ορό. (7) Γενετικοί πολυμορφισμοί άλλων πρωτεϊνών της B-κυτταρικής σειράς μπορεί να δρουν αντιρροπιστικά με τις γενετικές βλάβες στο γονίδιο BTK. Μόρια που δεν ανήκουν στη B-κυτταρική σειρά, όπως συστατικά της φυσικής ανοσίας μπορεί να προστατεύουν ασθενείς με τη νόσο και να τους βοηθούν να αντεπεξέλθουν στις βακτηριακές λοιμώξεις. Αμινοξικές αντικαταστάσεις που λαμβάνουν χώρα σε περιοχές μη ζωτικής σημασίας και δεν επηρεάζουν δραματικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης πιθανόν να οδηγούν σε λιγότερο σοβαρή νόσο. Μεταλλάξεις λίγες βάσεις πριν ή μετά από ένα ιντρόνιο συνήθως οδηγούν σε μη φυσιολογικό μετάγραφο, ενώ μεταλλάξεις σε περιοχές συντηρημένες εντός των αλληλουχιών ματίσματος πιθανόν σχετίζονται με ηπιότερη μορφή της νόσου.(7)

Επικράτειες	5'UTR	PH (414)	TH (231)	SH3 (194)	SH2 (292)	TK (846)	Άλλη	Σύνολο	% του συνόλου
Παρερμηνεύσιμη	0	119	11	0	112	328	0	570	41.5
Ανερμηνεύσιμη	0	44	16	46	23	97	0	226	16.4
Έλλειψη εντός πλαισίου	1	11	2	0	5	21	0	40	2.9
Πλαισιοτροπική έλλειψη	0	3	0	0	1	2	4	10	0.7
Μεγάλη έλλειψη	0	0	0	0	0	0	14	14	1.0
Ένθεση εντός πλαισίου	0	3	0	0	0	3	0	6	0.4

Επικράτειες	5'UTR	PH (414)	TH (231)	SH3 (194)	SH2 (292)	TK (846)	Άλλη	Σύνολο	% του συνόλου
Πλαισιοτροπική ένθεση	0	3	0	1	0	0	0	4	0.3
Προσθήκη/Ελ-λειψη	0	3	3	2	1	6	0	15	1.1
Ιντρονική	11	27	9	6	29	65	6	153	11.1
Ιντρονική εντός πλαισίου	0	3	0	1	6	0	1	11	0.8
Ιντρονική εκτός πλαισίου	0	7	1	1	6	15	2	32	2.3
Πλαισιοτροπική	0	63	37	23	37	86	2	248	18.0
Πολλαπλός πολυμορφισμός	0	7	5	2	0	6	0	20	1.5
Πολύπλοκη	2	3	0	2	1	2	1	11	0.8
Άγνωστη	4	1	0	0	0	2	8	15	1.1
Σύνολο	18	297	84	84	221	633	38	1375	100

Πίνακας 1. Είδη πολυμορφισμών της βάσης δεδομένων για το γονίδιο BTK.
(Väliäho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-Linked agammaglobulinemia. Hum Mutat. 2006 Sep 12;27(12):1209-1217 PubMed)

Ο ρόλος της BTK στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι περίπλοκος. Πολυμορφισμοί που προάγουν την ενεργοποίηση του γονιδίου *BTK* δεν έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με καρκίνο, με εξαίρεση αυτούς που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία με BTK αναστολείς. Οι ανθεκτικοί κλώνοι προϋπάρχουν της στοχευμένης θεραπείας με αναστολείς της BTK, με εξαίρεση σπάνιες περιπτώσεις.(34) Αν και έχει δειχθεί, μέσω μετασχηματισμού κυττάρων καλλιέργειας με βέκτορες που έφεραν το μεταλλαγμένο γονίδιο *BTK*, ότι ορισμένες αμινοξικές αντικαταστάσεις στην πρωτεΐνη είναι ογκογόνες, δεν υπάρχει κλινική συσχέτιση.(35) Οι Herman et al. εξέτασαν αρχικά την έκφραση της πρωτεΐνης BTK σε κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ και διαπίστωσαν ότι υπήρχε έκφραση της BTK, αλλά τα επίπεδα έκφρασης ποικίλουν μεταξύ των ασθενών. Στη συνέχεια, εξέτασαν την έκφραση του mRNA σε κύτταρα από ασθενείς με ΧΛΛ μέσω RT-PCR. Βρέθηκε ότι όλοι οι ασθενείς με ΧΛΛ εξέφραζαν BTK mRNA, αλλά η έκφραση ήταν αρκετά αυξημένη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στα υγιή κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του mRNA και της έκφρασης της

πρωτεΐνης BTK , υποδηλώνοντας ότι η απορρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης λαμβάνει χώρα σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο.(36)

1.4 Η σημασία της BTK στην εποχή των νέων στοχευμένων βιολογικών θεραπειών, Ibrutinib – anti-BTK θεραπείες, δομή φαρμάκου και ενδείξεις θεραπείας

1.4.1 Ανταπόκριση στη θεραπεία και ανεπιθύμητες ενέργειες

Η πρωτεΐνη BTK είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών B-κυττάρων, αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις αυτών με κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Στη ΧΛΛ η BTK υπερεκφράζεται σε μεταγραφικό επίπεδο και είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένη σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κακοήθων κυττάρων.(37) Οι αναστολείς της BTK είναι πολλά υποσχόμενοι για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νόσων και αιματολογικών κακοηθειών. Οι περισσότεροι από αυτούς στοχεύουν την περιοχή της κινάσης που προσδένει το ATP, με αποτέλεσμα ορισμένες φορές η ειδικότητά τους να είναι χαμηλή και να υπάρχει ανταγωνισμός στην πρόσδεση λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεων ενδογενούς ATP.(18) Ως αντικαρκινική θεραπεία έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία όσο και για άλλες αιματολογικές κακοήθειες, όπως το λέμφωμα μανδύα και η μακροσφαιριναιμία του Wanderingström. Στα νοσήματα αυτά η BTK μπορεί να υπερεκφράζεται σε μεταγραφικό επίπεδο και να είναι ιδιοσυστατικά φωσφορυλιωμένη, όπως στη ΧΛΛ ή ανοδικά στοιχεία του μονοπατιού με τα οποία αλληλεπιδρά μπορεί να προωθούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως στο ΛΜ. (35, 38)

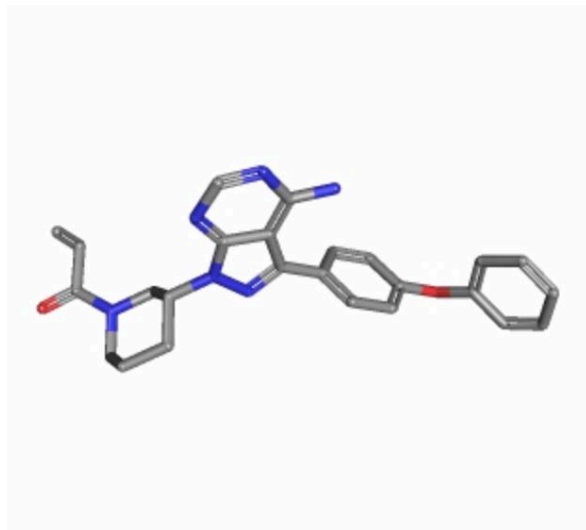
Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί αρνητικοί ρυθμιστές της BTK, όπως η πρωτεΐνη iBTK που δεσμεύεται στην επικράτεια PH και εμποδίζει τη δράση της. Το microRNA-185 ρυθμίζει τη μείωση της έκφρασης της BTK ελαττώνοντας τα επίπεδα του mRNA, ενώ έχει βρεθεί ότι και άλλα, όπως τα miR-210 και miR-425 μειώνουν την έκφραση της πρωτεΐνης. Σε αυτό το πλαίσιο έχει δειχθεί ότι επώαση δειγμάτων ΧΛΛ με αναστολείς της απακετυλάσης των ιστονών είχε ως απόρροια αυξημένη έκφραση των miRNAs και μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, υπάρχει ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης που ρυθμίζεται από το ίδιο το *BTK* και εξαρτάται από το πρωτεάσωμα, μέσω του οποίου διεγείρεται η μεταγραφή από τον εκκινητή του *BTK* με τη βοήθεια ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει τον παράγοντα NF-κΒ. (11)

Ο πρώτος αντι-BTK αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη είναι το Ibrutinib ή PCI-32765, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή επιλεκτικότητα, παρατεταμένη φαρμακοδυναμική και τη δυνατότητα να μπορεί να αποφύγει τον ενδογενή ATP ανταγωνισμό. **(18)** Το Ibrutinib καταστέλλει τη δράση της BTK μη αντιστρεπτά **(37)** και προσδένεται εκλεκτικά στο κατάλοιπο C στη θέση 481 της καταλυτικής υπομονάδας της BTK. **(39)** Το Ibrutinib διακόπτει την αυτοφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στη θέση Y223, εμποδίζοντας τη δραστηριότητα κινάσης της πρωτεΐνης και μειώνει την έκφραση στόχων που βρίσκονται καθοδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα BCR. Οι Herman et al. ανέφεραν ότι το Ibrutinib μπορούσε να επάγει απόπτωση των ΧΛΛ κυττάρων παρουσία παραγόντων επιβίωσης, όπως ο CD40L και ο BAFF. Επίσης, έχειδειχθεί ότι το φάρμακο αναστέλλει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ΧΛΛ κυττάρων, καθώς και τη μετανάστευση των λευχαιμικών κυττάρων προς τις χημειοκίνες CXCL12 και CXCL13. **(18)** Ακόμη έχειδειχθεί ότι καταστέλλει σήματα επιβίωσης που προέρχονται από το μικροπεριβάλλον. **(36)** Επίσης, αναστέλλει την αντιγραφή του DNA, καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό που μεσολαβείται από την TLR σηματοδότηση και εμποδίζει μονοπάτια επιβίωσης σε κύτταρα με ΧΛΛ μειώνοντας την έκφραση των χημειοκινών CCL3 και CCL4. **(25)** Ο De Rooij και οι συνεργάτες του, έχουν αναφέρει συσχέτιση του Ibrutinib με τη χημειοταξία των ΧΛΛ κυττάρων και τη μεσολαβούμενη από ιντεγκρίνη προσκόλληση των ΧΛΛ κυττάρων, εξηγώντας την ανακατανομή των λευχαιμικών κυττάρων από τους ιστούς στο περιφερικό αίμα. **(18)**

Χρησιμοποιείται μόνος του ως παράγοντας για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με υποτροπιάζον ή επιμένον ΛΜ, που έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία. Επίσης, ενδείκνυται μόνος του ως παράγοντας για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με ΧΛΛ (που εμφανίζουν έλλειψη του χρωμοσωμικού τμήματος 17p), η οποία δεν έχει θεραπευτεί προηγουμένως με άλλη αγωγή και συνδυαστικά με τα bendamustine (αλκυλιωτικό φάρμακο που επάγει την απόπτωση) και rituximab (αντι-CD20) για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών, οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία. Τέλος, χρησιμοποιείται μόνο του ως θεραπευτικός παράγοντας στη ΜW, όπου χορηγείται σε ενήλικους ασθενείς που έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία ή για θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς, οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. **(40)**

Σύμφωνα με κλινικά δεδομένα, σε ασθενείς με ΧΛΛ και ΛΜ και σε δόση 420 mg/μέρα χορηγούμενη διά του στόματος το Ibrutinib επάγει πλήρη κατάληψη της BTK. Στους ασθενείς με ΧΛΛ, το φάρμακο επάγει λεμφοκυττάρωση κατά τη διάρκεια της πρώτων εβδομάδων της

θεραπείας, η οποία ποικίλει μεταξύ των ασθενών, αλλά σχετίζεται με το φάρμακο. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανακατανομή των καρκινικών κυττάρων από τους ιστούς στο περιφερικό αίμα, δεν οδηγεί στην εμφάνιση συμπτωμάτων και υποχωρεί στην πλειοψηφία των ασθενών μέσα στους πρώτους μήνες της θεραπείας.(18)



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη δομή του BTK αναστολέα, Ibrutinib.
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibrutinib#section=3D-Conformer>)

Αν και η θεραπεία με Ibrutinib σε ασθενείς με ΧΛΛ είναι αποτελεσματική κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο φάρμακο.(41) Από τις μεταλλάξεις που είναι χαρακτηριστικές της ανθεκτικότητας στο φάρμακο, συνηθέστερη είναι η αντικατάσταση της κυστεΐνης από σερίνη (C481S) και λιγότερο συχνή η αντικατάστασή της από αργινίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Στην πρωτεΐνη η θέση αυτή εντοπίζεται στην καταλυτική επικράτεια της κινάσης. Επομένως, οι γενετικές αυτές αλλαγές εμποδίζουν την πρόσδεση του Ibrutinib και σε συνδυασμό με το σύντομο χρόνο ημιζωής του φαρμάκου οδηγεί σε παροδική αναστολή της BTK και φτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα.(21) Επίσης, η ανθεκτικότητα μπορεί να μην αφορά μόνο μεταλλάξεις της BTK, αλλά και ενός υποστρώματός της PLCγ. Η PLCγ σχετίζεται με μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας, με αποτέλεσμα να είναι ιδιοστατικά ενεργή και να μη χρειάζεται τη φωσφορυλίωσή της από την BTK. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα PLCγ είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από τη RAC2.(21) Μεταλλάξεις τόσο στην BTK όσο και στην PLCγ συναντώνται στο 80% των ασθενών με ΧΛΛ που εμφανίζουν ανθεκτικότητα, αλλά δεν είναι γνωστό αν σχετίζονται με υποτροπή ή προκαλούν άμεσα την ασθένεια, ενώ το 20% των ασθενών με ανθεκτικότητα στο φάρμακο δεν εμφανίζουν μεταλλάξεις σε καμία από τις δύο πρωτεΐνες. Σύμφωνα με μελέτες, οι ανθεκτικοί κλώνοι προηγούνται της θεραπείας με Ibrutinib.(42)

Εκτός από το Ibrutinib και άλλα μόρια που είναι μικρομοριακοί αναστολείς, όπως τα ACP-196, BGB-3111, SNS-062, GDC-0834, HM-71224, CC-292, και ONO-4059, έχουν προχωρήσει από την προκλινική ανάπτυξη σε κλινικές δοκιμές. Το acalabrutinib (ACP-196) είναι ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας δεύτερης γενιάς με μεγαλύτερη ειδικότητα απ' ότι το Ibrutinib, καθώς μπορεί να προσδένονται στο ίδιο κατάλοιπο της BTK αλλά ο πρώτος δεν αναστέλλει άλλες κινάσες, όπως η ITK, οπότε έχει λιγότερες παρενέργειες. Έχει πρόσφατα εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του λεμφώματος μανδύα. Ο BGB-3111 είναι και αυτός μη αντιστρεπτός αναστολέας της BTK που προσδένεται επίσης στη θέση C481 και είναι πιο επιλεκτικός από το Ibrutinib. Ο SNS-062 προσδένεται στην BTK μη ομοιοπολικά και την αναστέλλει ανεξαρτήτως της παρουσίας της μετάλλαξης C481S, συνεπώς διαφέρει από τους άλλους αναστολείς και παρουσιάζει τη δυνατότητα χορήγησης σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο Ibrutinib. Ωστόσο, όσον αφορά σε ενεργοποιητικές μεταλλάξεις της PLC-γ πιθανόν δεν μπορεί να ξεπεράσει το φράγμα της ανθεκτικότητας.(21)

Ο αναστολέας CC-292 προσδένεται μη αντιστρεπτά (προσδένεται στην πρωτεΐνη αφού προκαλέσει σε αυτή κάποια χημική αλλαγή) στην BTK, ενώ ο ONO-4059 προσδένεται αντιστρεπτά (συνδέεται με την πρωτεΐνη χωρίς να την τροποποιήσει και μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα). (25) Δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για το πόσο αποτελεσματικοί είναι οι αναστολείς αυτοί, ωστόσο σε 84 ασθενείς με ΧΛΛ ή SLL (Small Lymphocytic Lymphoma) το ποσοστό απόκρισης ήταν 53% με χορηγούμενη δόση του CC-292 δύο φορές την ημέρα. Όσο για τη χορήγηση του ONO-4059 αποκρίθηκε το 96% των ασθενών με ΧΛΛ και το 92% αυτών με ΛΜ που έλαβαν το φάρμακο.(35) Το GDC-0834 είναι ο πιο ειδικός BTK αναστολέας που έχει αναπτυχθεί, είναι ένας πιθανός θεραπευτικός παράγοντας για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και αναστέλλει την αυτοφωσφορυλίωση της BTK. Αναστέλλει την πρωτεΐνη με αντιστρεπτό μη ομοιοπολικό τρόπο ανεξαρτήτως της παρουσίας της μετάλλαξης C481S. (21) Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση που μεσολαβούνται από τους BCR και CD40 υποδοχείς και είναι πιθανό, επίσης, να αναστέλλει στα μονοκύτταρα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών που επάγονται από ανοσοσυμπλέγματα. Βρίσκεται ακόμη υπό αξιολόγηση η ασφάλεια και η ανεκτικότητα του από τον οργανισμό.(25) Ο αναστολέας LFM-A13, έχει ανασταλτική δράση τόσο για τη BTK όσο και για τις Plk (Polo-like kinases). Ο LFM-A13 είναι ο πρώτος αντιλευχαιμικός παράγοντας που στοχεύει την BTK και αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1999, παρόλα αυτά δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικό επίπεδο.(43)

Προκείμενου να ενισχυθεί η δράση του Ibrutinib και να επιτευχθεί μεγαλύτερη διάρκεια των ανοσιακών απαντήσεων, ο αναστολέας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά συνδυαστικά με

άλλες χήμειο- και ανοσοθεραπείες. Μία κλινική μελέτη που έγινε με αυτό το σκοπό έδειξε ότι συγχορήγηση του Ibrutinib με το rituximab ήταν ιδιαίτερα αποδοτική σε ασθενείς με ΧΛΛ. (25)

Το φάρμακο έχει δοκιμαστεί σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η πρώτη από αυτές είναι η χήμειοθεραπεία, όπου μία κλινική μελέτη φάσης II συνδυάζει τον BTK αναστολέα με τον FCR. Στους ασθενείς χορηγείται για μία εβδομάδα Ibrutinib προκειμένου να κινητοποιηθούν τα λευχαιμικά κύτταρα και να εξέλθουν στην περιφέρεια, έπειτα λαμβάνουν για 6 μήνες iFCR και 2 μήνες πάλι Ibrutinib για συντήρηση. Άλλες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη χορήγηση του φαρμάκου με αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα από τη μία, και με το φάρμακο venetoclax από την άλλη. Η έκθεση των ΧΛΛ κυττάρων στο Ibrutinib τα καθιστά περαιτέρω εξαρτημένα από τον παράγοντα BCL-2, ενισχύοντας την απόπτωση σε απόκριση στο venetoclax. Τα δύο φάρμακα έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και προφίλ τοξικότητας, παρόλα αυτά συμπληρώνουν το ένα το άλλο ως προς την εντόπιση της δράσης τους. Όσο για τα μονοκλωνικά αντισώματα το Ibrutinib ελέγχεται σε κλινικές δοκιμές σε συνδυασμό με τα Ublituximab (αντι-CD20), BI 836826 (αντι-CD37) και Otlertuzumab (εξανθρωποποιημένη θεραπευτική πρωτεΐνη αποτελούμενη από μεταβλητές περιοχές αντισώματος ειδικές για το CD37 συνδεδεμένες με σταθερές περιοχές ανοσοσφαιρινών). (21)

Κατά τη διάρκεια της πρώτης κλινικής μελέτης του Ibrutinib σε 56 ασθενείς με υποτροπιάζουσες αιματολογικές κακοήθειες των B-κυττάρων, χορηγήθηκαν κλιμακωτές δόσεις του φαρμάκου διά του στόματος και παρατηρήθηκε απόκριση στο 60% των σθενών με το 16% αυτών να εμφανίζουν πλήρη απόκριση με ελάχιστες παρενέργειες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη γρήγορη έγκρισή του από τον FDA. (35) Ειδικότερα το ποσοστό των ασθενών με ΧΛΛ εμφάνισε το υψηλότερο ποσοστό απόκρισης, (79%). (39)

Οι Chang et al. μελέτησαν 14 ασθενείς, οι οποίοι μπήκαν στη φάση Ib για το Ibrutinib. Σε δέκα από αυτούς χορηγούνταν 840mg ημερησίως και στους άλλους 4 χορηγούνταν 420mg. Η αξιολόγηση της απόκρισης, η οποία έγινε στο τέλος του κύκλου 2 έδειξε μία μείωση στο TNM της τάξης του 34.8%-84.3%. Έξι ασθενείς, οι οποίοι εμφάνιζαν σπληνομεγαλία ή κοιλιακή διάταση πριν τη θεραπεία, μετά το τέλος του κύκλου 2 δεν είχαν κανένα από τα δύο συμπτώματα. Συνολικά 8 από τους 14 ασθενείς εμφάνισαν βελτιωμένες τιμές αιμογλοβίνης και 7 από τους 14 εμφάνισαν αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, ενώ σε 8 ασθενείς παρατηρήθηκε περιφερική λεμφοκυττάρωση. (16)

Οι Byrd et al. έδειξαν ότι το Ibrutinib μπορούσε να επάγει ένα συνολικό ποσοστό απόκρισης της τάξης του 71% σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή επιμένουσα ΧΛΛ και ένα επιπρόσθετο 15%-20% των ασθενών με μερική απόκριση με λεμφοκυττάρωση. Η απόκριση ήταν ανεξάρτητη

κλινικών και γενωμικών παραγόντων κινδύνου πριν τη θεραπεία. Στους 26 μήνες, το ποσοστό της συνολικής επιβίωσης εκτιμήθηκε στο 83%. Όσο για το ΛΜ έρευνα από τους Wang et al. έδειξε ότι τα ποσοστά της πλήρους και μερικής απόκρισης ήταν αντίστοιχα 21% και 47%. Όσο για τον μέσο εκτιμώμενο χρόνο απόκρισης αυτός ήταν 17.5 μήνες, η μέση εκτιμώμενη επιβίωση χωρίς πρόοδο της νόσου ήταν 13.9 μήνες και το ποσοστό συνολικής επιβίωσης ήταν 58% σε 18 μήνες.(18)

Το φάρμακο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό και ασφαλές και έχει μπει στη φάση III των κλινικών δοκιμών για μεγάλο φάσμα B-νεοπλασμάτων. Παρόλα αυτά παρατεταμένη χρήση του φαρμάκου πιθανόν να επηρεάσει τη φυσιολογική λειτουργία των B-κυττάρων οδηγώντας τελικά σε υπογαμμασφαιριναιμία. (39) Έχουν περιγραφεί μόνο δύο σχετιζόμενες με τη δόση τοξικότητες (dose- limiting toxicities, DLTs), με το φάρμακο παρόλα αυτά να είναι ασφαλές και ανεκτό από τον οργανισμό. Οι πιο κοινές παρενέργειες είναι πρώτου ή δεύτερου βαθμού μη αιματολογικές τοξικότητες, που περιλάμβαναν εξανθήματα, ναυτία, κούραση, διάρροια, μυϊκούς σπασμούς-μυαλγία και αρθραλγία. Πιο σπάνια συναντώνται οι αιματολογικές τοξικότητες, όπως τρίτου με τετάρτου βαθμού ουδετεροπενία (12.5%), θρομβοκυτταροπενία (7.2%) και αναιμία (7.1%). Οι παρενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν όταν το Ibrutinib χορηγείται σε ασθενείς με ΧΛΛ περιλαμβάνουν γρήγορη διήθηση των διογκωμένων λεμφαδένων συνοδευόμενη με αυξημένη λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα. (25) Τέλος, κάποιες επιπρόσθετες παρενέργειες που μπορούν να εμφανιστούν είναι μικρός αριθμός αιμοπεταλίων, μολύνσεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, βήχας, κοιλιακός πόνος, εμετοί, λοιμώξεις του ουροποιητικού και του δέρματος, μειωμένη όρεξη, αφυδάτωση και πονοκεφαλος.(44)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *BTK* σε ασθενείς με πιθανή Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton, αλλά και η διερεύνηση μεταλλάξεων στο ίδιο γονίδιο σε ασθενείς με B-αιματολογικές νεοπλασίες, για την πιθανή ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων ενδεικτικών ανθεκτικότητας στον αναστολέα Ibrutinib, προ της έναρξης αντι-BTK θεραπειών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Ασθενείς και μάρτυρες

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος 3 ασθενών με πιθανή Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton. Τα δείγματα προήλθαν από το Ιατρείο Ανοσοανεπαρκειών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος του 2018 με Αύγουστο του 2019. Μελετήθηκαν συνολικά τρεις άρρενες, με σοβαρές λοιμώξεις και αγαμμασφαιριναιμία. Στον έναν άρρενα ασθενή η αγαμμασφαιριναιμία διεγνώσθη στα πλαίσια μηνιγγίτιδας. Ο ασθενής παρουσίαζε επιπρόσθετα έντονο βήχα με κιτρινωπή απόχρεμψη. Χορηγείται υποδόρια γ-σφαιρίνη. Ο δεύτερος ασθενής εκδήλωσε κατά το πρώτο έτος σηψαιμία από ψευδομονάδα, σε ηλικία 6-7 ετών χρόνια ιγμορίτιδα, ουρολοίμωξη σε ηλικία 8 ετών και σε ηλικία 20 ετών πνευμονία. Σε ηλικία 6-7 ετών έλαβε χημειοπροφύλαξη με Bactrimel. Ο τρίτος ασθενής παρουσίαζε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις κατά την παιδική ηλικία. Οι συγγενείς του τρίτου ασθενούς με πιθανή Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton είχαν ελεύθερο ιστορικό, ενώ στην οικογένεια του πρώτου ασθενούς ο ξάδελφος έπασχε επίσης από τη νόσο και στην οικογένεια του δεύτερου ασθενούς η μητέρα ήταν φορέας. Ένας υγιής δότης περιφερικού αίματος (άνδρας) αναλύθηκε για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας.

	Ασθενείς με XLA
Αριθμός	3
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	3/0
Ηλικία (μέση τιμή/εύρος)	2.7/1-5

Πίνακας 2. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με XLA.

Επίσης, μελετήθηκαν συνολικά δώδεκα ασθενείς με B- λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές (6 άρρενες και 6 θήλεις), κατά τη διάρκεια έξαρσης των νόσων. Από αυτούς 10 έπασχαν από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), ένας από μακροσφαιριναιμία Waldenström και ένας από τριχωτή λευχαιμία. Όλοι, εκτός από 4 ασθενείς με ΧΛΛ, λάμβαναν αγωγή με Ibrutinib, και η γενετική ανάλυση σε αυτούς έγινε σε βιολογικό υλικό προ της λήψης θεραπείας. Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και από την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού

Νοσοκομείου Λάρισας . Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος του 2018 με Αύγουστο του 2019.

	Ασθενείς με Β-Λεμφοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα
Αριθμός	12
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	6/6
Ηλικία (μέση τιμή/εύρος)	72.3/53-88
Ποσοστό διήθησης λεμφοκυττάρων	>55%

Πίνακας 3. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με Β-Λεμφοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα.

1.2 Υλικά και Μέθοδοι

1.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση γενετικού υλικού DNA, από αρχική ποσότητα αίματος και μυελού των οστών με αντιπηκτικό K₃EDTA , χρησιμοποιήθηκε ειδικό σύστημα των Pure Link® Genomic DNA Kit (Invitrogen) για την επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, για την απομόνωση γενετικού υλικού από εμπύρηντα λευκοκύτταρα και τον καθαρισμό του από προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε με βάση το Pure Link® Genomic DNA Kit. Το σύστημα απομόνωσης περιλάμβανε 4 τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Η τελική συγκέντρωση του DNA ανέρχεται περίπου στα 50-200 ng/μL. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 55 °C.
2. Τοποθέτηση 200 μl του δείγματος σε eppendorf tube.
3. Προσθήκη 20 μl ProteinaseK και 20 μl RNaseA.
4. Ανάδευση με τη συσκευής vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
5. Προσθήκη 200 μl Lysis Buffer (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) και ανάδευση με vortex.
6. Επώαση στο υδατόλουτρο στους 55 °C για 30 min.

7. Προσθήκη 200 μ l 96%-100% αιθανόλης και ανάδευση με vortex.
8. Τοποθέτηση 740 μ l του δείγματος σε στήλη(PureLink® Spin Column).
9. Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm.
10. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης.
11. Προσθήκη 500 μ l του Wash Buffer 1 στη στήλη.
12. Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm.
13. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης.
14. Προσθήκη 500 μ l του Wash Buffer 2 στη στήλη.
15. Φυγοκέντρηση για 3 min στις 13.400 rpm.
16. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης σε νέο καθαρό eppendorf tube.
17. Προσθήκη 100 μ l του Elution and Binding Buffer (PureLink Genomic Elution Buffer) στη στήλη.
18. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
19. Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm.
20. 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.

1.2.2 PCR για το γονίδιο *BTK*

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με εκκινητές προερχόμενους με σκοπό την ενίσχυση και των 18 εξονίων του γονιδίου BTK, αλλά και των 5'-, 3'- αμετάφραστων περιοχών. Στον Πίνακα 5. παρουσιάζονται αναλυτικά η νουκλεοτιδική σύσταση, το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται, καθώς και η βέλτιστη θερμοκρασία annealing για κάθε ζεύγος εκκινητών κατά την αντίδραση PCR.

Αρχικά, σε σωληνάκια τα οποία έχουν αποστειρωθεί σε ακτινοβολία UV σημειώνεται ο αριθμός των δειγμάτων και ο αρνητικός μάρτυρας, που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός του DNA, και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τυχόν επιλοίμωσης. Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το σωληνάκι του master mix και γίνεται προσθήκη όλων των συστατικών που αναγράφονται παρακάτω εκτός της πολυμεράσης και του DNA. Έπειτα, παρασκευάζεται το mix του ενζύμου. Οι διαδικασίες αυτές γίνονται σε αποστειρωμένο χώρο και τα mix παρασκευάζονται σε πάγο. Τα mix μοιράζονται στα δείγματα και τον αρνητικό μάρτυρα. Έπειτα, προστίθενται 100–200ng γενωμικού DNA από κάθε δείγμα στο αντίστοιχο σωληνάκι και μαζί με τον αρνητικό μάρτυρα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied

Biosystems), ακολουθώντας το πρόγραμμα που αναφέρεται παρακάτω. Μετά το τέλος της αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε οριζόντιο gel αгарόζης 2% και έκθεση τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αντίδραση είναι αποτελεσματική και αν υπάρχει ειδικό προϊόν.

Οι συνθήκες PCR για το γονίδιο *BTK* σε επίπεδο DNA είναι οι παρακάτω :

	5'UTR	Exon 3	Exon 4	Exon 7	Exon 14	Exon 17	Exon 18
	94°C για 2 min						
32 cycles	94°C για 30 sec						
	58°C για 30 sec	57°C για 30 sec	57°C για 30 sec	59°C για 30 sec	57°C για 30 sec	53°C για 30 sec	57°C για 30 sec
	72°C για 30 sec						
	72°C για 5 min						

	Exons 1-2	Exon 5-6	Exon 9-11	Exon 12-13	Exon 15-16
	94°C για 2 min				
32 cycles	94°C για 30 sec				
	53°C για 30 sec	58°C για 30 sec	58°C για 30 sec	56°C για 30 sec	56°C για 30 sec
	72°C για 1 min				
	72°C για 5 min				

	Exon 8
	94°C για 5 min
32 cycles	94°C για 1 min
	61°C για 30 sec
	72°C για 1 min
	72°C για 5 min

Πίνακας 4. Συνθήκες PCR για όλες τις περιοχές/εξόνια του γονιδίου *BTK*.

Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 22 μl από το master mix, 6 μl από το enzyme mix και 2 μl DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30 μl .

Για την παρασκευή του Master mix χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. dH_2O = 242.5 μl
2. Kappa Buffer 2.5x = 50 μl
3. dNTP's = 40 μl
4. MgCl_2 = 7.5 μl
5. Primer F' = 10 μl
6. Primer R' = 10 μl

Για την δημιουργία του Enzyme mix χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. dH_2O = 50 μl
2. Enzyme = 2.2 μl

Περιοχές εξονίων	F και R	Αλληλουχία 5'...3'	Annealing temperature	Μή- κος(bp)	Μήκος(bp)PCR προϊό- ντος
5' UTR	F	GTCAGAGGTCCCAAGCAAAT	58 °C	20	506
	R	CCACCCTCAGCCCTTGT		17	
1-2	F	CACCTGCATTATCCCTT	53 °C	17	1585
	R	CGGAAAGTGAGAAGAGAATA		20	
3	F	GTATGTGTTGGGTCGTATTG	57 °C	20	395
	R	AGTCTCATTTCTTGGTTCAG		20	
4	F	TGCCTTTCTTTGTTTTCTAC	57 °C	20	324
	R	CTACGTTTCTCCTTTCTCTT		20	
5-6	F	AGCCAACTGGTCCTGTGA	58 °C	18	801
	R	CAAATCCCCCATCTTAGCAA		20	
7	F	TGCCTGATTTGGGTGTCTTGAG	59 °C	22	367
	R	CGGGAATTATGCCGCAGCAC		20	

Περιοχές εξονίων	F και R	Αλληλουχία 5'...3'	Annealing temperature	Μή- κος(bp)	Μήκος(bp)PCR προϊό- ντος
8	F	CACTGGCTCACTGCCTAACC	61 °C	20	596
	R	GGTGACCTCTCCAGCTCTCA		20	
9-11	F	TGAATCTTCAATGCCAACCT	58 °C	20	1410
	R	GTCAGTCCCTGTTGGGTGTA		20	
12-13	F	GGTCTTCTGGGATTCAAAA	56 °C	19	1031
	R	CCCAAACCTCTCTTACTG		18	
14	F	CTCCCCAGCCCCTTTATTGC	57 °C	20	329
	R	CCCATCAGCCCCTTTGTCCTA		20	
15-16	F	TGGCTTCATTCTACTGGTCA	56 °C	20	966
	R	ATTGCATTTCTTATCCTTTG		20	
17	F	CCCTGCTATCCAAAAAGAC	53 °C	19	298
	R	CTATCAGTCTTTGGTGGC		18	
18	F	TTGCAAATTGTTCTTATCA	57 °C	19	849
	R	TCGAGTTCTCAGTGTAGGA		19	

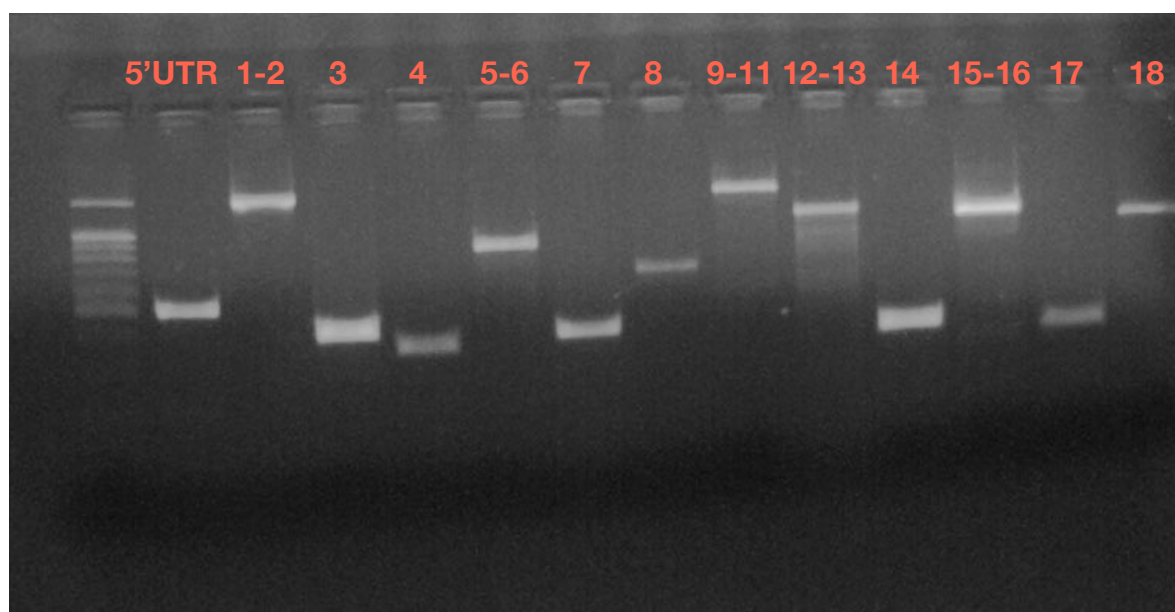
Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 18 εξονίων και των 5'-, 3'- UTR του γονιδίου *BTK*.

1.2.3 Παρασκευή γέλης αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση προϊόντων

Αρχικά, ζυγίζεται στο ζυγό ακριβείας η ποσότητα της αγαρόζης. Για 100 ml 2% γέλης ζυγίζονται 2 gr αγαρόζης, τα οποία προστίθενται σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια, στην κωνική φιάλη τοποθετείται ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος TBE 10x (89 mM Tris-Base, 2 mM Na₂EDTA, 89 mM Boric Acid), το οποίο θα πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση 1x. Έπειτα, η κωνική φιάλη τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων, προκειμένου να ρευστοποιηθεί η αγαρόζη και ακολουθεί η προσθήκη νερού, ώστε να αντισταθμιστεί η ποσότητα

του ρυθμιστικού διαλύματος που εξατμίστηκε. Αφού το διάλυμα γίνει διαυγές, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου(Et-Br), περίπου 5-7 μ l, με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος, το υγρό τοποθετείται σε εκμαγείο, όπου έχουν τοποθετηθεί τα κατάλληλα χτενάκια, για να σχηματιστεί το καλούπι της γέλης και οι οπές στις οποίες θα φορτωθεί το DNA αργότερα. Η γέλη αφήνεται να πήξει για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 5 μ l από κάθε προϊόν PCR και διάλυμα χρωστικής (loading buffer) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται, ώστε να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Φορτώνονται περίπου 7 μ l του κάθε δείγματος στις οπές της οριζόντιας γέλης αгарόζης 2% και 5 μ l του δείκτη μοριακών βαρών DNA (100 bp ladder) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντος. Η γέλη αгарόζης είναι τοποθετημένη σε συσκευή, η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (η συγκέντρωση πρέπει να είναι ίδια με αυτή στη γέλη). Τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια, ρυθμίζεται η τάση του ρεύματος στα 120 Volt, 400 mA και επιλέγεται η ένδειξη RUN για να αρχίσει η ηλεκτροφόρηση, η οποία διαρκεί συνήθως 30 λεπτά. Τέλος, με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας μπορούμε να δούμε την εικόνα της γέλης, να εξάγουμε και να αποθηκεύσουμε τα αποτελέσματα. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκευτήκαν σε μορφή bitmap. Αν η αντίδραση είναι επιτυχής και υπάρχει ειδικό προϊόν τότε σε επόμενο στάδιο γίνεται ο καθαρισμός.



Εικόνα 5. Προϊόντα PCR για κάθε περιοχή εξονίων.

1.2.4 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR, ώστε αυτά να είναι έτοιμα για τη διαδικασία της αλληλούχισης χρησιμοποιούνται τα EXTRACTME® DNA Clean-up Kit (Blirt) και Purelink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Το σύστημα απομόνωσης αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων και βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 50 µl CB Buffer (Binding Buffer) στα tubes που περιέχουν 25 µl PCR προϊόντος και ανάδευση με την πιπέτα.
2. Μεταφορά όλου του περιεχομένου σε στήλη (Purelink PCR Purification Kit).
3. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 11,000g για 1 min.
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης.
5. Προσθήκη 500 µl του CW Buffer (Wash Buffer) στη στήλη.
6. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 11,000g για 1 min.
7. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης στο ίδιο φιαλίδιο φυγοκέντρησης.
8. Προσθήκη 500 µl του CW Buffer στη στήλη.
9. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 11,000g για 1 min.
10. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση της στήλης στο ίδιο φιαλίδιο φυγοκέντρησης.
11. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 11,000g για 3 min.
12. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο eppendorf tube.
13. Προσθήκη 30 µl Elution Buffer στη στήλη και επώαση για 1 min.
14. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 11,000g για 1 min.
15. Αφαίρεση της στήλης και αποθήκευση του eppendorf tube που περιέχει purified DNA στους -20°C.

Για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του εξονίου 8, αντί της παραπάνω μεθόδου, ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση του PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντος για 50 min.
2. Τοποθέτηση σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδες φως (UV transilluminator, UVITEC, Cat.No. M031308).
3. Απομόνωση της επιθυμητής δέσμης με νυστέρι.

4. Μεταφορά της γέλης που περιέχει το επιθυμητό προϊόν σε φιαλίδιο στο οποίο προστίθεται το διάλυμα L3 (Gel Solubilization Buffer) σε όγκο τριπλάσιο από αυτόν της γέλης που απομονώθηκε.
5. Επώαση σε υδατόλουτρο, στους 50°C για 40 min (κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιούμε ανάδευση ανά 3 min, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η γέλη).
6. Προσθήκη στο φιαλίδιο έναν όγκο (100 µl) ισοπροπανόλης, ανάδευση και μεταφορά του περιεχομένου σε ειδική στήλη (Quick Gel Extraction Column, Invitrogen) που περιέχει μεμβράνη, ειδική για τη δέσμευση του DNA.
7. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min.
8. Απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρωσης και προσθήκη 500 µl διαλύματος πλύσης (Wash Buffer, W1) που περιέχει αιθανόλη.
9. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min.
10. Φυγοκέντρηση χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, στις 14.000 στροφές για 3 min, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης και της αιθανόλης.
11. Η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5mL, προστίθενται σε αυτή 30 µl διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, E5) και επώαση 5 min.
12. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min.
13. Τα καθαρισμένα προϊόντα ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 µl και κατόπιν ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποιότητάς και της ποσότητάς τους.
14. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20°C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

1.2.5 Αλληλούχιση κατά Sanger

Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχιση κατά Sanger με τη χρήση του BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα 4Peaks, χρησιμοποιήθηκαν οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων Ensembl, NCBI, BTKbase και τα ηλεκτρονικά εργαλεία Lalign και ReverseComplement. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατευθυνόμενη αλληλούχιση κατά Sanger παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

<i>Περιοχές εξονίων</i>	<i>F και R</i>	<i>Αλληλουχία 5'...3'</i>	<i>Μήκος(bp)</i>
5' UTR	F	GTCAGAGGTCCCAAGCAAAT	20
1-2	F	CACCTGCATTATCCCTT	17
	R	CGGAAAGTGAGAAGAGAATA	20
3	F	GTATGTGTTGGGTCGTATTG	20
4	R	CTACGTTTCTCCTTTCTCTT	20
5-6	F	AGCCAACTGGTCCTGTGA	18
	R	CAAATCCCCCATCTTAGCAA	20
7	F	TGCCTGATTTGGGTGTCTTGAG	22
8	F	CACTGGCTCACTGCCTAACC	20
9-11	F	TGAATCTTCAATGCCAACCT	20
	FSEQ	AATCAGGGGTTGTTCTAT	18
	R	GTCAGTCCCTGTTGGGTGTA	20
12-13	F	GGTCTTCTGGGATTCAAAA	19
	R	CCCAAACCTCTCTTACTG	18
14	F	CTCCCCAGCCCCCTTTATTGC	20
15-16	F	TGGCTTCATTCTACTGGTCA	20
	FSEQ	TCTGCCGATCTTTCTATTC	19
17	R	CTATCAGTCTTTGGTGGC	18
18	R	TCGAGTTCTCAGTGTAGGA	19
	RSEQ	CAAGCTCTACCAAATGCCTAC	21

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των 18 εξονίων και των 5'-, 3'- UTR του γονιδίου *BTK*.

1.2.6 Απομόνωση PBMC's με φικόλη

Για την απομόνωση των PBMC's έγινε διαχωρισμός στοιβάδας σε φικόλη σύμφωνα με τα εξής βήματα:

1. Αραίωση του δείγματος περιφερικού αίματος με ισότονο διάλυμα PBS.
2. Προσθήκη σε falcon των 15 ml, 4 ml φικόλης.
3. Προσεκτική επιστοίβαξη του αραιωμένου αίματος επάνω στη φικόλη.
4. Φυγοκέντρηση για 30 min στις 1,200 στροφές με επιτάχυνση 2 και επιβράδυνση 0.
5. Προσεκτική απομάκρυνση της στοιβάδας των λευκοκυττάρων και τοποθέτηση αυτών σε νέο falcon.
6. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 1,600 στροφές με επιτάχυνση 9 και επιβράδυνση 9.
7. Scratch των δειγμάτων μετά τη φυγοκέντρηση και επανασύσταση σε 4 ml ισότονου διαλύματος PBS.

1.2.7 Απομόνωση RNA από στοιβάδα κυττάρων

1. Ενεργοποίηση της φυγοκέντρου και ορισμός της θερμοκρασίας στους 4°C.
2. Καθαρισμός του πάγκου και των πιπετών που θα χρησιμοποιηθούν με RNase Zap.
3. Ρύθμιση της πιπέτας στα 1000 µl και εξαγωγή του TRIsure από τους 4°C.
4. Εξαγωγή των κυττάρων από τους -80°C και γρήγορη προσθήκη του TRIsure.
5. Ανάδευση των tubes με vortex, ώσπου να αποκολληθεί το ίζημα.
6. Προκειμένου να διαλυθεί όλο το ίζημα όλη η ποσότητα του διαλύματος φιλτράρεται μέσω σύριγγας.
7. Επώαση σε RT για 5 min.
8. Φυγοκέντρηση στις 12,000 rcf για 10 min στους 4°C.
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου και μεταφορά σε νέο tube.
10. Προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 µl κρύου χλωροφόρμιου.
11. Ανάδευση μέχρις ότου το δείγμα να φαίνεται ομοιογενές και επώαση σε RT στον πάγκο για 8 min.
12. Φυγοκέντρηση στις 12,000 rcf για 10 min στους 4°C.
13. Ρύθμιση της θερμοκρασίας της φυγοκέντρου στους 20°C.
14. Με μεγάλη προσοχή αφαίρεση της υδάτινης (διαφανούς) στοιβάδας και τοποθέτησή της σε νέο tube.

15. Προσθήκη 500 μl ισοπροπανόλης (Repropanol) και ανάδευση των δειγμάτων με vortex για λίγα δευτερόλεπτα.
16. Επώαση σε RT στον πάγκο για 5 min.
17. Φυγοκέντρωση στις 12,000 rcf για 8 min στους 20°C.
18. Αφαίρεση του υπερκειμένου.
19. Προσθήκη από 1 ml 75% αιθανόλης σε κάθε δείγμα.
20. Ανάδευση με vortex για λίγα δευτερόλεπτα.
21. Φυγοκέντρωση στις 7,600 rcf για 5 min στους 20°C.
22. Αφαίρεση όσο το δυνατό περισσότερου υπερκειμένου και παραμονή των δειγμάτων με ανοιχτά καπάκια, ώστε να εξατμιστεί όση αιθανόλη έχει απομείνει.
23. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20-50 μl H_2O .
24. Προσθήκη σε νέο tube 195 μl H_2O και 5 μl RNA και φωτομέτρηση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείγματος.
25. Ηλεκτροφόρηση 2.5 μl του δείγματος μαζί με 5 μl χρωστικής, για 30 min στα 120 V, προκειμένου να προσδιοριστεί η ποιότητα του RNA.

1.2.8 Σύνθεση cDNA

1. Προετοιμασία των mix και τοποθέτηση στον πάγκο.
2. Αναγραφή του αριθμού του cDNA στα tubes.
3. Τοποθέτηση των tubes σε κρυοπλάκα και προσθήκη σε αυτά 4 μl εξαμερών.
4. Προσθήκη της εκάστοτε ποσότητας H_2O σε κάθε δείγμα.
5. Προσθήκη της αντίστοιχης ποσότητας RNA (η ποσότητα του RNA εξαρτάται από την ποιότητά του).
6. Τοποθέτηση των tubes στο μηχάνημα της PCR (επώαση του RNA μαζί με τα εξαμερή και το H_2O για 2 min στους 72 °C, ώστε να προλάβουν να προσδεθούν τα εξαμερή).
7. Όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 42°C γίνεται παύση της αντίδρασης.
8. Το μηχάνημα ανοίγει προκειμένου να γίνει προσθήκη 11.1 μl του Master mix σε κάθε δείγμα.
9. Το μηχάνημα κλείνει και η αντίδραση συνεχίζεται.
10. Μόλις τελειώσει η σύνθεση του cDNA γίνεται μεταφορά της ποσότητας του cDNA σε eppendorf tubes, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

Για την παρασκευή του Master mix χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

1. 5x FS Buffer = 5 μ l
2. 8M dNTP's (10mM) = 2 μ l
3. 9M 0.1 DTT= 2.25 μ l
4. 2.4M RNasin= 0.6 μ l
5. 5M RT= 1.25 μ l

Το Hexamer mix αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά:

Hexamers = 4 μ l

RNA

H₂O

Συνθήκες σύνθεσης cDNA:

cDNA synthesis
72°C για 2 min
42°C για 60 min
65°C για 10 min

Πίνακας 7. Συνθήκες σύνθεσης του cDNA.

Μετά τη σύνθεση του cDNA ακολουθεί PCR για το γονίδιο *BTK* και για τις 4 περιοχές του, ακολουθώντας τη μεθοδολογία που περιγράφηκε παραπάνω.

Για την παρασκευή του Master mix της PH χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. dH₂O= 242.5 μ l
2. Kappa Buffer 2.5x = 50 μ l
3. dNTP's = 40 μ l
4. MgCl₂= 7.5 μ l
5. Primer F' = 10 μ l
6. Primer R' = 10 μ l

Για την παρασκευή του Master mix των TS, SK και KIN χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. dH₂O= 235μl
2. Kappa Buffer 2.5x = 50μl
3. dNTP's = 40μl
4. MgCl₂= 15μl
5. Primer F'= 10μl
6. Primer R'= 10μl

Για την δημιουργία του Enzyme mix χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. dH₂O= 50μl
2. Enzyme= 2.2μl

Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 22 μl από το master mix, 6 μl από το enzyme mix και 2 μl cDNA . Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30 μl .

Οι συνθήκες PCR για το cDNA φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	PH	TS	SK	KIN
	94°C για 2 min			
30 cycles	94°C για 30 sec			
	57°C για 45 sec	55°C για 45 sec	61°C για 40 sec	56°C για 45 sec
	72°C για 90 sec			
	72°C για 5 min			

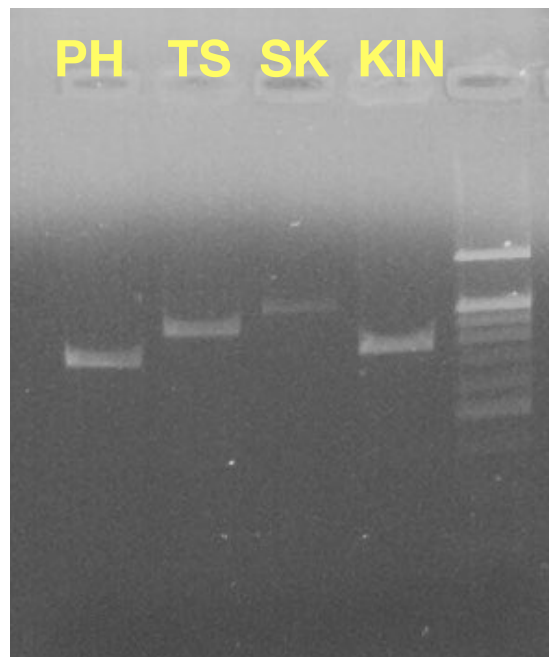
Πίνακας 8. Συνθήκες PCR για όλες τις περιοχές του cDNA του γονιδίου *BTK*.

Πε- ριοχές cDNA	F και R	Αλληλουχία 5'...3'	Annealing temperature	Μήκος (bp)	Μήκος(bp)PCR προϊόντος
PH	F	GAGTCCCACCTTCCAAGTC	57 °C	19	761
	R	GCCACAACCTTTTTCAGC		18	
TS	F	CGTCTTCTCCCCAACTG		17	

<i>Πε- ριοχές cDNA</i>	<i>F και R</i>	<i>Αλληλουχία 5'...3'</i>	<i>Annealing temperature</i>	<i>Μήκος (bp)</i>	<i>Μήκος(bp)PCR προϊόντος</i>
SK	R	CCATACTTCACTACCCCAAAT	55 °C	21	921
	F	CTGCGGAAGGGTGATGAA	61 °C	18	1051
	R	CCCCAAAAGCCCCAAATGT		18	
KIN	F	ATTTGGGGTAGTGAAGT	56 °C	17	787
	R	TTGTGGAGAAGAGAAGT		17	

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά εκκινητών PCR και αλληλούχισης για κάθε περιοχή του cDNA.

Ritis K, Speletas M, Tsironidou V, Pardali E, Kanariou M, Moschese V, Orlandi P, Skordala M, Rossi P, Kartalis G, Bourikas G, Sideras P., Absence of Bruton's tyrosine kinase (Btk) mutations in patients with acute myeloid leukaemia, Br J Haematol 1998(5): 1241-8



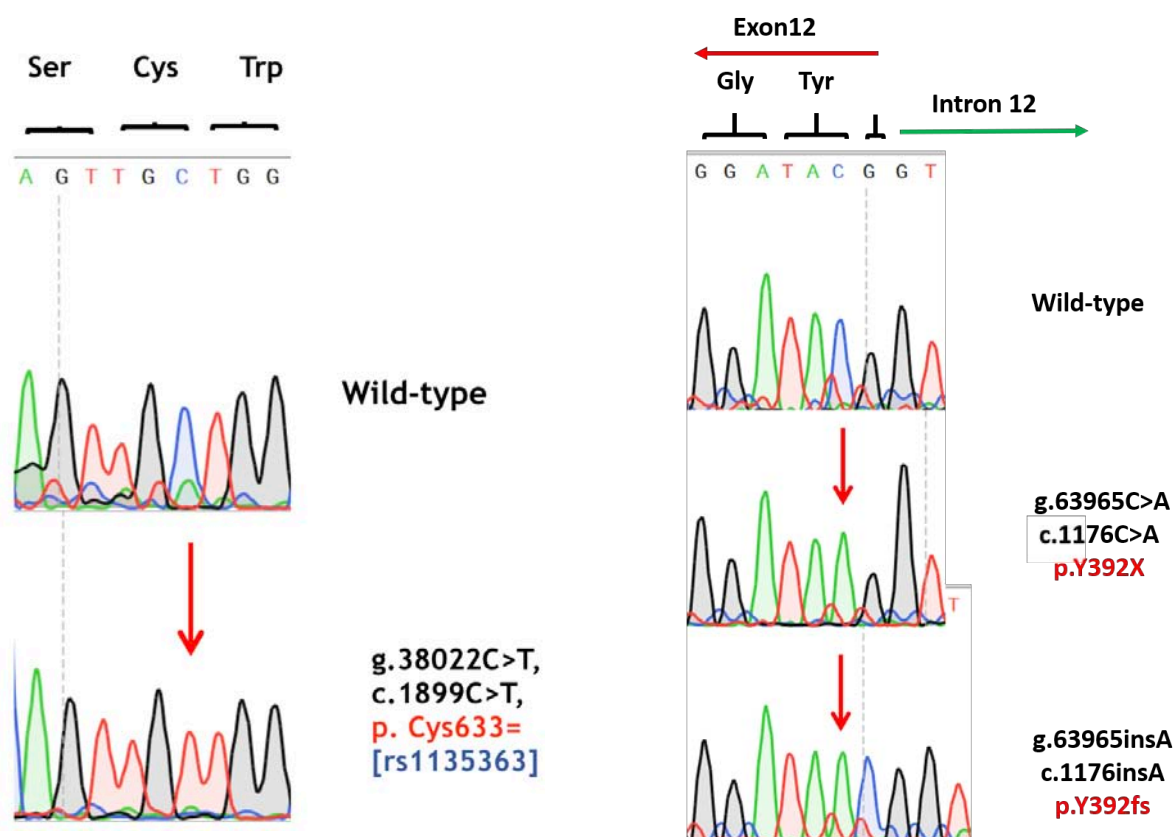
Εικόνα 6. Προϊόντα PCR cDNA.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου *BTK* σε ασθενείς με XLA

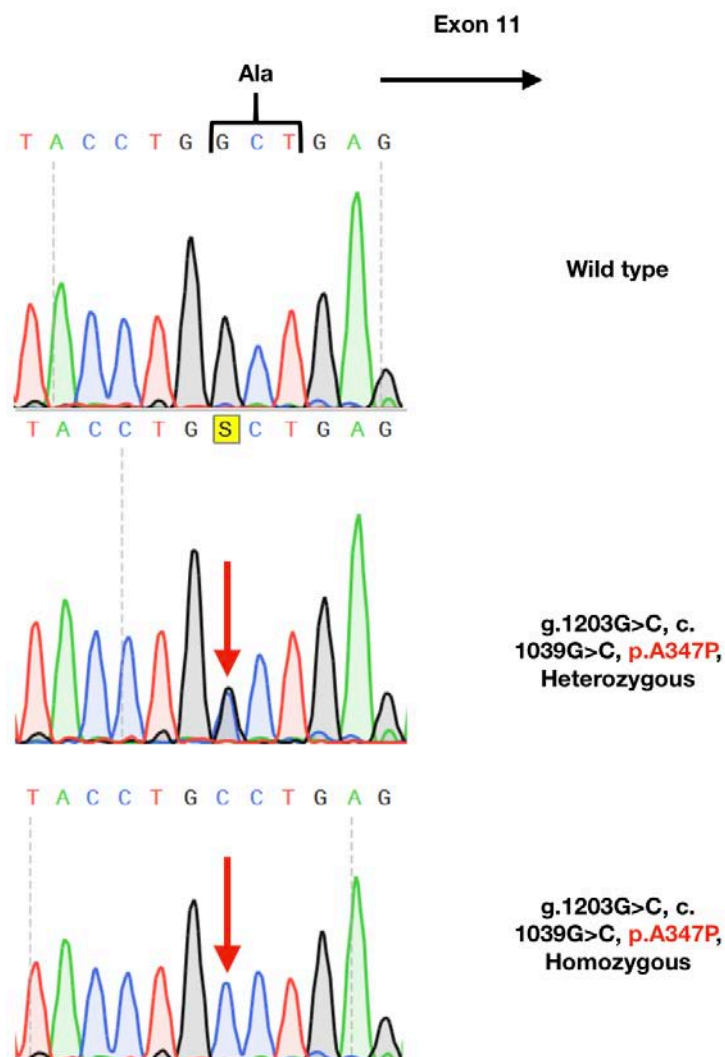
Συνολικά παρατηρήθηκαν παθολογικές μεταλλάξεις και στους τρεις ασθενείς με Αγαμμασφαιριναιμία του Bruton. Στην εικόνα 7. φαίνεται ένα τμήμα του εξονίου 12 στο οποίο παρατηρείται μετάλλαξη στον πρώτο από τους τρεις ασθενείς. Στον ασθενή αυτό έχει γίνει προσθήκη μίας επιπλέον αδενίνης στη θέση c.1176 του cDNA, σε σχέση με τον υγιή μάρτυρα. Αυτό σε πρωτεϊνικό επίπεδο έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, καθώς το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ τυροσίνη μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης (p.Y392fs).

Στην ίδια εικόνα φαίνεται ένα τμήμα του εξονίου 12 στο οποίο παρατηρείται μετάλλαξη στο δεύτερο από τους τρεις ασθενείς. Στον ασθενή έχει γίνει αντικατάσταση μίας κυτοσίνης από μία αδενίνη στη θέση c.1176 του cDNA, σε σχέση με τον υγιή μάρτυρα. Αυτό σε πρωτεϊνικό επίπεδο έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, καθώς το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ τυροσίνη μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης (p.Y392X). Για τον ίδιο ασθενή, όπως φαίνεται στην εικόνα 7., παρατηρείται συνώνυμη μετάλλαξη στο εξόνιο 17.



Εικόνα 7. Αριστερά: Απεικόνιση της συνώνυμης μετάλλαξης του δεύτερου ασθενούς, Δεξιά: Απεικόνιση των παθολογικών μεταλλάξεων του δεύτερου και του πρώτου ασθενούς, αντίστοιχα.

Στην εικόνα 8. φαίνεται ένα τμήμα του εξονίου 11, όπου διαπιστώθηκε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη ενδεικτική της νόσου στον τρίτο ασθενή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αντικατάσταση μίας γουανίνης από μία κυτοσίνη στη θέση c.1039 του cDNA . Σε πρωτεϊνικό επίπεδο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνη από το αμινοξύ προλίνη (p.Ala347Pro). Επιπλέον, η μητέρα του ασθενούς ελέγχθηκε στην περιοχή αυτή για πιθανή φορεία της συγκεκριμένης μετάλλαξης και διαπιστώθηκε ότι όντως φέρει σε ετεροζυγωτία τη συγκεκριμένη γενετική αλλαγή.



Εικόνα 8. Απεικόνιση της αλληλουχίας αγρίου τύπου του υγιούς μάρτυρα, της μετάλλαξης που φέρει σε ετεροζυγωτία η μητέρα και σε ημιζυγωτία ο γιος, αντίστοιχα.

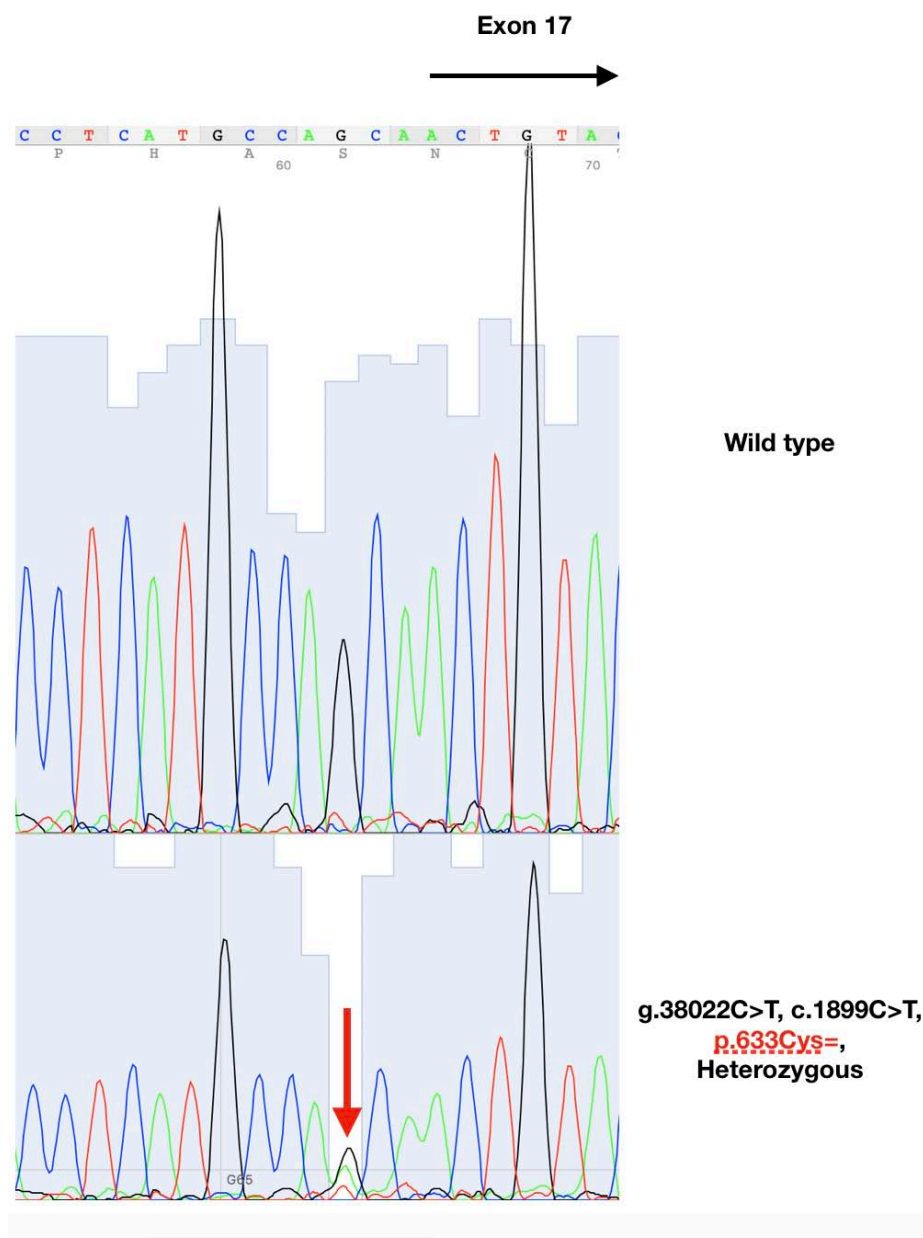
Επίσης, στο εργαστήριο έχει πραγματοποιηθεί μελέτη για ακόμη μία οικογένεια αναφορικά με την XLA. Εξετάστηκαν ένας άρρεν με πιθανή XLA, καθώς επίσης η μητέρα και η αδερφή της. Στον άρρενα ασθενή ανιχνεύθηκε μετάλλαξη συμβατή με XLA στο εξόνιο 11. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε έλλειψη του νουκλεοτιδίου αδερίνη (A) σε ημιζυγωτία στη θέση c. 1211 (c.1211delA, με βάση το μετάγραφο ENST00000621635.4). Στη μητέρα του ασθενούς ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία η παθογόνος γενετική αλλαγή καθιστώντας τη φορέα της νόσου, ενώ στην αδερφή της δε βρέθηκε η παθογόνος μετάλλαξη.

	1	2	3	C
5'UTR	-	-	-	Wt
1-2	-	-	-	Wt
3	-	-	-	Wt
4	-	-	-	Wt
5-6	-	-	-	Wt
7	-	-	-	Wt
8	-	-	-	Wt
9-11	-	-	g.63102G>C,c. 1039G>C,p.A347P	Wt
12-13	g.63965insA, c. 1176insA,p.Y392fs	g.63965C>A, c. 1176C>A,p.Y392X	-	Wt
14	-	-	-	Wt
15-16	-	-	-	Wt
17	-	Wt(g.38022C>T,c. 1899C>T,p.Cys633=),rs 1135363	-	Wt
18	-	Wt(g. 41532G>A),rs1057403	-	Wt

Πίνακας 10. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί που βρέθηκαν κατά μήκος του γονιδίου *BTK* για το σύνολο των ασθενών με XLA.

2.2 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου *BTK* σε ασθενείς με ΧΛΛ

Το γονίδιο εξετάστηκε στο σύνολο των εξονίων του για την ύπαρξη μεταλλάξεων που σχετίζονται με Β-νεοπλασίες και την ανθεκτικότητα στο φάρμακο Ibrutinib σε δώδεκα ασθενείς με Β-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Παρόλα αυτά δε βρέθηκε κάποια μετάλλαξη που να αιτιολογεί την ανθεκτικότητα στον αναστολέα. Ωστόσο, σε μία γυναίκα ασθενή στο εξόνιο 17 στη θέση c.1899C>T (p.Cys633=), εντοπίστηκε μία συνώνυμη μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία, η οποία μπορεί να αποτελεί κάποιον πολυμορφισμό που σχετίζεται με νόσο.



Εικόνα 9. Απεικόνιση της αλληλούχισης αγρίου τύπου και της συνώνυμης μετάλλαξης που φέρει σε ετεροζυγωτία η ασθενής με ΧΛΛ.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο *BTK* και η κινάση τυροσίνης που αυτό κωδικοποιεί βρίσκονται στο σταυροδρόμι ανοσοανεπάρκειας από τη μία και ανοσοθεραπείας B-λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών από την άλλη, καθιστώντας τα έτσι στόχο θεραπευτικών προσεγγίσεων. Συνολικά, η αγαμμασφαιριναιμία εμφανίζεται σε 1:399,000 περιπτώσεις στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη και σε 1:380,000 περιπτώσεις στις ΗΠΑ, ενώ η ΧΛΑ αποτελεί περίπου το ένα τρίτο των λευχαιμιών στις ΗΠΑ.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα ευρήματα που έδωσαν την ώθηση για τον έλεγχο των ασθενών για ΧΛΑ ήταν η απουσία ή ο ελάχιστος αριθμός CD19+ B κυττάρων στην περιφέρεια και οι πολύ χαμηλές ή μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών στον ορό, σε συνδυασμό με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά ευρήματα της νόσου.(7)

Στον τρίτο ασθενή με αγαμμασφαιριναιμία που εξετάστηκε για ΧΛΑ η οριστική διάγνωση του δεν πραγματοποιήθηκε παρά μέχρι πρόσφατα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή ή ο τύπος της μετάλλαξης εντός του γονιδίου *BTK* δεν είναι ικανός να προβλέψει το φαινότυπο της ΧΛΑ. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι στις μονογονιδιακές νόσους διαφορετικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο μπορεί να συνοδεύονται από μία ποικιλία φαινοτύπων.(6)

Η μητέρα του συγκεκριμένου ασθενούς αναλύθηκε και διαπιστώθηκε ότι είναι φορέας της παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης που ανιχνεύθηκε στο γιο της. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μητέρα του δεύτερου ασθενούς, αλλά και στη μητέρα της οικογένειας, η οποία είχε προηγουμένως μελετηθεί στο εργαστήριο. Ωστόσο, δε συμβαίνει πάντα η μητέρα να είναι φορέας της αντίστοιχης μετάλλαξης που εντοπίζεται στο γιο της. Για παράδειγμα στην έρευνα των Conley et al. το 84% των μητέρων των ασθενών με ΧΛΑ ήταν φορείς της αντίστοιχης μετάλλαξης. Αξιοπρόσεκτο είναι το γεγονός ότι στην περίπτωση μίας από τις μητέρες που μελετήθηκαν το ποσοστό να είναι φορέας της ΧΛΑ ήταν 77%, ενώ η κόρη της είχε τις μισές πιθανότητες να είναι φορέας της νόσου σε σχέση με τη μητέρα της (38%).(6)

Η μελέτη μεταλλάξεων στο γονίδιο *BTK* που αφορά την ΧΛΑ είναι αρκετά εκτεταμένη. Οι Speletas et al. μελέτησαν 13 Έλληνες ασθενείς από 12 μη συγγενικές οικογένειες με φαινότυπο ΧΛΑ. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν RT-PCR, NIRCA και, τέλος, αλληλούχιση. Κατά συνέπεια, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε όλους τους ασθενείς και η πληροφορία αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των θηλέων φορέων με PCR γενωμικού DNA στις περιοχές που βρέθηκαν οι μεταλλάξεις. Ο πιο συχνός τύπος μετάλλαξης που παρατηρήθηκε σε 8 από τους 13 ασθενείς ήταν αυτός που οδηγούσε είτε σε πρόωρο τερματισμό είτε σε ένα μεγαλύτερο μη φυσιολογικό μετάγραφο του γονιδίου.(6)

Δύο από τις τρεις μεταλλάξεις που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, εκ των οποίων η μία οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό και η άλλη σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, εδράζονται στο εξόνιο 12, το οποίο αντιστοιχεί στην επικράτεια κινάσης τυροσίνης της πρωτεΐνης (TK). Η επικράτεια αυτή αποτελεί περίπου το 40% της BTK, συνιστώντας τη μεγαλύτερη επικράτεια. Περίπου οι μισές μεταλλάξεις που είναι παθολογικές για την XLA εντοπίζονται στην TK.(45) Αν και πολλά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εντοπίζονται στις περιοχές των μεταλλάξεων στην TK, εμπλέκονται στη δέσμευση κάποιου συμπαραγόντα ή υποστρώματος πολλές μεταλλάξεις έχουν αντίκτυπο στη δομή της πρωτεΐνης.(46) Η τρίτη μετάλλαξη που είναι παρερμηνεύσιμη εντοπίζεται στο εξόνιο 11 και στην επικράτεια SH2 της BTK, η οποία βοηθά την BLNK να έρθει κοντά με την PLCγ στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Οι ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, επομένως δεν παράγεται λειτουργική πρωτεΐνη. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένου των παρερμηνεύσιμων, έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης ή της δραστικότητας της κινάσης (Hashimoto et al, 1996; Holinski-Feder et al, 1998). Από τις παραπάνω παρατηρήσεις εξάγεται ότι το επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης και της δραστικότητας κινάσης, όπως και η σοβαρότητα της νόσου δεν μπορούν να προβλεφθούν με βάση τη φύση και τη θέση των μεταλλάξεων.(47)

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ορισμένες μελέτες έχουν οδηγήσει σε συσχέτιση γονοτύπου και φαινοτύπου σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BTK*. Μία από αυτές περιλάμβανε 67 Κινέζους ασθενείς και έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας εμφάνισης της νόσου και της σοβαρότητας των λοιμώξεων, η δεύτερη από αυτές περιλάμβανε 54 Ισπανούς ασθενείς, διεξήχθη από τους *Lopez-Granados et al.*, και έδειξε ότι λιγότερο σοβαρές μεταλλάξεις σχετίζονται με διάγνωση σε πιο προχωρημένη ηλικία, υψηλότερα επίπεδα IgG/A/M και πολλές εισαγωγές σε νοσοκομεία πριν τη χορήγηση IVIG. Στα ίδια περίπου συμπεράσματα κατέληξε και η ομάδα του *Broides et al.*, ωστόσο σε ασθενείς με παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη σοβαρότητα της νόσου.(48)

Όσον αφορά τα B-αιματολογικές κακοήθειες, από τους δώδεκα ασθενείς που μελετήθηκαν συνολικά δε βρέθηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο που να αιτιολογεί τη νόσο ή την ανθεκτικότητα στη στοχευμένη θεραπεία με τον παράγοντα Ibrutinib. Ανιχνεύθηκε, ωστόσο, μία συνώνυμη γενετική αλλαγή σε μία γυναίκα ασθενή με ΧΛΛ, η οποία μπορεί να αποτελεί κάποιον πολυμορφισμό που σχετίζεται με νόσο.

Στη ΧΛΛ το σηματοδοτικό μονοπάτι του BCR είναι ιδιοσυστατικά ενεργοποιημένο με την BTK να εμφανίζει συνεχή δραστικότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κινάση είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και επέκταση της νόσου. Αξιοθαύμαστο είναι το γεγονός ότι σε μία από αυτές τις έρευνες δείχθηκε σημαντική καθυστέρηση στην έναρξη της λευχαιμίας μετά από στοχευμένη απενεργοποίηση της BTK είτε με το μοντέλο XID/TCL1 ποντικών είτε με τη χορήγηση του Ibrutinib. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τη σημασία στόχευσης της κινάσης από το φάρμακο χωρίς όμως να αποκλείουν και τη συνεισφορά άλλων κινασών στην αποτελεσματικότητά του. Λόγω της αποτελεσματικότητας αυτής έχουν αναπτυχθεί και άλλοι ειδικοί θεραπευτικοί παράγοντες επόμενης γενιάς για την BTK.(37)

Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης BTK είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη λευχαιμίας σε μοντέλα ποντικών IgH.ETμ και προκαλεί εντύπωση ότι σε αυτό το μοντέλο, όπου είχε γίνει πλήρες knock out της πρωτεΐνης δεν παρατηρήθηκε λευχαιμία.(37) Παρόλα αυτά στο παράδειγμα της παραπάνω έρευνας, η πλειοψηφία των XID/TCL1 ποντικών και αυτών στους οποίους χορηγήθηκε Ibrutinib ανέπτυξε πολύ αργότερα λευχαιμία. Το φαινόμενο αυτό σε συνδυασμό με το ότι το knock out της BTK οδήγησε σε παντελή απουσία νόσου, υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα στο φάρμακο μεσολαβείται από την ίδια την πρωτεΐνη. (37)

Επιπλέον στοιχεία που υποστηρίζουν τη στόχευση της BTK στη ΧΛΛ προκύπτουν από την έρευνα των Cheng et al., οι οποίοι μελέτησαν ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΧΛΛ στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί προηγουμένως θεραπεία με Ibrutinib. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι αν και τα συνολικά επίπεδα έκφρασης της BTK σε λευχαιμικά κύτταρα ήταν ίδια με αυτά σε φυσιολογικά, τα επίπεδα έκφρασης της αυτοφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης, η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα ενεργής κινάσης, ήταν σημαντικά υψηλότερα στα λευχαιμικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε και η κινητική της αναστολής της BTK και δείχθηκε στατιστικά μη σημαντική μείωση της πρωτεΐνης σε 24 ώρες, υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της δράσης του BCR δεν επιτεύχθηκε αμέσως μετά την πρόσδεση του φαρμάκου. Αντίθετα, μετρήσεις της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης εμφάνισαν χρονοεξαρτώμενες διακυμάνσεις τις πρώτες 28 μέρες της θεραπείας με Ibrutinib. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου σε όλους τους ασθενείς παρατηρήθηκε μέσω ακτινογραφίας μείωση της λεμφαδενοπάθειας, υπονοώντας ότι μοριακά και κυτταρικά γεγονότα πλαισιώνουν τις αποκρίσεις των λεμφαδένων στους ασθενείς. Στην πραγματικότητα, οι βιολογικές αλλαγές που επιφέρει το φάρμακο πιθανόν συνέβησαν μεταξύ των 24 ωρών και της δέκατης πέμπτης μέρας. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλη έρευνα, όπου δείχθηκε ότι πάνω από το 80% της BTK είναι

δεσμευμένο 24 ώρες μετά την δόση σε ασθενείς που λάμβαναν ημερησίως 560mg του φαρμάκου.(16)

Όπως και σε άλλες στοχευμένες αντι-καρκινικές θεραπείες, έτσι και στην περίπτωση του Ibrutinib μπορεί να εκδηλωθεί επίκτητη ανθεκτικότητα. Πρόσφατα έχειδειχθεί ότι τα ανθεκτικά μεταλλάγματα υπάρχουν προ της θεραπείας με Ibrutinib και ότι γενετικές αλλαγές που επηρεάζουν και άλλα συστατικά του BCR μονοπατιού μπορεί να προκαλούν μη αποκκρισιμότητα στη θεραπεία.(35) Με τη βοήθεια αλληλούχησης ολόκληρου του εξόματος, σε μία έρευνα, περιγράφηκαν 6 ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΧΛΛ, 5 από τους οποίους εμφάνισαν μετάλλαξη στη θέση C481S του γονιδίου *BTk* και 2 από αυτούς εμφάνισαν τρεις διακριτές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PLCG2*.(49) Πιο συγκεκριμένα, στα καρκινικά κύτταρα του ενός από τους δύο ασθενείς εντοπίστηκαν στο γονίδιο *PLCG2* οι μεταλλάξεις L845F, R665W και S707Y μαζί με τη μετάλλαξη C481S στο γονίδιο *BTk*, ενώ στον άλλο ασθενή εντοπίστηκε μόνο η μετάλλαξη R665W στο γονίδιο *PLCG2*. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο επάγεται ανθεκτικότητα στο Ibrutinib για το *BTk* προκύπτει από το γεγονός ότι ο αναστολέας προσδένεται ομοιοπολικά στη θειολική ομάδα Cys-481 της πρωτεΐνης, ο αντίστοιχος μηχανισμός για το γονίδιο *PLCG2* δεν είναι πλήρως κατανοητός.(49)

Συμπερασματικά, η ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου *BTk* είναι εξέχουσας σημασίας, προκειμένου να τεθεί οριστική διάγνωση σε ασθενείς με πιθανή ΧΛΛ. Όσο για τα Β-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, δεν απαιτείται μελέτη του γονιδίου *BTk* προ της έναρξης αντι-BTK θεραπείας σε ασθενείς με Β-λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Μελέτη του γονιδίου προφανώς και ενδείκνυται μόνο σε ασθενείς με ανθεκτικότητα ή προοδευτική απώλεια της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

4. ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952;9(6):722-8.
2. Schwartz SA. Bruton Agammaglobulinemia: Medscape; 2018 [Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1050956-overview>].
3. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361(6409):226-33.
4. Wood P. Primary antibody deficiency syndromes. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 2):99-108.
5. Taneja AC, A. Bruton Agammaglobulinemia: StatPearls Publishing; 2018, January.
6. Speletas M, Kanariou M, Kanakoudi-Tsakalidou F, Papadopoulou-Alataki E, Arvanitidis K, Pardali E, et al. Analysis of Btk mutations in patients with X-linked agammaglobulinaemia (XLA) and determination of carrier status in normal female relatives: a nationwide study of Btk deficiency in Greece. *Scand J Immunol*. 2001;54(3):321-7.
7. Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev*. 2005;203:216-34.
8. McCusker C, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011;7 Suppl 1:S11.
9. Speletas G. Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες στους ενήλικες Σύγχρονη κλινική προσέγγιση. *Archives of Hellenic Medicine*. 2013;30(4):420-35.
10. Gaspar HB, Conley ME. Early B cell defects. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(3):383-9.
11. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*. 2018;17(1):57.
12. Middendorp S, Dingjan GM, Maas A, Dahlenborg K, Hendriks RW. Function of Bruton's tyrosine kinase during B cell development is partially independent of its catalytic activity. *J Immunol*. 2003;171(11):5988-96.
13. Moreau T, Calmels B, Barlogis V, Michel G, Tonnelle C, Chabannon C. Potential application of gene therapy to X-linked agammaglobulinemia. *Curr Gene Ther*. 2007;7(4):284-94.
14. Bestas B, Turunen JJ, Blomberg KE, Wang Q, Mansson R, El Andaloussi S, et al. Splice-correction strategies for treatment of X-linked agammaglobulinemia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(3):510.
15. Kohn DB, Kuo CY. New frontiers in the therapy of primary immunodeficiency: From gene addition to gene editing. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):726-32.
16. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649-57.
17. Gossman WG TA, Master SR. Cancer, Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Stat Pearls* (Internet).
18. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 2013;34(12):592-601.
19. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:163-83.
20. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002;99(11):4087-93.

21. Deyan Yosifov CW, Stephan Stilgenbauer, Daniel Mertens. From Biology to Therapy: The CLL Success Story. *HemaSphere*. 2019;3(2).
22. BTK gene Bruton tyrosine kinase Bethesda [2018 Dec 2]. Genetics Home Reference].
23. BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA TYROSINE KINASE; BTK [
24. Rudi W Hendriks PFvL. BTK (Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [Internet]. 2009.
25. Akinleye A, Chen Y, Mukhi N, Song Y, Liu D. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol*. 2013;6:59.
26. Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol*. 1994;152(2):557-65.
27. Thomas J. Kindt BAO, Richard A. Goldsby. *Kuby Immunology*. 4th ed.
28. UniProtKB - Q06187 (BTK HUMAN) [
29. Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, Druker BJ, Ozaki K, Handa M, et al. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood*. 2000;95(5):1663-70.
30. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*. 2008;132(5):794-806.
31. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun*. 2015;6:7360.
32. Väliäho J SC, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-Linked agammaglobulinemia 2006 [
33. Kiaee F, Nasser S, Sohani M, Delavari S, Habibi S, Shahkarami S. Correlation Analysis of Mutation Severity and BTK-expression by Clinical Manifestations in Patients with X-linked Agammaglobulinemia. *Immunology and Genetics Journal*. 2018;1(1):34-42.
34. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, Bozic I, Zhang H, Sarosiek K, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun*. 2016;7:11589.
35. Smith CI. From identification of the BTK kinase to effective management of leukemia. *Oncogene*. 2017;36(15):2045-53.
36. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117(23):6287-96.
37. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2014;123(8):1207-13.
38. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(6):507-16.
39. Wiestner A. Targeting B-Cell receptor signaling for anticancer therapy: the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):128-30.
40. OPEN CHEMISTRY DATABASE [OPEN CHEMISTRY DATABASE].
41. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, Herman SE, Tian X, Maric I, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;129(11):1469-79.
42. Lampson BL, Brown JR. Are BTK and PLCG2 mutations necessary and sufficient for ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia? *Expert Rev Hematol*. 2018;11(3):185-94.

43. Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, Zheng Y, Downs S, Hupke M, et al. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *J Biol Chem.* 1999;274(14):9587-99.
44. Imbruvica. Every Day Health.
45. Moschese V, Orlandi P, Plebani A, Arvanitidis K, Fiorini M, Speletas M, et al. X-chromosome inactivation and mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. Italian XLA Collaborative Group. *Mol Med.* 2000;6(2):104-13.
46. Orlandi P, Ritis K, Moschese V, Angelini F, Arvanitidis K, Speletas M, et al. Identification of nine novel mutations in the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinaemia patients. *Hum Mutat.* 2000;15(1):117.
47. Ritis K, Speletas M, Tsironidou V, Pardali E, Kanariou M, Moschese V, et al. Absence of Bruton's tyrosine kinase (Btk) mutations in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;102(5):1241-8.
48. Lee PP, Chen TX, Jiang LP, Chan KW, Yang W, Lee BW, et al. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation in 62 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol.* 2010;30(1):121-31.
49. Walliser C, Hermkes E, Schade A, Wiese S, Deinzer J, Zapatka M, et al. The Phospholipase Cgamma2 Mutants R665W and L845F Identified in Ibrutinib-resistant Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Are Hypersensitive to the Rho GTPase Rac2 Protein. *J Biol Chem.* 2016;291(42):22136-48.