



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Μεταλλάξεις του TAC1
Στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Μακρή Σοφία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Επιβλέπων
- ΣΠΕΛΕΤΑΣ ΜΑΤΘΑΙΟΣ, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», με εξειδίκευση στην αιματολογία.

Λάρισα, Φεβρουάριος, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Mutations of TAC1 in Chronic Lymphocytic Leukemia

by
Makri Sofia

Examining Committee:

- **GIANNAKULAS NIKOLAOS**, Assistant Professor of Internal Medicine – Hematology, Supervisor
- **SPELETAS MATTHAIOS**, Professor of Medical Immunology
- **PETEINAKI EYTHIMIA**, Professor of Medical Biopathology – Clinical Microbiology

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

Larisa, February , 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών « Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτον από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή αυτού του εκπονήματος επίκουρο καθηγητή κ. Γιαννακούλα Νικόλαο για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε , την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, τον Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο για την πολύτιμη καθοδήγησή του και για την δυνατότητα εκπλήρωσης των πειραμάτων μου στο εργαστήριό του.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Πετεινάκη Ευθυμία που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσιντή Γερασιμίνα για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθειά της, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας , καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπως την Ραφτοπούλου Σοφία , την Περιστέρη Αθανασία-Μαρίνα και την Φουσίκα Αθανασία οι οποίοι με τα πλούσια πνευματικά προσόντα και το ήθος τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην ιατρό αιματολόγο Γεωργιάδη Ελένη για την καθοριστική της βοήθεια, η οποία στάθηκε σημαντικός αρωγός στην προσπάθειά μου και με υποστήριξε σε κάθε φάση της πορείας μου. Καθώς και την βιολόγο Ρούκα Ερασμία η οποία αποτέλεσε πρότυπο και πηγή έμπνευσης για μένα και με την υποστήριξή της κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το πόνημα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο σύζυγό μου , στους γονείς μου και τα παιδιά μου που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ), σύμφωνα με την Παγκόσμια Ταξινόμηση της WHO, ανήκει στα Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα Β-κυτταρικής αρχής και αποτελεί τον πιο συχνό τύπο λευχαιμίας στο δυτικό κόσμο με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Αρκετοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, μεταξύ αυτών καθοριστικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει το αντιγονικό ερέθισμα εντός ενός συγκεκριμένου μικροπεριβάλλοντος καθώς και η αποτυχία των αποπτωτικών μηχανισμών, των μονοπατιών δηλαδή που αφορούν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί τεράστια πρόοδος στη διαχείριση των ασθενών με ΧΛΛ. Βαθύτερος στόχος πια στον τομέα της ΧΛΛ αποτελεί η εφαρμογή μιας θεραπείας που θα προκύπτει από τον συνδυασμό των νέων φαρμάκων και θα επιτρέπει την επίτευξη μακράς ύφεσης με ταυτόχρονη όμως αποδέσμευση του ασθενούς από οποιαδήποτε μορφή θεραπείας.

Η πρωτεΐνη TACI (Transmembrane Activator and CALM Interactor) είναι γνωστό ότι ανευρίσκεται στην επιφάνεια των Β κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και μέσω των αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια, στην επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων αλλά και στην ωρίμανση και παραγωγή αντισωμάτων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, στην οποία συμπεριλήφθηκαν 50 Έλληνες ασθενείς που έπασχαν από ΧΛΛ, ήταν η αναζήτηση μεταλλάξεων που αφορούν στο γονίδιο TNFRSF13B, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI, και ειδικότερα στα εξόνια 3 και 4.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή μελέτη του γονιδίου ήταν περιφερικό αίμα ή δείγμα μυελού των οστών. Στα δείγματα των ασθενών πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση DNA, έπειτα ενίσχυση των εξονίων 3 και 4 του γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% και τέλος ανάλυση αλληλουχίας βάσεων sequencing.

Καμία μετάλλαξη δεν αναδείχτηκε από την παρούσα έρευνα που να αφορά στα εξόνια 3 και 4 του υπό εξέταση γονιδίου. Ανιχνεύθηκαν μόνο κάποιοι πολυμορφισμοί, οι rs 2274892 g.28376 A>C και rs 35062843 g.28197 T>G, χωρίς όμως να έγινε κάποια περαιτέρω συσχέτιση με τη ΧΛΛ.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), according to the World Health Organization (WHO) is a chronic lymphoproliferative disease of B cell origin and the most common leukemia in the Western world. Many molecular mechanisms and functionally relevant biological programs seem to be of importance in the pathogenesis of the disease, with emphasis on the antigenic drive within a specific microenvironment along with the apoptotic pathways failure that may have eventually a role in the survival of CLL cells.

There has been major progress in the management of CLL patients in the past decade. The introduction of chemoimmunotherapy and more recently novel agents has revolutionized the management of CLL. The main target in the treatment of CLL patients is how best to combine novel agents as well as administering time-limited treatments to achieve deep remissions that allow stopping therapy.

Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) is a major regulator in the immune responses. TACI is mainly expressed by mature B cells, inhibits B cell expansion and promotes the differentiation and survival of plasma cells.

Fifty CLL patients were included in the present study. The purpose was to analyze the mutational status of the TNFRSF13B gene that encodes TACI protein, specifically its exons 3 and 4. The methods used for the analysis was PCR- Sequencing methods.

There was no mutation detected in the samples analyzed. We only identified some intronic polymorphism, rs 2274892 G.28376 A>C and rs 35062843 G.28197 T>G.

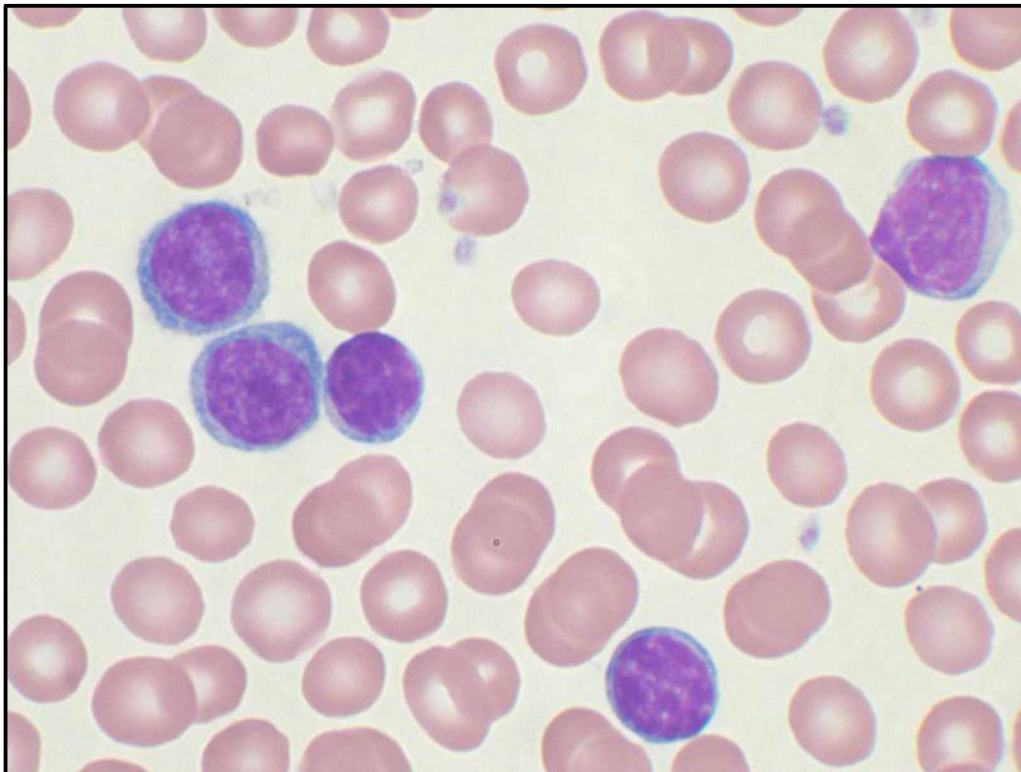
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΛΕΜΦΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	9
2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΧΛΛ).....	11
2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	13
2.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	13
2.2.1 Το Β κύτταρο και η διαφοροποίηση του.....	13
2.2.2 Παθολογικό Β κύτταρο.....	16
2.2.3 Το μικροπεριβάλλον στη ΧΛΛ.....	18
2.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	20
2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	23
2.5 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	24
2.5.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΤΑ RAI.....	24
2.5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΤΑ BINET.....	25
2.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΧΛΛ.....	25
2.6.1 Ανοσοσφαινοτυπικοί δείκτες.....	25
2.6.2 Κυτταρογενετικοί Δείκτες.....	26
2.6.3 Φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGVH.....	26
2.6.4 Μοριακή στερεοτυπία του BCR.....	26
2.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	27
2.8 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΧΛΛ.....	31
2.9 ΕΠΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	33
2.10 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΛΛ.....	34
3. ΠΡΩΤΕΙΝΗ TAC1.....	35
3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ TAC1.....	37
3.2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TAC1.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	44
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	46
3.1 Απομόνωση DNA.....	46
3.2 PCR για το γονίδιο TNFRSF13B/TACI.....	47
3.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης	48
3.4 Αλληλούχιση των Προϊόντων της PCR.....	50
3.4.1 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	50
3.4.2 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.....	51
3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



en.wikipedia.org

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ταξινόμηση νεοπλασμάτων του λεμφικού ιστού

Η Παγκόσμια Ταξινόμηση της WHO βασίζεται σε 2 βασικές αρχές για την ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του λεμφικού ιστού. Η πρώτη αφορά στην ταξινόμησή τους βάσει της καταγωγής του νεοπλασματικού κυττάρου και η δεύτερη στο διαχωρισμό των διαφόρων νοσολογικών οντοτήτων, που όμως μπορεί να χαρακτηρίζονται από συναφή κλινική εικόνα. Αυτό επιτυγχάνεται με συνδυασμό μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών, γενετικών, μοριακών και κλινικών χαρακτηριστικών.

Η ταξινόμηση του 2001 για τα λεμφικά νεοπλάσματα βασίστηκε στην αναθεωρημένη Αμερικανικο-Ευρωπαϊκή ταξινόμηση (REAL) που δημοσιεύθηκε από τη Διεθνή Ομάδα Μελέτης Λεμφώματος (ILSG) το 1994. Το 2008 αυτή τροποποιήθηκε ενσωματώνοντας νέα κριτήρια και οντότητες φτάνοντας στο 2016, όταν ανακοινώθηκε η τελευταία ταξινόμηση με επικαιροποιημένα δεδομένα για τις υπάρχουσες οντότητες αλλά και την εισαγωγή κάποιων νεότερων (1).

Σύμφωνα με αυτή, στην ευρύτερη κατηγορία των Β λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών περιλαμβάνονται νοσήματα από **ώριμα Β** λεμφοκύτταρα, τα οποία αφορούν πρωτίστως το περιφερικό αίμα, τον μυελό και άλλα λεμφικά όργανα, όπως είναι οι λεμφαδένες και ο σπλήνας. Χαρακτηρίζονται από χρονιότητα και αφορούν σε ενήλικες ασθενείς. Σταθερό εύρημα είναι η παρουσία στο περιφερικό αίμα λευχαιμικών κυττάρων σε ποικίλο βαθμό. Κάποιες από αυτές τις οντότητες χαρακτηρίζονται ως λευχαιμίες ή αντιπροσωπεύουν λευχαιμική φάση ενός λεμφώματος. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζεται η τελευταία ταξινόμηση της WHO 2016 (2).

Table 1. 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

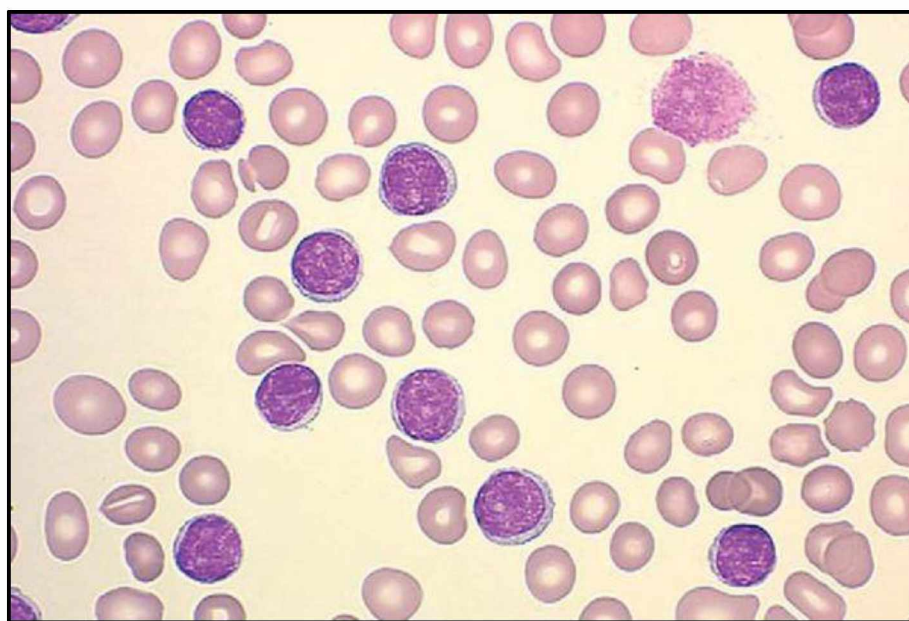
Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extrasosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
<i>In situ follicular neoplasia*</i>
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
<i>In situ mantle cell neoplasia*</i>
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV ⁺ DLBCL, NOS*
<i>EBV⁺ mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
<i>Intravascular large B-cell lymphoma</i>
ALK ⁺ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8⁺ DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Mature T and NK neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV ⁺ T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma

Table 1. (continued)

Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*</i>
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30 ⁺ T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous CD8⁺ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
<i>Primary cutaneous acral CD8⁺ T-cell lymphoma*</i>
<i>Primary cutaneous CD4⁺ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁺
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁻ *
<i>Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΧΛΛ)

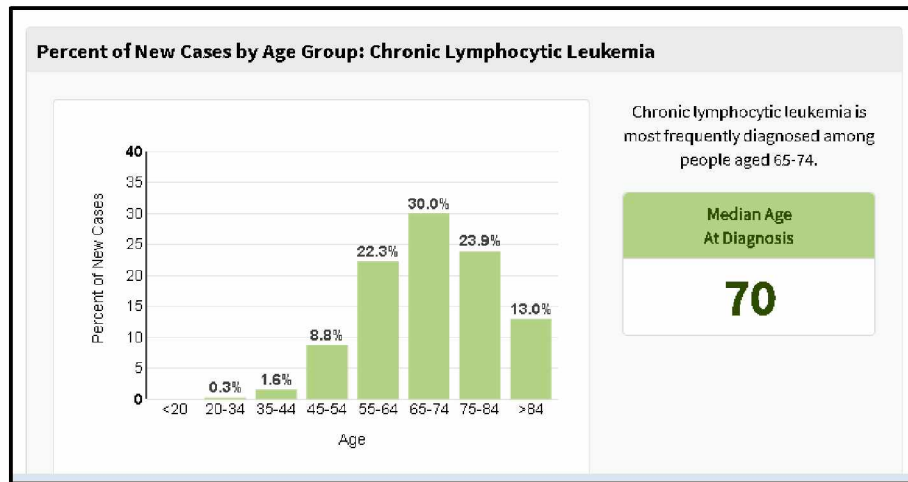
Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ), σύμφωνα με την Παγκόσμια Ταξινόμηση της WHO, ανήκει στα Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα Β-κυτταρικής αρχής (2). Χαρακτηριστικό εύρημα της νόσου είναι η αυξημένη παρουσία στο περιφερικό αίμα ώριμων Β λεμφοκυττάρων όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1** (3).



Εικόνα 1. Επίχρισμα περιφερικού αίματος από ασθενή με ΧΛΛ. Από: <https://askhematologist.com/chronic-lymphocytic-leukemia/>

(τελευταία πρόσβαση: 10.02.20)

Αποτελεί τον πιο συχνό τύπο λευχαιμίας στο δυτικό κόσμο με συχνότητα 4,9 / 100.000 ετησίως (4) και προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους. Αν λάβουμε υπόψιν την ηλικία, και πιο συγκεκριμένα στην ηλικιακή ομάδα των 65-74, τότε παρατηρείται αύξηση στη συχνότητα σε 30 / 100.000 ετησίως. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 70 έτη (**Εικόνα 2**), ενώ περίπου 10% των ασθενών ανήκουν σε μικρότερη ηλικία (κάτω των 55 ετών). Η ΧΛΛ επηρεάζει διπλάσιο αριθμό αντρών σε σχέση με τις γυναίκες (**Εικόνα 3**),(4). Χαρακτηρίζεται από in vivo συσσώρευση μονοκλωνικών Β λεμφοκυττάρων στο αίμα, το μυελό των οστών, τους λεμφικούς ιστούς και τον σπλήνα.

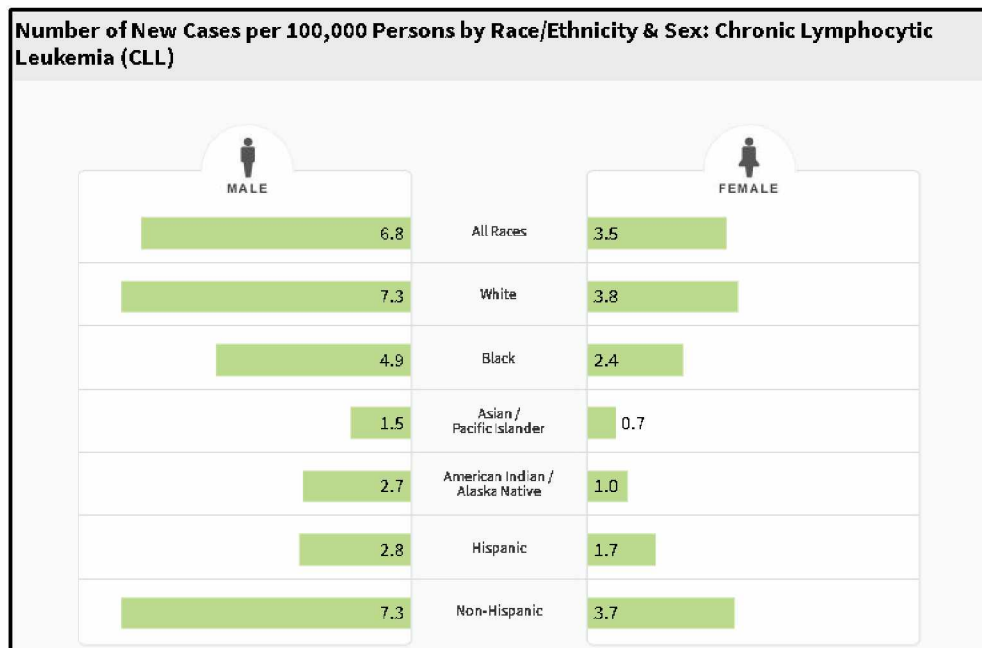


Εικόνα 2. Συχνότητα εμφάνισης της ΧΛΛ βάσει ηλικίας .

Από: Chronic Lymphocytic Leukemia - Cancer Stat Facts

<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html> (τελευταία πρόσβαση: 21.02.20)

Η ΧΛΛ σπάνια απαντάται σε Ασιατικούς πληθυσμούς (Κίνα, Ιαπωνία) (**Εικόνα 3**). Είναι πιο κοινή στους Καυκάσιους και μειώνεται σε συχνότητα με κατιούσα σειρά μεταξύ Μαύρων, Ισπανών, Ινδών και Ασιατών. Η εξήγηση για αυτήν την ετερογένεια παραμένει αδιευκρίνιστη αλλά μαρτυρά την διαφορετική επίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την εκδήλωση της νόσου.



Εικόνα 3. Αριθμός νέων ασθενών με ΧΛΛ βάσει δημογραφικών στοιχείων. Από:

Chronic Lymphocytic Leukemia - Cancer Stat Facts

<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html> (τελευταία πρόσβαση: 21.02.20)

Πρόκειται για μια επίκτητη διαταραχή. Ωστόσο, φαίνεται ότι το νόσημα αυτό συνδέεται με κληρονομική προδιάθεση και μάλιστα υπάρχει αυξημένος κίνδυνος (3 έως 8 φορές περισσότερο) εμφάνισης της νόσου μεταξύ των μελών της οικογένειας των ασθενών με ΧΛΛ (5).

2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ΧΛΛ ως ξεχωριστή κλινική οντότητα αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1903 από τον Turk, ο οποίος περιέγραψε τόσο τα κλινικά κριτήρια της διάγνωσης όσο και τα χαρακτηριστικά που τη διαφοροποιούν από τα λεμφώματα. Ωστόσο, η παθογένεια της νόσου διευκρινίστηκε τελικά το 1966-1967 (6).

Πιο συγκεκριμένα, δύο ανεξάρτητοι ερευνητές, ο Dameshek και Galton πρότειναν για την παθογένεια της ΧΛΛ την θεωρία της προοδευτικής συσσώρευσης λεμφοκυττάρων ανοσολογικά “μη ικανών” στους λεμφαδένες και / ή στον μυελό και σταδιακά και στα υπόλοιπα αιμοποιητικά όργανα. Αυτή η θεωρία τελικά αποτέλεσε τη βάση της κλινικής σταδιοποίησης του νοσήματος, ενώ εξηγεί και την σταδιακή εμφάνιση των διαταραχών του ανοσολογικού συστήματος που χαρακτηρίζουν αυτή τη νόσο, δηλαδή την υπογαμμασφαιριναιμία και τις διαταραχές αυτοάνοσης αρχής (1).

2.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΛΛ

Αρκετοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, μεταξύ αυτών καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει το αντιγονικό ερέθισμα εντός ενός συγκεκριμένου μικροπεριβάλλοντος καθώς και η αποτυχία των αποπτωτικών μηχανισμών, των μονοπατιών δηλαδή που αφορούν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

2.2.1 ΤΟ Β ΚΥΤΤΑΡΟ ΚΑΙ Η ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ

Τα Β κύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην χυμική ανοσία, καθώς παράγουν τα αντισώματα που προστατεύουν τον οργανισμό από τα ποικίλα αντιγόνα στα οποία εκτίθεται. Παράγονται από πρόδρομες μορφές του αιμοποιητικού κυττάρου μετά από συνεχή ωρίμανση και διαδικασία επιλογής. Διακρίνονται στα Β1 κύτταρα που αποτελούν έναν μικρό μόνο υποπληθυσμό των Β κυττάρων και τα Β2 που αντιπροσωπεύουν τον κύριο υποπληθυσμό τους. Σημαντικός σταθμός στην κατανόηση

της βιολογίας του B κυττάρου ήταν η αναγνώριση των γενετικών βλαβών που οδηγούν στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες. Διαταραχές στην παραγωγή και λειτουργία του B κυττάρου οδηγούν στην αυτοανοσία, στην κακοήθεια, στην ανοσοανεπάρκεια και στην αλλεργία.

Τα B λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Η διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων στηρίζεται σε μια ιδιαίτερος πολύπλοκη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια με χαρακτηριστική έκφραση επιφανειακών και ενδοκυττάρων μορίων που υποδηλώνουν τελικά τη φάση που βρίσκεται το κύτταρο κάθε φορά.

Στα πολύ πρώιμα στάδια της ωρίμανσης του B κυττάρου, όταν αυτό εξαρτάται ακόμη από το μυελό, παρατηρούνται αναδιατάξεις στο DNA που οδηγούν στο σχηματισμό των γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται συνδέσεις των D_H και J_H γονιδιακών τμημάτων που παρατηρούνται και στα δύο χρωμοσώματα, καθώς το κύτταρο εισέρχεται στο στάδιο του προ-προ-B-κυττάρου. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται επιπρόσθετες αναδιατάξεις που οδηγούν στη σύνδεση των $V_H / D_H J_H$ γονιδιακών τμημάτων με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός λειτουργικού γονιδίου που παράγει μ βαριές αλυσίδες. Παράλληλα, εκφράζονται τα μόρια $VpreB$ και $\lambda 5$ που μετά την ένωσή τους συνιστούν τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες (Εικόνα από Pieper et al). Ο υποδοχέας του B κυττάρου (B cell receptor, BCR) προκύπτει από την σύνδεση των βαριών μ αλυσίδων με τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες, οπότε και συνιστά πρόδρομη μορφή στη φάση αυτή (προ-BCR). Το προ-B κύτταρο εκφράζει το μόριο CD25 και εισέρχεται στον κυτταρικό κύκλο.

Οι αναδιατάξεις που αφορούν στις κ και λ ελαφρές αλυσίδες επιτυγχάνονται τελικά με συμμετοχή ενζύμων όπως είναι το RAG. Οι αλυσίδες αυτές αντικαθιστούν τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες του προ-BCR, ζευγαρώνουν με τις βαριές αλυσίδες και σχηματίζουν τελικά την ανοσοσφαιρίνη IgM. Τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης ποικίλουν και σχετίζονται με τη δραστηριότητα του υποδοχέα. Τα υψηλά επίπεδα της IgM επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης και άλλων γονιδίων στα ανώριμα B κύτταρα ευοδώνοντας τελικά την μετανάστευσή τους από τον μυελό στην κυκλοφορία.

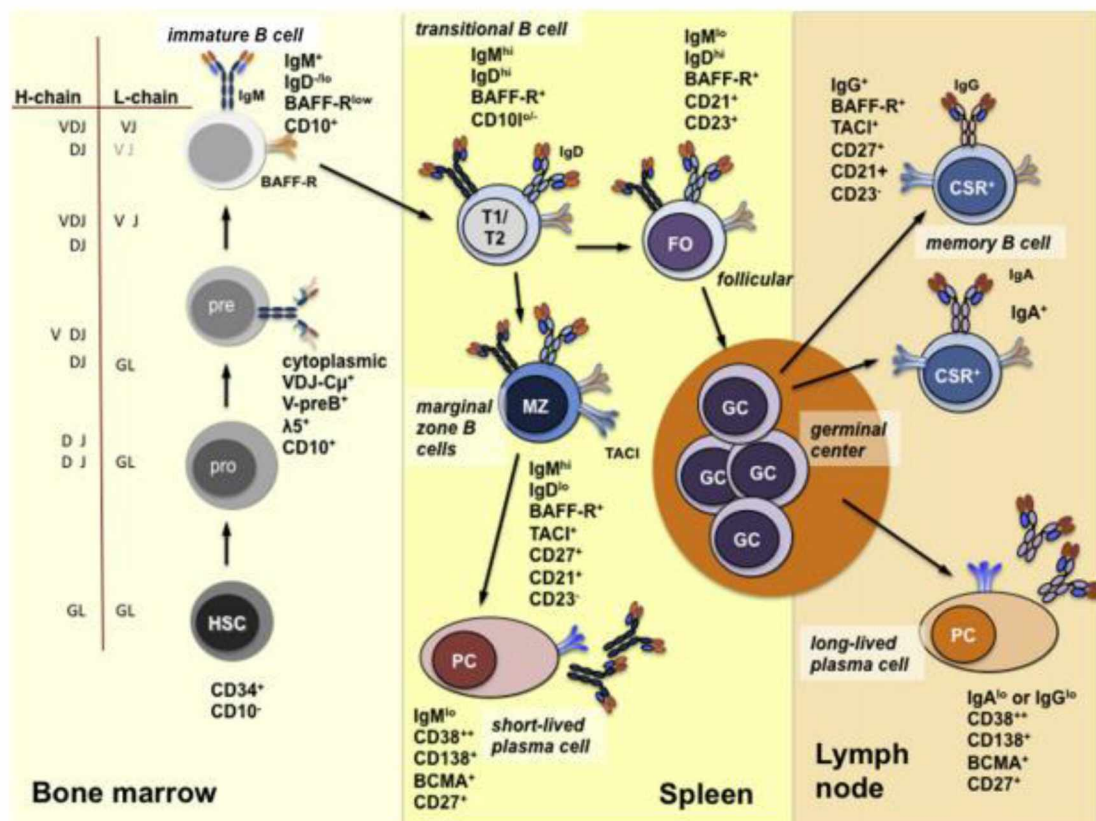
Ο σπλήνας αποτελεί έναν πρώτο σταθμό όπου δέχονται σήματα επιβίωσης μέσω του BAFFR οπότε και ολοκληρώνουν την ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους σε

λεμφοζιδιακά ή κύτταρα οριακής ζώνης (MZ, marginal zone) ανάλογα με την ειδικότητα του υποδοχέα του B κυττάρου (7).

Τα κύτταρα της οριακής ζώνης όταν έρχονται σε επαφή με αντιγόνα και μέσω αλληλεπίδρασης με τα ουδετερόφιλα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα με μικρή διάρκεια ζωής. Αντίστοιχα, τα λεμφοζιδιακά B κύτταρα ενεργοποιούνται στο βλαστικό κέντρο με την πρόσδεση αντιγόνου και μέσω T βοηθητικών κυττάρων διαφοροποιούνται σε B κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα (7).

Η ενεργοποίηση των B κυττάρων επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια για την ισοτυπική μεταστροφή όπως είναι το μονοπάτι του TACI, ειδικά στα B κύτταρα οριακής ζώνης μεταβάλλοντας την συγγένεια του BCR με τον ισότυπο του (IgM σε IgG, IgA ή IgE).

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση του B λεμφοκυττάρου συνοψίζονται στην **Εικόνα 4**.

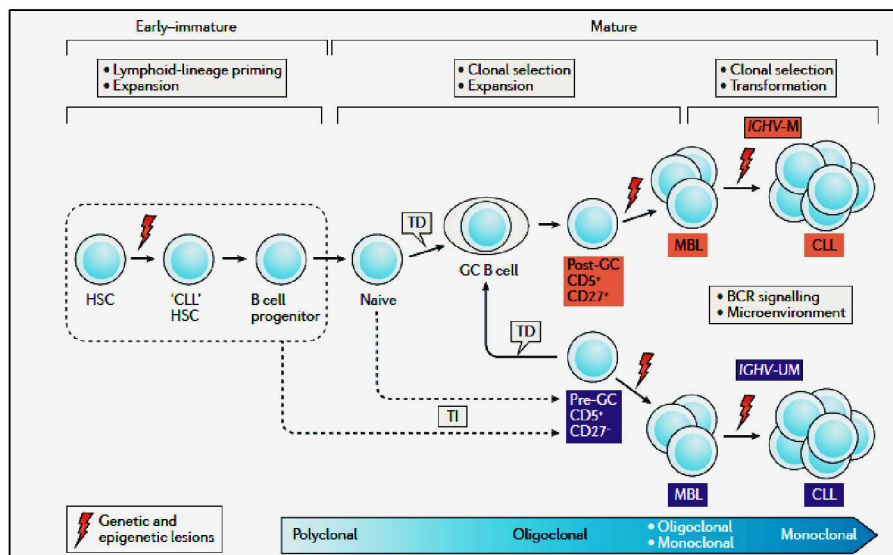


Εικόνα 4. Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση του B κυττάρου.

Από: Pieper K et al, B-cell biology and development, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013.

2.2.2 Παθολογικό B κύτταρο

Ο φαινότυπος του παθολογικού κυττάρου εξακολουθεί να παραμένει αντικείμενο διαφωνίας, ωστόσο είναι σαφές ότι η πρόωμη διαταραχή μάλλον συμβαίνει στο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο (HSCs, hematopoietic stem cells) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5** (8). Από μελέτες in vitro έχει φανεί η ικανότητα των HSCs, που προέρχονται από ασθενείς πάσχοντες από ΧΛΛ, να ενσωματώνονται σε ανοσοανεπαρκείς επίμυες και να προκαλούν την παραγωγή κλωνικών Β-λεμφοκυττάρων (9). Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την παρουσία πρόωμων διαταραχών στα HSCs που τους δίνουν το πλεονέκτημα να εξελιχθούν σε Β-λεμφοκύτταρα (9).

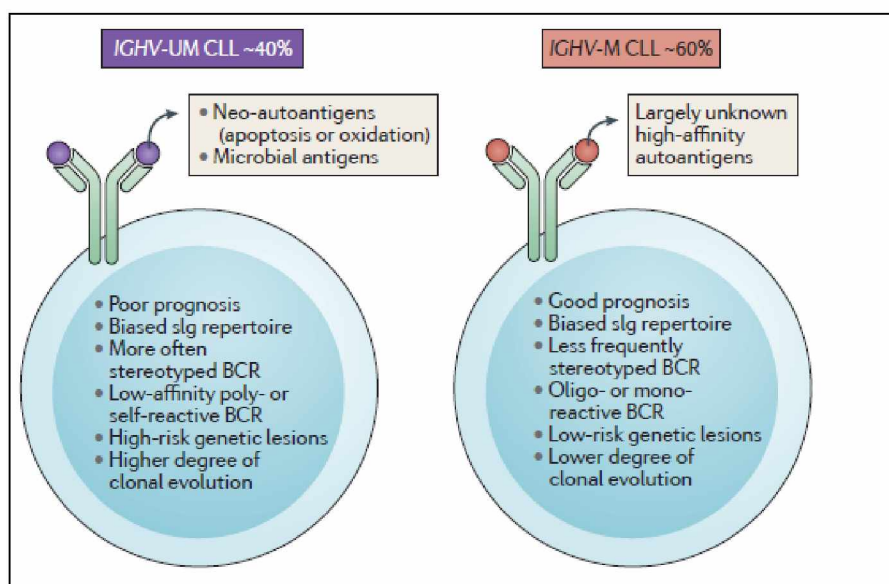


Εικόνα 5. Η προέλευση του παθολογικού κυττάρου στη ΧΛΛ . Από: Fabbri G, et al, The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group, 2016

Στην επιφάνεια των παθολογικών Β-κυττάρων εκφράζεται το μόριο CD5, το οποίο ανευρίσκεται μόνο σε μικρό ποσοστό στα φυσιολογικά Β-κύτταρα. Πρόκειται όμως για έκφραση που αποτελεί δευτερογενή αλλαγή, καθώς από τη σύγκριση του παθολογικού κυττάρου με τις διάφορες κατηγορίες λεμφοκυττάρων (άωρα, κύτταρα μνήμης κτλ) αυτό προσομοιάζει περισσότερο είτε με κύτταρα μνήμης, όταν πρόκειται για παθολογικά κύτταρα με μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη, είτε με naïve (αθώα) Β κύτταρα όταν πρόκειται για παθολογικά κύτταρα με αμετάλλακτη ανοσοσφαιρίνη (8). Βάση για τη βιολογία της νόσου αποτέλεσε η διάκρισή της σε 2 υποτύπους με σαφείς διαφορές μεταξύ τους ώστε τελικά να ορίζουν 2 διαφορετικές οντότητες.

Η διάκριση αυτή αφορά στην παρουσία ή μη των μεταλλάξεων στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης (IGHV), που αφορά στο τμήμα εκείνο του γονιδιώματος του λεμφοκυττάρου στο οποίο γίνεται η σύνθεση του ειδικού αντισώματος που έρχεται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο. Ο ανασυνδυασμός αυτός επιφέρει την παραγωγή μοναδικών αντισωμάτων, άρα και μοναδικών κλώνων ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων. Για να θεωρηθεί το γονίδιο μεταλλαγμένο πρέπει να διαφέρει σε ποσοστό > 2% στην αλληλουχία των βάσεων σε σχέση με το πρότυπο κύτταρο.

Είναι γνωστό ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο αυτών υποομάδων αφορούν τόσο στην προέλευση και παθογένεια του κυττάρου όσο και στη συμπεριφορά του (10),(11) όπως αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Υπότυποι στη ΧΛΛ βάσει βιολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών.
Από: Fabbri G, et al, The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group, 2016

Έτσι λοιπόν, τα κύτταρα στον υπότυπο με τις μεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή φαίνεται να έχουν προέλευση από τα Β-κύτταρα μετά το βλαστικό κέντρο που είναι CD5+CD27+, μοιάζουν με τα Β-κύτταρα μνήμης και μάλλον προέρχονται από τα CD5+, CD27- Β κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί στο βλαστικό κέντρο. Αντίστοιχα, στον υπότυπο της ΧΛΛ χωρίς παρουσία μετάλλαξης, τα παθολογικά κύτταρα προέρχονται από CD5+CD27- Β-κύτταρα πριν το βλαστικό κέντρο και μπορεί να

προέρχονται ή από «αθώα (naïve)» Β κύτταρα ή από κάποιο άλλο πρόδρομο κύτταρο διαφορετικής καταγωγής (8).

Τις περισσότερες φορές η ΧΛΛ έπεται μιας πρόδρομης ασυμπτωματικής κατάστασης γνωστής και ως **μονοκλωνική λεμφοκυττάρωση Β κυτταρικής αρχής (Monoclonal B-cell Lymphocytosis, MBL)**. Τα ΧΛΛ-ομοιάζοντα κύτταρα ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα των κατά τα άλλα υγιών ατόμων. Η κατάσταση αυτή εξελίσσεται σε ΧΛΛ με συχνότητα περίπου 1% ανά έτος, πιθανά ως αποτέλεσμα της προοδευτικής συσσώρευσης γενετικών βλαβών, επιγενετικών αλλαγών, περιβαλλοντικών επιδράσεων και ενεργοποίησης του υποδοχέα του Β κυττάρου (B Cell Receptor, BCR) (12).

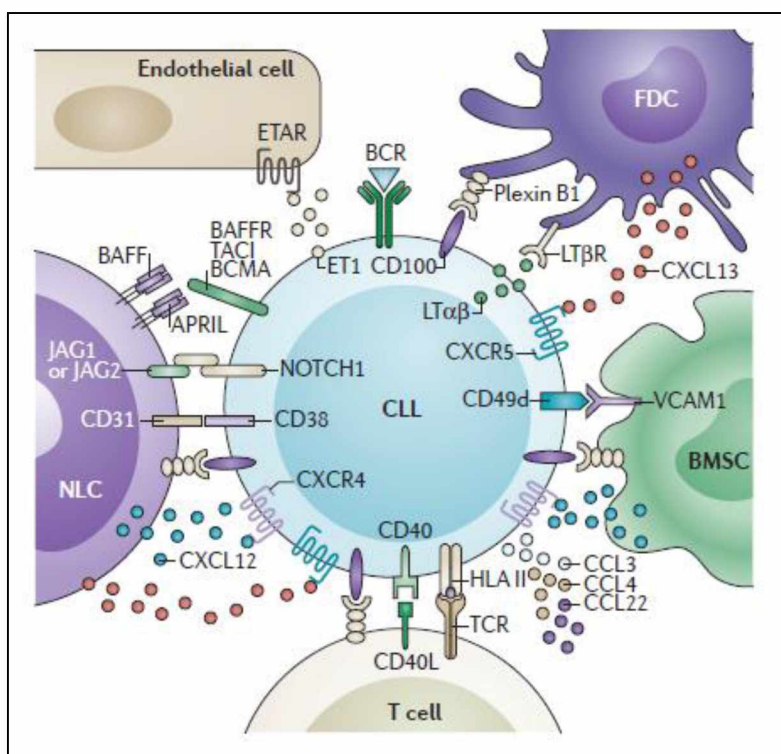
2.2.3 Το μικροπεριβάλλον στη ΧΛΛ

Η διαπίστωση ότι τα κύτταρα στη ΧΛΛ υπόκεινται σε αυτόματη απόπτωση όταν καλλιεργούνται *in vitro* σε συνδυασμό με την θεωρία ότι το αντιγονικό ερέθισμα έχει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, κατέδειξαν τη σημασία του μικροπεριβάλλοντος για την επιβίωση του παθολογικού κυττάρου στη ΧΛΛ *in vivo* (13).

Τα κύτταρα αυτά αλληλεπιδρούν με τα βοηθητικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος στα κέντρα πολλαπλασιασμού που υπάρχουν είτε στους λεμφαδένες είτε στο μυελό των οστών. Φαίνεται βέβαια ότι, τον πιο σημαντικό ρόλο για τον πολλαπλασιασμό των κλωνικών κυττάρων στη ΧΛΛ, διαδραματίζουν οι λεμφαδένες, καθώς σε αυτές τις θέσεις λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του NF-κB, και του BCR (14).

Τα κλωνικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς τρόπους με μη νεοπλασματικά κύτταρα στο περιβάλλον τους. Τέτοιου είδους κύτταρα αποτελούν τα κύτταρα στρώματος στο μυελό των οστών (bone marrow stroma cells, BMSCs), τα βοηθητικά κύτταρα προερχόμενα από τα μονοκύτταρα (monocyte-derived nurse like cells, NLCs), τα δενδριτικά κύτταρα (follicular dendritic cells, FDCs), τα ενδοθηλιακά και T κύτταρα (13) (**Εικόνα 7**). Τα BMSCs δημιουργούν νησίδες που προστατεύουν τα παθολογικά κύτταρα από την απόπτωση και τον φαρμακευτικά επαγόμενο κυτταρικό θάνατο.

Η αλληλεπίδραση των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων με τα BMSCs πραγματοποιείται μέσω του συμπλέγματος CD100-plexinB1, στη συνέχεια τα παθολογικά κύτταρα προσκολλώνται στα κύτταρα στρώματος μέσω σύνδεσης της πρωτεΐνης προσκόλλησης ενδοθηλιακού κυττάρου (VCAM1) στην CD94d ιντεγκρίνη και τελικά μέσω χημειοταξίας προς τα BMSCs μέσω του άξονα CXCR4-CXCL12 (8).



Εικόνα 7. Το μικροπεριβάλλον στη ΧΛΛ και οι αλληλεπιδράσεις με το παθολογικό κύτταρο. Από: Fabbri G, et al, The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group, 2016

Επιπλέον, τα κλωνικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα NLCs με ποικίλους τρόπους μεταξύ αυτών την έκκριση χημειοτακτικών παραγόντων όπως είναι οι CXCL12 και CXCL13, και την έκφραση μορίων που προστατεύουν τον παθολογικό κλώνο από απόπτωση (15),(16). Οι αλληλεπιδράσεις επιβίωσης περιλαμβάνουν την πρόσδεση παραγόντων πολλαπλασιασμού (APRIL ή TNF13), παραγόντων ενεργοποίησης του B κυττάρου (BAFF) στο σύμπλεγμα του διαμεμβρανικού ενεργοποιητή BCMA-TACI-BAFFR που εκφράζεται στα παθολογικά κύτταρα και μέσω του άξονα CD38-CD31, CD100-plexin B1 και του μονοπατιού NOTCH (17). Τα δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητη ασπίδα έναντι του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αλλά και για την μετανάστευση και

“εμφύτευση” (cell homing) των παθολογικών λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον, που επιτυγχάνεται και αυτό με τη σειρά του με ένα πλούσιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένους μηχανισμούς (CXCR5-CXCL13, lymphotoxin-α(LTa)-LTβR, CD100- plexin B1) (13).

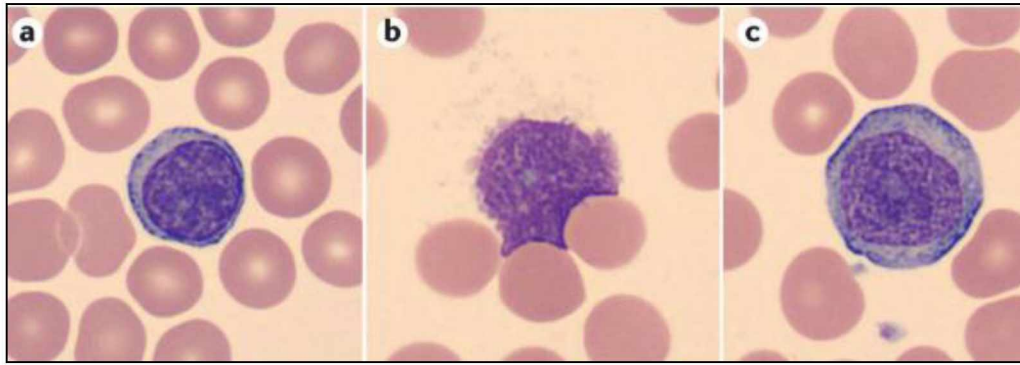
Επιπλέον, μέσω του άξονα ενδοθηλίνης 1- υποδοχέα ενδοθηλίνης (ET1-ETAR) παρέχεται πλεονέκτημα επιβίωσης στο κύτταρο της ΧΛΛ, αντίστασης στη θεραπεία και ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών πολλαπλασιασμού (8). Τα T κύτταρα, κυρίως τα CD4+, διηθούν τα βλαστικά κέντρα στους ασθενείς με ΧΛΛ. Τα παθολογικά κύτταρα εκθέτουν τα αντιγόνα στα βοηθητικά κύτταρα (TH) με τελική έκβαση τον πολλαπλασιασμό και την έκκριση αντισωμάτων.

Είναι λοιπόν σαφές ότι οι αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον σε κάποιο βαθμό επάγονται από τον παθολογικό κλώνο, αν και η γενετική βάση με την οποία τα κύτταρα στη ΧΛΛ επηρεάζουν το περιβάλλον ακόμη παραμένει αδιευκρίνιστη.

2.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

Για τη διάγνωση της νόσου απαιτούνται τα κάτωθι κριτήρια (18):

1. Παρουσία στο περιφερικό αίμα ≥ 5.000 μονοκλωνικά B λεμφοκύτταρα/ μl . Η κλωνικότητα αυτών των λεμφοκυττάρων πρέπει να επιβεβαιώνεται με κυτταρομετρία ροής. Η λεμφοκυττάρωση πρέπει να είναι παρούσα για > 3 μήνες.
2. Τα λευχαιμικά κύτταρα που ανευρίσκονται στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος μοιάζουν με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, είναι δηλαδή μικρά, ώριμα με συμπυκνωμένη χρωματίνη και αυξημένη αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, χωρίς διακριτά πυρήνια. Σπάνια διακρίνονται έγκλειστα στο κυτταρόπλασμα. Μεγαλύτερα κύτταρα με άτυπη μορφολογία ή προλεμφοκύτταρα εμφανίζονται σε ποσοστό μέχρι και 55%. Τέλος η ταυτόχρονη παρουσία πυρήνικών σκιών (smudge cells) στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος έχει κάποια διαγνωστική αξία (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Επίχρισμα περιφερικού αίματος (χρώση Wright-Giemsa) με ανάδειξη τυπικού Β κλωνικού κυττάρου (a), πυρηνικής σκιάς (smudge cell) (b), προλεμφοκυττάρου με εμφανές πυρήνιο (c).

Από: Thomas J. Kipps et.al, Chronic lymphocytic leukaemia, Nature Reviews Disease Primers, 2017

Ανοσοφαινοτυπικά, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν το αντιγόνο CD5 ταυτόχρονα με Β-δείκτες CD19, CD20, CD23. Οι δείκτες CD19 και CD20 είναι τυπικοί για τα Β-λεμφοκύτταρα, όχι όμως και ο CD5 όπως αναφέρεται στην ενότητα «παθολογικό Β κύτταρο». Ωστόσο τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας, του CD20 και CD79b, που αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος αντιγόνου-υποδοχέα στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων, είναι χαρακτηριστικά χαμηλά συγκριτικά με την έκφραση στα φυσιολογικά Β κύτταρα (**Εικόνα 9**). Ο CD23 είναι δείκτης ενεργοποίησης και με την πρωτεόλυση που υφίσταται εμφανίζεται τελικά με αυξημένα επίπεδα στον ορό, τα οποία είναι ενδεικτικά προόδου νόσου (18).

Δείκτης	Ένταση δείκτη	Score	Ένταση δείκτη	Score
Επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη	Ασθενής	1	Ισχυρή	0
CD5	+	1	-	0
CD23	+	1	-	0
CD22/CD79b	Ασθενής	1	Ισχυρή	0
FMC7	-	1	+	0

+: Παρών, -: Απών

Εικόνα 9. Διάγνωση- Σύστημα Βαθμολόγησης (scoring system)

Από: E. Tzoura, P. Roussou, B-chronic lymphocytic leukemia – latest developments, Archives of Hellenic Medicine, 2008

Η διάγνωση της ΧΛΛ τίθεται μετά από μικροσκοπική εξέταση αίματος και καθορισμό του ανοσοφαινότυπου. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει τον αποκλεισμό άλλων καλόηθων καταστάσεων που συνοδεύονται από αντιδραστική λεμφοκυττάρωση, όπως είναι οι λοιμώξεις αλλά και άλλων αιματολογικών κακοηθειών. Στην τελευταία περίπτωση, καθοριστικό ρόλο παίζει ο ανοσοφαινότυπος (Εικόνα 10).

Νόσος	smlg	CD5	CD23	CD79b	FMC7	Score
ΧΛΛ	Ασθενής	++	++	-	-/+	4-5
Β-ΠΛΛ	+++	-/+	++	++	+	0-1
Λευχαιμία τριχτών κυττάρων	+++	-	-	+	+++	0-1
Λέμφωμα από κύτταρα μανδύα	++	++	-	++	++	1-2
Οζώδες λέμφωμα	++	-/+	-/+	++	++	0-1
Λέμφωμα σπλήνα	++	-/+	+/-	++	++	0-1
Μακροσφαιριναιμία Waldenström	++	-	-	+	+	0

Εικόνα 10. Ανάλυση ανοσοφαινότυπου στη ΧΛΛ και σε άλλες διαταραχές Β-κυττάρων.

(Β-ΠΛΛ: Β προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, -: Απών, -/+ : Συνήθως απών, +/- : Συνήθως παρών, + έως +++ : Βαθμός έκφρασης, smlg: Επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη)
 Από: E. Tzoura, P. Roussou, B-chronic lymphocytic leukemia – latest developments, Archives of Hellenic Medicine, 2008

Σύμφωνα με την Παγκόσμια Ταξινόμηση της WHO (2), το μικρολεμφοκυτταρικό λέμφωμα (SLL, small lymphocytic lymphoma) και η ΧΛΛ αποτελούν την ίδια οντότητα. Η διάγνωση για το SLL απαιτεί την παρουσία λεμφαδενοπάθειας ή/και σπληνομεγαλίας με παρουσία στο περιφερικό αίμα Β λεμφοκυττάρων $< 5 \times 10^9/L$. Βέβαια τα κύτταρα αυτά έχουν τα ίδια ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αυτά της ΧΛΛ. Η διάγνωση απαιτεί βιοψία λεμφαδένα και ιστοπαθολογική τεκμηρίωση, όταν αυτό είναι εφικτό.

2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα συνήθη συμπτώματα της νόσου είναι (1) (19)

- Εύκολη κόπωση
- Αδυναμία
- Νυχτερινές εφιδρώσεις
- Πυρετός χωρίς στοιχεία λοίμωξης
- Απώλεια βάρους
- Μικροβιακές ή ιογενείς λοιμώξεις

Ωστόσο, η νόσος μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή η παρουσία συμπτωμάτων να διαφέρει από ασθενή σε ασθενή.

Από τη φυσική εξέταση, μπορεί να υπάρχει λεμφαδενοπάθεια σε μεμονωμένη περιοχή ή και σε περισσότερες θέσεις. Το μέγεθος ποικίλει από μικρό έως ογκώδη νόσο. Οι διογκωμένοι λεμφαδένες είναι ανώδυνοι στην ψηλάφηση, διακριτοί και ευκίνητοι. Επίσης, μπορεί να υπάρχει ηπατομεγαλία ή/και σπληνομεγαλία, ενώ τα παθολογικά λεμφοκύτταρα μπορεί να διηθούν πρακτικά οποιοδήποτε άλλο όργανο.

Σημαντική κλινική εκδήλωση της νόσου είναι η προσβολή από τυπικές βακτηριακές και ευκαιριακές λοιμώξεις, οι οποίες υποτροπιάζουν σε σημαντικό βαθμό. Τελικά, η σήψη αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου για το νόσημα αυτό. Καθοριστικό ρόλο για τις λοιμώξεις διαδραματίζει η ανοσοανεπάρκεια λόγω υπογαμμασφαιριναιμίας που χαρακτηρίζει το νόσημα αυτό, οι διαταραχές στη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων, του συμπληρώματος και των ουδετερόφιλων.

Επίσης, δεν λείπουν από τις κλινικές εκδηλώσεις συχνά οι αυτοάνοσες διαταραχές που αφορούν στο αιμοποιητικό σύστημα, η συχνότητα των οποίων είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία. Τα παραγόμενα αυτοαντισώματα στρέφονται ενάντια του DNA, των ιστονών, των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων.

Από τον εργαστηριακό έλεγχο προκύπτει απόλυτη λεμφοκυττάρωση με παρουσία ώριμων κυττάρων στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 5 έως $500 \times 10^9 /L$. Επίσης, ανευρίσκεται άμεση Coombs (+) αιμολυτική αναιμία (2% περίπου των ασθενών), ενώ σε ποσοστό 7-35% οι ασθενείς

αναπτύσσουν αυτού του είδους την αναιμία με την εξέλιξη της νόσου. Τα αντισώματα αυτά ως επί το πλείστο είναι IgG (90%), θερμά, πολυκλωνικά, παραγόμενα πιθανότατα από μη κακοήγη Β λεμφοκύτταρα.

Η αναιμία που εμφανίζεται στη ΧΛΛ σχετίζεται και με άλλους παθογενετικούς μηχανισμούς όπως την εκτεταμένη διήθηση του μυελού, τον υπερσπληνισμό, την έλλειψη σιδήρου και φυλλικού οξέος, την απλασία ης ερυθράς σειράς.

2.5 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

Η σταδιοποίηση του νοσήματος βασίζεται σε 2 συστήματα (20),(21):

1. ΣΥΣΤΗΜΑ RAI
2. ΣΥΣΤΗΜΑ BINET

2.5.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΤΑ RAI (20)

Περιλαμβάνει 5 στάδια

RAI 0 : Μεμονωμένη λεμφοκυττάρωση χωρίς λεμφαδενοπάθεια/ οργανομεγαλία.

RAI I: Λεμφοκυττάρωση με λεμφαδενοπάθεια.

RAI II: Λεμφοκυττάρωση με διόγκωση σπληνός ή ήπατος με ή χωρίς λεμφαδενοπάθεια

RAI III: Λεμφοκυττάρωση και αναιμία ($Hb < 11$) ± διόγκωση λεμφαδένων – σπληνός – ήπατος.

RAI IV: Λεμφοκυττάρωση και θρομβοπενία ($PLT < 100.000$) με ή χωρίς παρουσία αναιμίας – διόγκωσης λεμφαδένων – σπληνός – ήπατος.

Τα παραπάνω στάδια χωρίζονται σε χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου ως εξής:

ΣΤΑΔΙΟ 0 > χαμηλού κινδύνου

ΣΤΑΔΙΑ I και II > μέσου κινδύνου

ΣΤΑΔΙΑ III και IV > υψηλού κινδύνου

2.5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΤΑ BINET (21)

Περιλαμβάνει τα κάτωθι:

BINET A : Λιγότερες από 3 προσβεβλημένες λεμφαδενικές ομάδες-περιοχές.

BINET B : 3 ή περισσότερες προσβεβλημένες λεμφαδενικές ομάδες

BINET C : Αναιμία (Hb < 10) ή/ και θρομβοπενία (PLT < 100.000)

2.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΧΛΛ

Η μεγάλη κλινική ετερογένεια οδήγησε στην αναζήτηση βιολογικών δεικτών με προγνωστική αξία. Μελέτες κατέδειξαν ότι η ετερογένεια αυτή είναι συνυφασμένη με ετερογένεια σε γενετικό, βιολογικό και ανοσοφαινοτυπικό επίπεδο (22). Η καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου οδήγησε στην εισαγωγή μιας σειράς βιολογικών δεικτών, οι οποίοι επιτρέπουν να καθοριστεί με περισσότερη ακρίβεια η έκβαση των ασθενών (23)

2.6.1 Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες

Έκφραση του CD38: Πρόκειται για διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II. Αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα και συνήθως συνδυάζεται με μη μεταλλαγμένο τύπο ΧΛΛ και υψηλές τιμές ZAP-70.

Έκφραση της ZAP-70: Πρόκειται για πρωτεΐνη που είναι κινάση της τυροσίνης και κανονικά εκφράζεται στα T και NK λεμφοκύτταρα. Είναι ομόλογη της πρωτεΐνης Syk, η οποία ελέγχει τη μεταβίβαση του σήματος μέσω του BCR στα B λεμφοκύτταρα. Η έκφρασή της από τα παθολογικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση ενώ έχει συσχετιστεί και με το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGVH. Συγκεκριμένα, οι περιπτώσεις με μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGVH είναι τις περισσότερες φορές αρνητικές στη ZAP-70, ενώ οι περιπτώσεις με αμετάλλακτες αλληλουχίες είναι συχνά θετικές.

2.6.2 Κυτταρογενετικοί Δείκτες

Στη ΧΛΛ, χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανιχνεύονται σε ποσοστό 30-50% με κλασσικές κυτταρογενετικές μεθόδους και ως 80% με τη μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH). Από τις πιο συχνές είναι η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13 που θεωρείται δείκτης καλής πρόγνωσης και η τρισωμία του χρωμοσώματος 12 που σχετίζεται με ενδιάμεση πρόγνωση. Επιπλέον, ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23, όπου εντοπίζεται το γονίδιο ATM (ataxia telangiectasia mutated) και 17p (TP 53) καθορίζουν μια ομάδα ασθενών με ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρή επιβίωση. Εξίσου δυσμενής είναι η πρόγνωση για ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 χωρίς δομική ανωμαλία του χρωμοσώματος 17p(23).

2.6.3 Φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGVH

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο του παθολογικού κυττάρου, η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ορίζει δύο κατηγορίες με ή χωρίς μεταλλάξεις που παρουσιάζουν διαφορετική κλινική πορεία. Οι περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια IGVH των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μακρόχρονη επιβίωση σε σχέση με αυτές που δεν φέρουν σωματικές μεταλλάξεις(23).

2.6.4 Μοριακή στερεοτυπία του BCR

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν ταυτόσημους BCRs, φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως στερεοτυπία του BCR. Το ποσοστό της στερεοτυπίας ανέρχεται περίπου στο 30%. Το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει ότι στην οντογένεση της ΧΛΛ μάλλον υπάρχει κάποιος κοινός επίτοπος που ενοχοποιείται παρά ένα τυχαίο γεγονός. Τα υποσύνολα με στερεοτυπία μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και σχετίζονται με ιδιαίτερη πρόγνωση(23).

2.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία της ΧΛΛ καθορίζεται από το στάδιο και την ενεργότητα της νόσου. Έχει φανεί από μελέτες ότι η πρόωπη έναρξη χημειοθεραπείας σε ασθενείς που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο της νόσου δεν προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα στην επιβίωση, γι' αυτό και η συνήθης τακτική σε αυτούς τους ασθενείς είναι η παρακολούθηση (watch and wait) (24).

Για τη θεραπεία της νόσου απαιτείται χημειοθεραπεία με συνδυασμούς φαρμάκων τόσο σε περιπτώσεις ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΧΛΛ αλλά και σε εκείνους που υποτροπιάζουν ή έχουν ανθεκτική νόσο. Ο συνδυασμός του fludarabine σε συνδυασμό με έναν αλκυλιωτικό παράγοντα (cyclophosphamide) επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα στην ανταπόκριση και μεγαλύτερη επιβίωση (25).

Τα νεότερα φάρμακα επιτρέπουν την πιο στοχευμένη θεραπεία, καθώς απευθύνονται σε συγκεκριμένους στόχους στο παθολογικό κύτταρο. Τέτοια φάρμακα είναι το venetoclax (αναστολέας του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2) (26), το ibrutinib (αναστολέας του Bruton's tyrosine kinase)(27), το idelalisib (αναστολέας του ενζύμου phosphoinositide 3-kinase)(28), καθώς και νεότερα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-CD20 (obinutuzumab) (29).

Πρόσφατα ανακοινώθηκαν τα επικαιροποιημένα κριτήρια έναρξης θεραπείας στη ΧΛΛ και περιλαμβάνουν τα κάτωθι (24):

- ❖ Προοδευτική μυελική ανεπάρκεια, αιμοσφαιρίνη $<10\text{gr/dl}$ ή αιμοπετάλια $<100.000 \times 10^9/\text{L}$
- ❖ Ογκώδη ($\geq 6\text{cm}$ κάτω από το αριστερό πλευρικό τόξο) ή προοδευτική ή συμπτωματική σπληνομεγαλία
- ❖ Ογκώδη ($\geq 10\text{ cm}$ στη μέγιστη διάμετρο) ή προοδευτική ή συμπτωματική λεμφαδενοπάθεια
- ❖ Προοδευτική λεμφοκυττάρωση με αύξηση κατά $\geq 50\%$ σε διάστημα 2 μηνών ή διπλασιασμός στον αριθμό των λεμφοκυττάρων σε <6 μήνες
- ❖ Αυτοάνοσες εκδηλώσεις της νόσου που δεν ανταποκρίνονται στα κορτικοστεροειδή
- ❖ Συμπτωματική εξωλεμφαδενική συμμετοχή (δέρμα, νεφρός, πνεύμονας, σπονδυλική στήλη)
- ❖ Συμπτώματα σχετιζόμενα με τη νόσο
 - ✓ Απώλεια βάρους $\geq 10\%$ σε διάστημα 6 μηνών

- ✓ Σημαντική κόπωση
- ✓ Πυρετός ≥ 38 °C για 2 ή περισσότερες εβδομάδες χωρίς στοιχεία λοίμωξης
- ✓ Νυχτερινές επιδρώσεις για ≥ 1 μήνα χωρίς στοιχεία λοίμωξης

Για την έναρξη θεραπείας απαιτείται τουλάχιστον ένα από τα παραπάνω κριτήρια. Στους υπόλοιπους ασθενείς που δεν πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις, συστήνεται παρακολούθηση. Αναλυτικότερα, σε όλους τους ασθενείς πρέπει να γίνεται διαστρωμάτωση κινδύνου σύμφωνα με το διεθνές προγνωστικό σύστημα της ΧΛΛ (CLL-IPI) τη στιγμή της διάγνωσης (30). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει την αξιολόγηση των παραγόντων που φαίνονται στην **Εικόνα 11**.

Οι ασθενείς που ανήκουν στις ομάδες χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου πρέπει να παρακολουθούνται κάθε 6-12 μήνες. Οι ασθενείς που ανήκουν στις ομάδες υψηλού και πολύ υψηλού κινδύνου πρέπει να παρακολουθούνται πιο τακτικά, κάθε 3-6 μήνες. Βέβαια, ανεξάρτητα από την ομάδα κινδύνου στην οποία εντάσσεται ο ασθενής, πρέπει να παρακολουθείται και να λαμβάνει προφυλάξεις για τον κίνδυνο λοιμώξεων, πρέπει να εμβολιάζεται και πρέπει να ελέγχεται για τον κίνδυνο μη αιματολογικής κακοήθειας και δερματολογικής παθολογίας με ετήσιο έλεγχο από δερματολόγο.

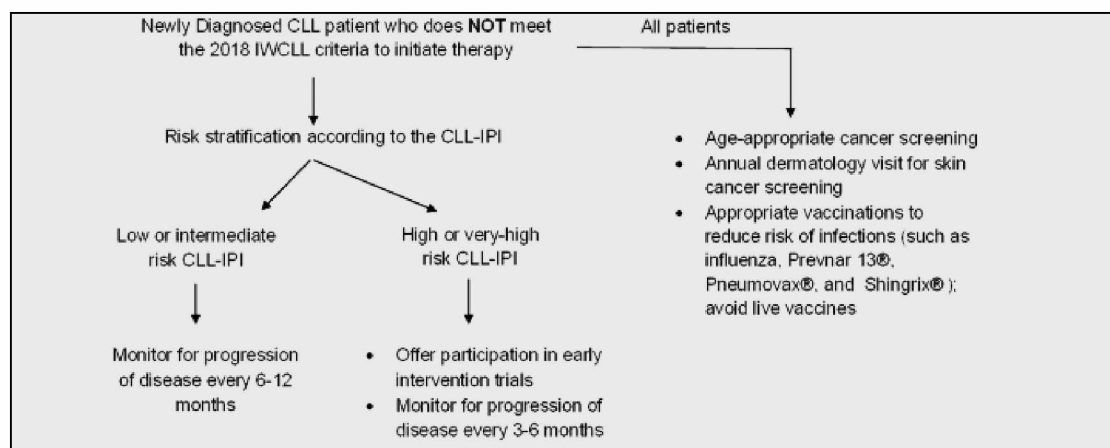
Prognostic factor	Points
Del17p on FISH or TP53 mutation	4
Unmutated IGHV genes	2
Serum $\beta 2$ microglobulin >3.5 mg/L	2
Rai stage I-IV	1
Age >65 years	1

Cumulative CLL-IPI score	Risk category	5-year TFS ^a
0-1	Low risk	78%
2-3	Intermediate risk	54%
4-6	High risk	32%
7-10	Very high risk	0%

Εικόνα 11. Το διεθνές προγνωστικό σύστημα στη ΧΛΛ (CLL-IPI) .

Από: Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm, Blood Cancer Journal. Nature Publishing Group, 2018

Στην **Εικόνα 12** περιγράφεται συνοπτικά ο αλγόριθμος παρακολούθησης των ασθενών με ΧΛΛ με έμφαση περισσότερο σε αυτούς που δεν χρήζουν άμεσης θεραπείας (31).



Εικόνα 12. Αλγόριθμος διαχείρισης ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα ΧΛΛ που δεν χρήζουν θεραπείας

Από: Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm, Blood Cancer Journal. Nature Publishing Group, 2018

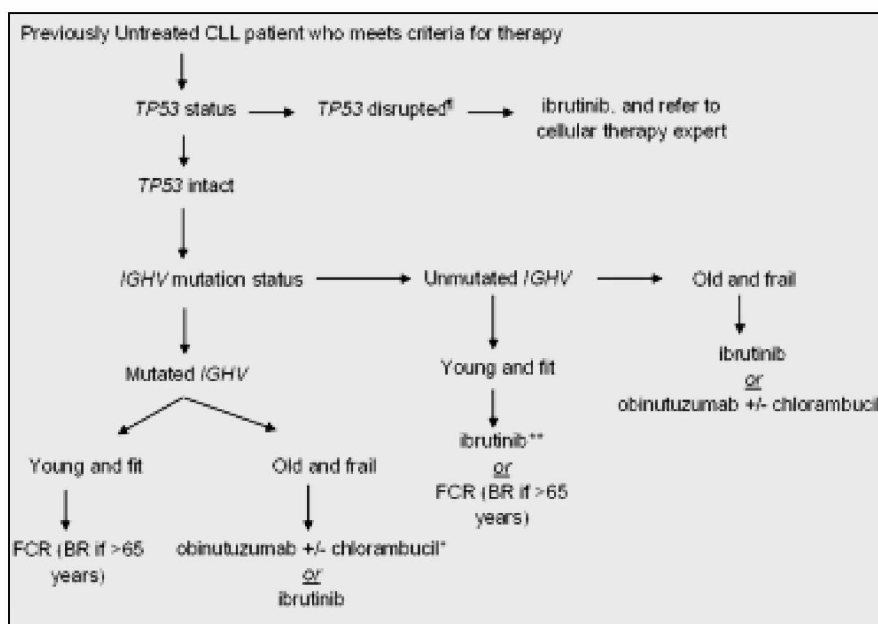
Η θεραπεία της ΧΛΛ έχει αλλάξει σημαντικά τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή αποτελεσματικών από του στόματος θεραπειών καθώς και της επόμενης γενιάς anti-CD20 μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι θεραπείες αυτές έχουν βελτιώσει την σημαντικά την έκβαση της νόσου, ακόμη και μεταξύ ασθενών με χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου όπως μετάλλαξη στην p53 ή απουσία μετάλλαξης στην υπερμεταβλητή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης.

Έτσι λοιπόν, με τα δεδομένα αυτά στην εικόνα 12 αποτυπώνεται η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών που χρήζουν θεραπείας για τη ΧΛΛ ανεξάρτητα από την ομάδα κινδύνου στην οποία βρίσκονται (31).

Αυτό που πρέπει σε πρώτη φάση να διερευνηθεί είναι αν υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με FISH και αναζήτηση του del17p13 είτε με αλληλούχιση νέας γενιάς (next generation sequencing) (31). Είναι σημαντικό αυτό να διευκρινιστεί εξαρχής πριν την θεραπευτική επιλογή, γιατί οι ασθενείς που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις έχουν χειρότερη πρόγνωση, μικρότερη συνολική επιβίωση (overall survival, OS) ενώ παρατηρείται εξέλιξη της νόσου σε πιο σύντομο χρόνο (Progression Free Survival, PFS) (31). Έτσι, σε αυτή την ομάδα ασθενών η κλασσική θεραπεία με Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab (FCR) ή Bendamustine-Rituximab (BR) δεν επιτυγχάνει ύφεση (32) (33), σε αντίθεση με το ibrutinib με το οποίο επιτυγχάνεται ανταπόκριση 97% (Overall Response Rate, ORR) και συνολική

επιβίωση εκτιμώμενη στα 2 χρόνια σε ποσοστό 84% (34). Δεδομένου λοιπόν των ποσοστών ανταπόκρισης, το ibrutinib αποτελεί θεραπεία εκλογής για την ομάδα αυτή των ασθενών.

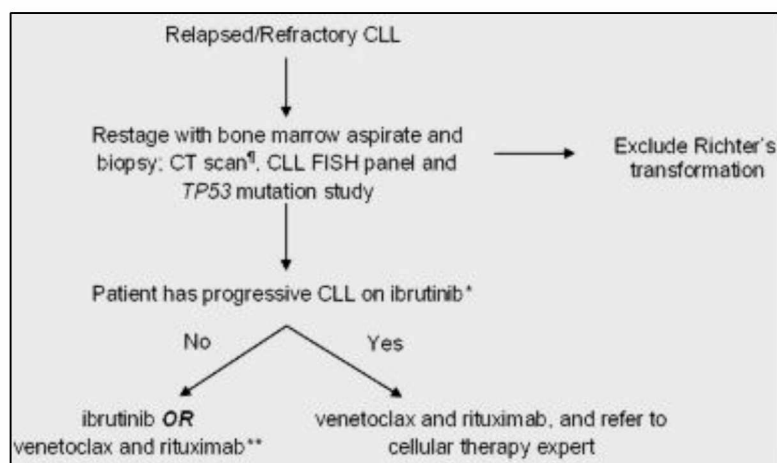
Η μελέτη των μεταλλάξεων στην IGHV είναι εξίσου σημαντική πριν την έναρξη της θεραπείας, καθώς οι ασθενείς με μεταλλαγμένη IGHV ανταποκρίνονται πολύ καλά στη θεραπεία με FCR. Η θεραπεία αυτή προτείνεται σε νέους ασθενείς (< 65 ετών) που είναι σε καλή γενική κατάσταση, γιατί μπορούν να ανεχτούν τις παρενέργειες της θεραπείας. Για τους πιο ηλικιωμένους ασθενείς με συνοσηρότητες, ενδεικνύομενη θεραπεία είναι ο συνδυασμός chlorambucil με obinutuzumab, με καλύτερα αποτελέσματα στην ORR και στο PFS σε σχέση με τον συνδυασμό chlorambucil- rituximab (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Θεραπευτικός αλγόριθμος στη ΧΛΛ

Από: Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm, Blood Cancer Journal. Nature Publishing Group, 2018

Για τους ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά την ύφεση πρέπει να επαναξιολογείται η νόσος με έλεγχο με αξονική τομογραφία, μυελόγραμμα και οστεομυελική βιοψία και επανάληψη των FISH για την μετάλλαξη της p53. Στην **Εικόνα 14** παρουσιάζεται ο θεραπευτικός αλγόριθμος των ασθενών που παρουσιάζουν υποτροπή ή ανθεκτική νόσο.



Εικόνα 14. Θεραπευτικός αλγόριθμος ασθενών με υποτροπιάζουσα/ανθεκτική ΧΛΛ
Από: Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm, Blood Cancer Journal. Nature Publishing Group, 2018.

Αν και οι θεραπευτικές επιλογές δεν επηρεάζονται σε αυτή τη φάση από την παρουσία ή όχι των μεταλλάξεων, δεδομένου ότι η θεραπεία δεύτερης γραμμής έχει καλά αποτελέσματα και σε αυτή την ομάδα κινδύνου, έχει προγνωστική αξία η γνώση αυτή. Η χημειο-ανοσοθεραπεία δεν έχει όσο θέση στην υποτροπή και προτιμάται μόνο λόγω σημαντικής συνοσηρότητας του ασθενούς ή υποτροπής μετά από μακροχρόνια ύφεση.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί τεράστια πρόοδος στη διαχείριση των ασθενών με ΧΛΛ. Με την κυκλοφορία των νέων φαρμάκων ο ρόλος της κλασσικής χημειο-ανοσοθεραπείας επανεξετάζεται με τα σύγχρονα δεδομένα. Βαθύτερος στόχος πια στον τομέα της ΧΛΛ αποτελεί η εφαρμογή μιας θεραπείας που θα προκύπτει από τον συνδυασμό των νέων φαρμάκων και θα επιτρέπει την επίτευξη μακράς ύφεσης με ταυτόχρονη όμως αποδέσμευση του ασθενούς από οποιαδήποτε μορφή θεραπείας.

2.8 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΧΛΛ

Η μέση συνολική επιβίωση για τους ασθενείς με ΧΛΛ είναι τα 7 έτη. Ωστόσο η διακύμανσή της μεταξύ των ασθενών ποικίλει σημαντικά. Τα υπάρχοντα προγνωστικά συστήματα που προαναφέρθηκαν (Rai, Binet) αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για την πρόγνωση. Έτσι, ασθενείς στα αρχικά στάδια (Rai O, Binet A) χαρακτηρίζονται από μέση επιβίωση περισσότερο από 10 χρόνια, αυτοί στα ενδιάμεσα στάδια (Rai I-II, Binet B) από 5-7 χρόνια ενώ για τους υψηλού κινδύνου

ασθενείς (Rai III-IV, Binet C) η μέση συνολική επιβίωση είναι λιγότερο από 3-4 χρόνια (1).

Υπάρχουν βέβαια και άλλοι προγνωστικοί δείκτες όπως τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, οι μεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης, η έκφραση του ZAP-70 και του CD38 καθώς και τα επίπεδα της β2 μικροσφαιρίνης. Επιπλέον, η ηλικία αποτελεί προγνωστικό δείκτη και μάλιστα στα πιο πρώιμα στάδια φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σημασία, αφού σε ποσοστό > 50% η αιτία θανάτου είναι άσχετη με τη ΧΛΛ και περισσότερο συναφής με τις λοιπές συν-νοσηρότητες λόγω ηλικίας.

Η ανταπόκριση στη θεραπεία αποτελεί επιπλέον δείκτη επιβίωσης, όπως άλλωστε και σε κάθε κακοήθεια. Οι πιο αξιόπιστοι δείκτες πρόγνωσης αφορούν κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά και ειδικότερα μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 και του ATM (del 17p και del 11q αντίστοιχα) (1). Οι ασθενείς αυτοί δεν ανταποκρίνονται στην κλασική θεραπεία και απαιτούν προσέγγιση με τις νεότερες θεραπευτικές στρατηγικές (βλ. θεραπεία ΧΛΛ).

Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 2) φαίνονται οι προγνωστικοί παράγοντες που έχουν σχέση με τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ.

Πίνακας 2. Κοινοί προγνωστικοί δείκτες στη ΧΛΛ
Από: <https://cllglobal.org/ell-information/prognostic-factors> (τελευταία πρόσβαση:

Prognostic Indicator	Indolent	Intermediate	Aggressive
Lymphocyte Doubling Time	More than 12 months		Less than 12 months
Rai Staging	Stage 0 and 1	Stage 2	Stage III and IV
Binet Staging	Stage A	Stage B	Stage C
IgVH	Mutated		Unmutated
B2M	Less than 2.0	Between 2 and 4	More than 4.0
FISH	13q deletion; normal karyotype	Trisomy 12	11q deletion; 17p deletion
ZAP70*	Less than 20%*		More than 20%*
CD38*	Less than 30%*		More than 30%*

*Results can be contradictory. Tests are not standardized. Patients will continue to be tested until the impact of both ZAP70 and CD38 are fully understood.

Chart adapted from the UK CLL Support Association.

2.9 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΧΛΛ

Οι ασθενείς με ΧΛΛ εμφανίζουν στην πορεία της νόσου κάποιες επιπλοκές. Αυτές αφορούν κυρίως τις αυτοάνοσες εκδηλώσεις και την υπογαμμασφαιριναιμία.

Μεταξύ των πιο συχνών αυτοάνοσων εκδηλώσεων παρατηρείται η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (autoimmune hemolytic anemia, ΑΙΗΑ), η αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα (immune thrombocytopenia, ΙΤΡ) και απλασία της ερυθράς σειράς (1).

Όσον αφορά την ΑΙΗΑ, ο έλεγχος της αιμόλυσης επιτυγχάνεται με τη χορήγηση κορτικοστεροειδών αλλά μακροπρόθεσμα ο στόχος παραμένει η αρνητικοποίηση της άμεσης Coombs οπότε χορηγούνται ανοσοκατασταλτικές θεραπείες όπως είναι η κυκλοφωσφαμίδη, η κυκλοσπορίνη κα. Η ΑΙΗΑ συχνά απαιτεί μακροχρόνια θεραπεία ή/και σπληνεκτομή. Βέβαια, η επίτευξη ύφεσης της νόσου σίγουρα ελέγχει καλύτερα και την αυτοάνοση εκδήλωση και αποτρέπει την επανεμφάνισή της.

Η ΙΤΡ, αν και λιγότερη συχνά ως επιπλοκή, απαιτεί θεραπεία όπως και η ΑΙΗΑ. Οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν χορήγηση κορτικοστεροειδών, ανοσοσφαιρίνης και ενδεχομένως και σπληνεκτομή, ειδικότερα όταν η εκδήλωση αυτή δεν μπορεί να ελεγχθεί με τις υπόλοιπες θεραπείες.

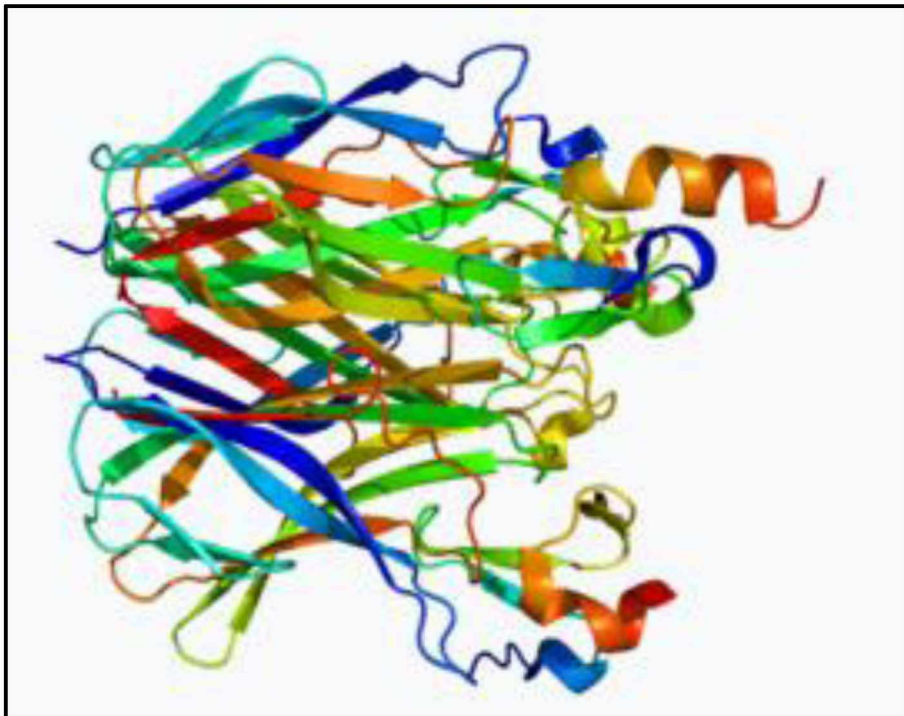
Τέλος, η απλασία της ερυθράς σειράς αποτελεί σπανιότερη αλλά καλά αναγνωρισμένη επιπλοκή. Σε κάποιες περιπτώσεις σχετίζεται με λοίμωξη από τον παρβοϊό 19, ενώ σε άλλες απαιτεί θεραπεία ανοσοκαταστολής με κυκλοσπορίνη με ή χωρίς κορτικοστεροειδή.

Η υπογαμμασφαιριναιμία αποτελεί κανόνα για τα πιο προχωρημένα στάδια στη ΧΛΛ και είναι υπεύθυνη για την αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων ειδικότερα του ανώτερου αναπνευστικού. Μικρά μονοκλωνικά κλάσματα ανοσοσφαιρίνης, ειδικότερα IgM κάνουν την εμφάνισή τους σε ποσοστό μικρότερο από 10%. Η εμφάνιση ενός τέτοιου κλάσματος κατά την πρόοδο της νόσου ή ανίχνευση ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης στα ούρα (Bence Jones πρωτεϊνουρία) μπορεί να υποδηλώνει τη μετατροπή του νοσήματος σε πιο επιθετικά λεμφώματα (1).

2.10 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΛΛ

Η ΧΛΛ μπορεί να εξελιχτεί σε πιο επιθετικά λεμφώματα, ανοσοβλαστικό ή λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (Richter's transformation). Η μετατροπή αυτή μπορεί να συμβαίνει σε έναν ή περισσότερους λεμφαδένες, οι οποίοι εμφανίζουν χαρακτήρα διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL). Το σύνδρομο Richter χαρακτηρίζεται από υψηλή LDH, απότομη λεμφαδενική διόγκωση και συστηματικά συμπτώματα (πυρετό και απώλεια βάρους). Εμφανίζεται σε περίπου 7% των ασθενών με ΧΛΛ και σχετίζεται με την παρουσία μονοκλωνικής παραπρωτεϊναιμίας ή ελεύθερων ελαφρών αλύσων στα ούρα. Σε σπανιότερες περιπτώσεις, η μετατροπή της νόσου γίνεται προς την κατεύθυνση του λεμφώματος Hodgkin. Σε κάθε περίπτωση, τόσο η ανοσοκαταστολή, η λεμφοπενία των CD4 αλλά και η εμπλοκή του ιού Epstein Barr αποτελούν πιθανούς παθογενετικούς μηχανισμούς για την εμφάνιση του συνδρόμου Richter (1).

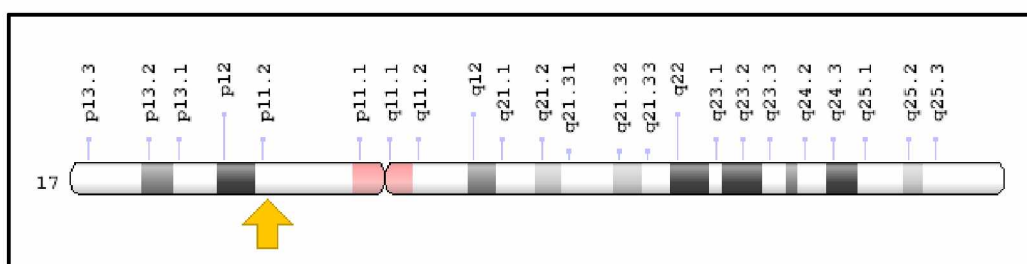
Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ TACI



en.wikipedia.org

3. ΠΡΩΤΕΙΝΗ TACI

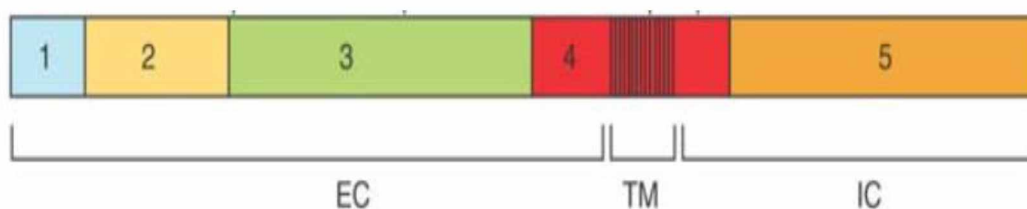
Η πρωτεΐνη TACI (Transmembrane Activator and CALM Interactor), γνωστή και ως μέλος 13B της υπερ-οικογένειας του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (Tumor Necrosis Factor SuperFamily μέλος 13B, TNFRSF13B) είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF13B, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και πιο συγκεκριμένα στο βραχύ σκέλος του στη θέση 11.2, και φέρει 5 εξόνια (35) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Η θέση κωδικοποίησης της πρωτεΐνης TACI στο χρωμόσωμα 17 .

Από: Koos JA et al, Genetics Home Reference: A Review. Med Ref Serv Q. 2018

Σχετικά με τα εξόνια της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 16, τα 4 πρώτα (1 έως και 4) εδράζονται στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και μόνο τα 5^ο βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της.



Εικόνα 16. Τα εξόνια του TACI ([researchgate.net](https://www.researchgate.net))

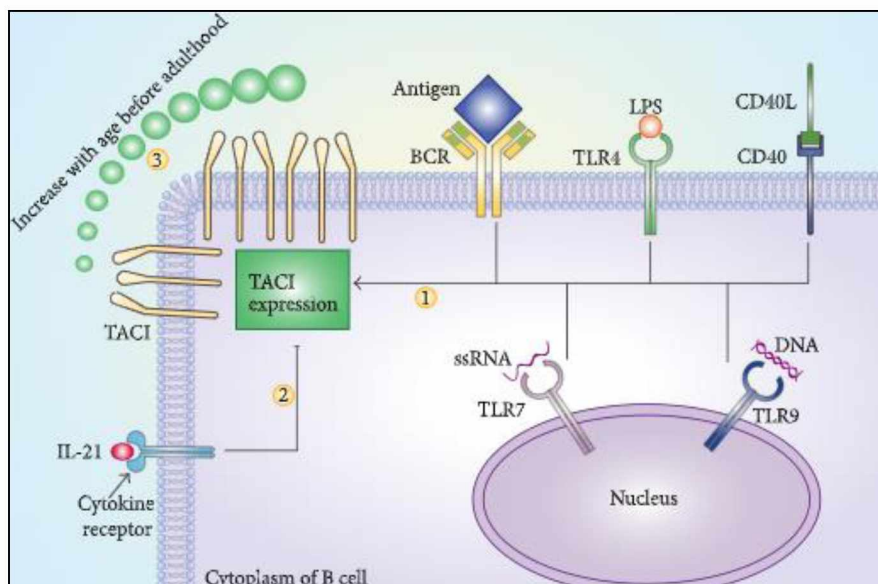
EC=extracellular domain, TM=transmembrane domain, IC=intracellular domain

Η πρωτεΐνη αυτή ανευρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια των B κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και συνδέεται με 3 βασικά μόρια, τον παράγοντα APRIL, BAFF και CALM. Μέσω των αλληλεπιδράσεων αυτών η πρωτεΐνη TACI διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια, στην επιβίωση των B-λεμφοκυττάρων αλλά και στην ωρίμανση και παραγωγή αντισωμάτων (36),(37).

3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TACI

Η πρωτεΐνη TACI εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων και ειδικότερα στην επιφάνεια των CD27⁺ λεμφοκυττάρων (κύτταρα μνήμης), των πλασματοκυττάρων της αμυγδαλής και του μυελού των οστών, από ένα ποσοστό ενεργοποιημένων CD27⁻ λεμφοκυττάρων που δεν προέρχονται από το βλαστικό κέντρο (non GC), από τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και ένα ποσοστό «αθών» (naïve) λεμφοκυττάρων (38). Επιπλέον, η πρωτεΐνη TACI εκφράζεται και από τα μακροφάγα ευοδώνοντας την επιβίωσή τους (39).

Η έκφραση του παράγοντα TACI καθορίζεται από πολλούς παράγοντες και συνεχώς επιδρά ανασταλτικά στις δυναμικές αλλαγές του κυττάρου (Εικόνα 17)(36) (33).



Εικόνα 17. Τα επίπεδα ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης TACI

Από: Zhang Y et al, Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases, Journal of Immunology Research. Hindawi Limited 2015

Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του παράγοντα TLR9, TLR7 ή του TLR4 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του TACI από τα Β λεμφοκύτταρα (40),(41),(42). Το ίδιο συμβαίνει και με το μόριο CD40L (CD40 ligand), το οποίο είναι επίσης ικανό να ευοδώσει την αυξημένη έκφραση του TACI στα Β κύτταρα, ενώ

αντίθετα η ιντερλευκίνη 21 (IL-21) καταστέλλει την έκφρασή του στα κύτταρα του βλαστικού κέντρου (GC)(36) .

Επιπλέον, η έκφραση του TACI είναι μειωμένη σε επίμυες με φυλοσύνδετη ανοσοανεπάρκεια (X-linked immunodeficiency, XID), γεγονός που μάλλον σχετίζεται με την επηρεασμένη σηματοδότηση του υποδοχέα του B κυττάρου (B cell receptor BCR), η οποία οφείλεται σε βλάβη της τυροσινικής κινάσης Bruton (Btk) (43). Αυτό τελικά αποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του BCR σχετίζεται τελικά με τη ρύθμιση της έκφρασης του TACI.

Η έκφραση του TACI σχετίζεται και με την ηλικία και πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι το ποσοστό της έκφρασης του TACI από τα B κύτταρα αυξάνει με την ηλικία μέχρι την εφηβεία (44). Στα πρόωρα νεογνά, η έκφραση είναι μειωμένη, στα τελειόμηνα τα ποσοστά είναι σε χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα την έλλειψη πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν IgA (45),(46). Γι' αυτό και τα νεογέννητα είναι ευάλωτα σε συγκεκριμένα εντεροβακτηρίδια (46). Τελικά, η αύξηση στην έκφραση του TACI πριν την ενηλικίωση μπορεί απλώς να υποδηλώνει την εδραίωση των B κυττάρων οριακής ζώνης.

Μπορεί η πρωτεΐνη TACI να βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, ένα μικρό ποσοστό όμως είναι διαλυτό (sTACI) μετά από τη μετατροπή του μέσω μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης (ADAM 10). Η διαλυτή μορφή TACI εμφανίζεται αυξημένη σε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ), Χρόνια Λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) και Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (CVID) (36).

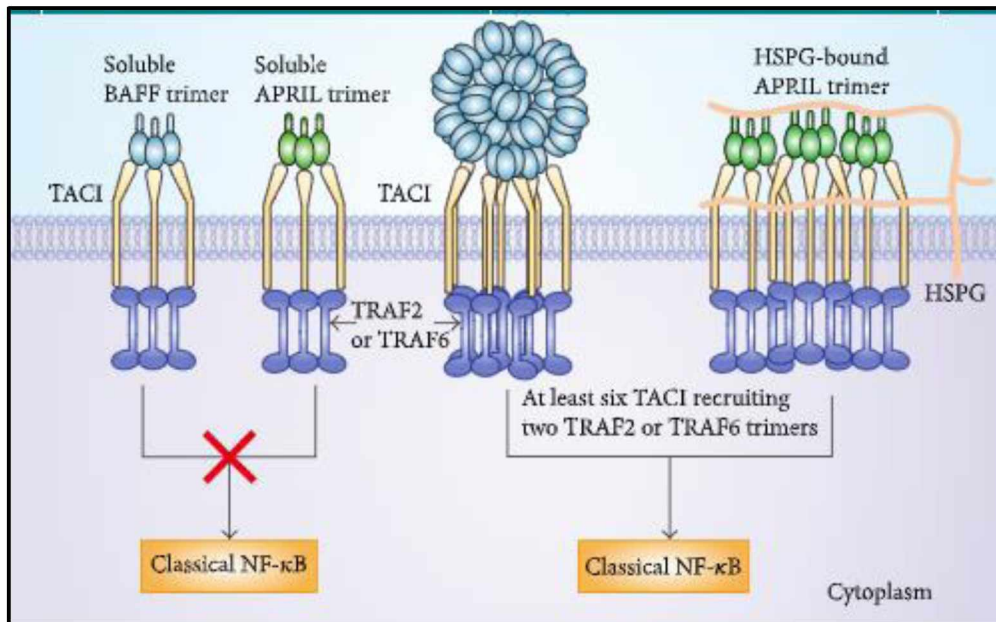
3.2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TACI

Τα μόρια BAFF και APRIL αποτελούν δύο βασικούς συνδέτες ενεργοποίησης της πρωτεΐνης TACI. Η πρωτεΐνη BAFF είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II. Ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF συνδέσμων. Προέρχεται κυρίως από κύτταρα της μυελικής σειράς όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα (36). Η BAFF υπάρχει σε δύο μορφές, μία διαλυτή και μία προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη. Η δεύτερη αποσχίζεται σε μια θέση πρωτεάσης, απελευθερώνοντας τη διαλυτή μορφή. Η τελευταία υπάρχει κυρίως σε ομοτριμερή μορφή.

Η πρωτεΐνη APRIL είναι επίσης μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον παράγοντα BAFF. Παράγεται από κύτταρα της μυελικής σειράς.

Παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλα κύτταρα μη αιμοποιητικά που παράγουν το μόριο αυτό. (36). Η APRIL διαφέρει από την BAFF, αφού η πρώτη δεν ανιχνεύεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Η επεξεργασία του μορίου ξεκινά στη συσκευή Golgi με απόσχιση του μορίου σε θέση πρωτεάσης και τελική μορφή το διαλυτό μόριο, το οποίο απελευθερώνεται από το κύτταρο. Όπως και το διαλυτό BAFF, έτσι και η διαλυτή μορφή του APRIL, ανιχνεύεται σε ομοτριμερή μορφή. Τα τριμερή όμως αυτά δεν μπορούν να σχηματίσουν μεγαλύτερα μόρια (60-μερή). Μπορούν όμως να προσδένονται σε πρωτεογλυκάνες (heparan-sulfate-proteoglycans, HSPGs) με τελικό στόχο την ενίσχυση της τοπικής σηματοδότησης του APRIL(47). Επιπλέον, οι πρωτεογλυκάνες αυτές παρέχουν το υπόστρωμα για τον πολυμερισμό των μορίων APRIL, ο οποίος και συμβαίνει (48). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο APRIL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του αριθμού των B1 B λεμφοκυττάρων με την πρόσδεσή τους στις HSPGs παρά στο TACI (49). Βέβαια ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

Παρά τις τριμερείς μορφές αυτών των συνδέσμων και την ικανότητα πρόσδεσής τους στο TACI, το τελευταίο δεν ενεργοποιείται (50) (**Εικόνα 18**). Αυτό μάλλον συμβαίνει επειδή η ενεργοποίηση αυτή απαιτεί πρώτα την πρόσδεσή του στον παράγοντα που συνδέεται με τον υποδοχέα του TNF (tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF) 2 ή 6. Ο TRAF υπάρχει με την μορφή τριμερούς. Ένα μεμονωμένο τριμερές TRAF έχει χαμηλή δυναμική σύνδεσης με τον TACI. Για να ενεργοποιηθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB, δύο τριμερή TRAF πρέπει να συνδεθούν με τουλάχιστον 6 μόρια TACI (**Εικόνα 18**) (51),(52). Με τον τρόπο αυτό, τόσο τα 60μερή BAFF όσο και τα πολυμερή APRIL μπορούν τελικά να ενεργοποιήσουν τον TACI(36).



Εικόνα 18. Οι προσδέτες που ενεργοποιούν το μόριο TACI .

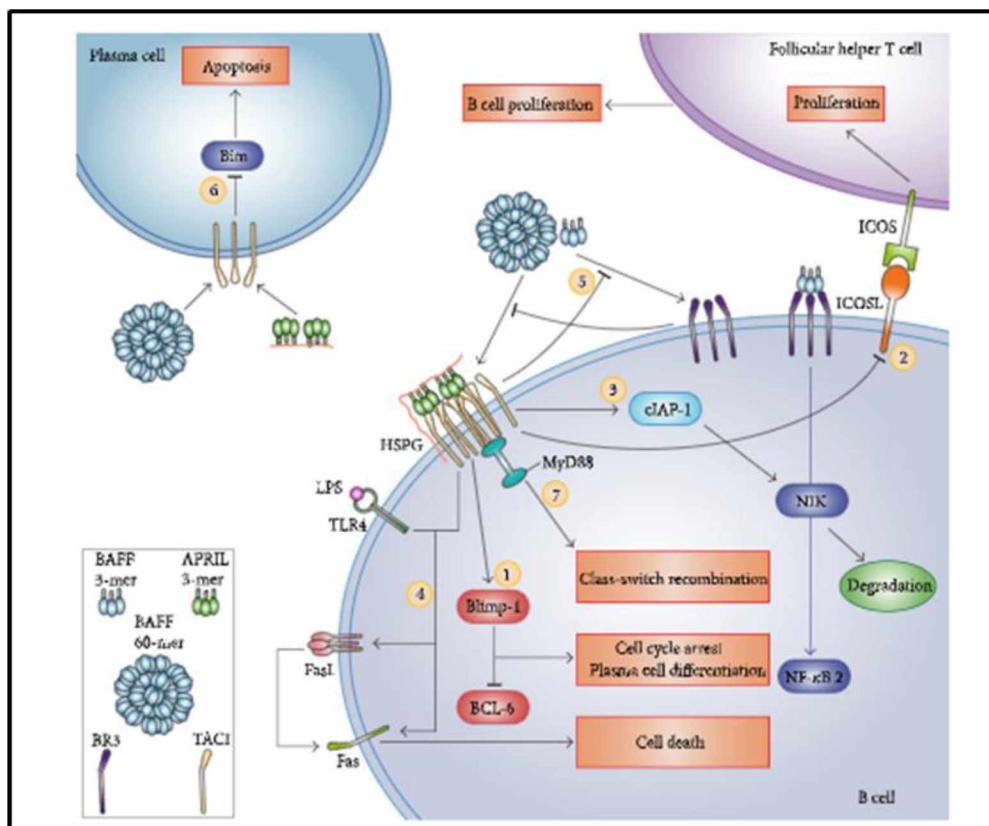
Από: Zhang Y et al, Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases, Journal of Immunology Research. Hindawi Limited 2015

Η πρωτεΐνη TACI ρυθμίζει τον αριθμό των κυκλοφορούντων B λεμφοκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται:

- ❖ με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων προάγοντας και συντηρώντας την έκφραση του παράγοντα Blimp-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1). Ο παράγοντας αυτός είναι ένας μεταγραφικός αναστολέας, ικανός να επάγει την αδρανοποίηση του κυτταρικού κύκλου στα B κύτταρα και να ευοδώνει τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα. Εν μέρει ο ρόλος του Blimp-1 επιτυγχάνεται με την καταστολή του παράγοντα BCL-6 (B cell lymphoma 6) (53).
- ❖ Επιπλέον, μελέτες καταδεικνύουν ότι ο TACI αναστέλλει τις δραστηριότητες στο βλαστικό κέντρο (germinal center, GC) και τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων μέσω καταστολής της έκφρασης του ICOSL στα B κύτταρα του βλαστικού κέντρου (54).
- ❖ Αποτελεί κύριο ρυθμιστή σε συνδυασμό με τον TLR4 της έκφρασης του Fas και FasL για τον θάνατο των B κυττάρων οριακής ζώνης (MZ, marginal zone) μέσω του μηχανισμού AICD (activation induced cell death) (36)
- ❖ Η ανασταλτική δράση του TACI στα B κύτταρα επιτυγχάνεται και μέσω της προαγωγής της απόπτωσής τους (**Εικόνα 19**) και της ρύθμισης της έκφρασης

του cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein) στα GC B κύτταρα. Η πρωτεΐνη cIAP στοχεύει την κινάση του NF-κB (NIK) με στόχο την αποσύνθεσή της μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κB (55).

- ❖ Τέλος, ο TACI δρα ανασταλτικά ανταγωνίζοντας τον BR3 (BlyS Receptor 3) για την έκφραση του BAFF(36) .



Εικόνα 19. Ο παράγοντας TACI και οι δράσεις του .

Από: Zhang Y et al, Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases, Journal of Immunology Research. Hindawi Limited 2015

Ο παράγοντας TACI φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην ισotypική μεταστροφή του αντισώματος (antibody class switching recombination, CSR) μέσω της αλληλεπίδρασής του με τους προσδέτες BAFF και APRIL ανεξάρτητα από τη δράση του CD40 (36). Η μεταστροφή σε IgA φαίνεται να εξαρτάται αποκλειστικά από το TACI, καθώς ποντίκια ανεπαρκή σε TACI και APRIL έχουν μειωμένα επίπεδα IgA στον ορό (56). Ο TACI όπως έχει φανεί συμμετέχει τόσο με T-εξαρτώμενο όσο και T-μη εξαρτώμενο CSR μέσω πρόσδεσης στο MyD88. Συγκεκριμένα, ο TACI προσδένεται στο MyD88 μέσω της περιοχής THC (TACI highly

conserved), οπότε και ενεργοποιεί το κλασσικό μονοπάτι του NF-κB ευοδώνοντας την μεταγραφή γονιδίων και την έκφραση του AID (activation induced cytidine deaminase) (57). Συνεπώς, μεταλλάξεις που αφορούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί το THC καταργούν τη συνέργεια μεταξύ του TACI και του CD40 αλλά και μεταξύ του TACI με τα TLRs (Toll Like Receptors), που επάγουν την CSR (58).

Ο παράγοντας TACI τέλος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην αντισωματική απάντηση έναντι των TI-2 (T independent) αντιγόνων. Για την απάντηση σε αυτά τα ερεθίσματα μεσολαβούν τα MZ και B1 B κύτταρα, στα οποία παρατηρείται υψηλή έκφραση TACI (41),(59). Επίσης, η αντισωματική απάντηση στα T1-1 αντιγόνα απαιτεί εξίσου την παρουσία TACI.

Επιπλέον, ο TACI συμμετέχει και στην απάντηση σε TD (T dependent) αντιγόνα. Μελέτες αναφέρουν ότι ο TACI είτε ευοδώνει την πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση και παραγωγή αντισώματος μέσω CD40 καταδεικνύοντας τη συμμετοχή του στην ανοσολογική απάντηση στα TD αντιγόνα (60) είτε ότι ο TACI αναστέλλει την CD40 και BR3 επαγόμενη παραγωγή αντισώματος υποστηρίζοντας την ανασταλτική του δράση σε αυτού του είδους την ανοσολογική απάντηση (54).

Σε κάθε περίπτωση, οι μελέτες υποστηρίζουν την ρύθμιση από το TACI του αριθμού των πλασματοκυττάρων και της παραγωγής αντισώματος τουλάχιστον με 2 διαφορετικούς μηχανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, ο TACI επάγει την διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα διατηρώντας τη συνεχή έκφραση του Blimp-1. Επιπλέον, ο TACI αναστέλλει την απόπτωση των πλασματοκυττάρων με καταστολή της έκφρασης του BIM (B cell lymphoma 2 interacting mediator) στα πλασματοκύτταρα (**Εικόνα 19**).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Δεδομένης της έλλειψης ερευνών σε σχέση με την παρουσία ή όχι μεταλλάξεων που αφορούν το γονίδιο της πρωτεΐνης TACI σε ασθενείς με ΧΛΛ και με τη γνώση ότι τα μέλη της οικογένειας του TNF συνεισφέρουν σημαντικά στην επιβίωση των κακόηθων λεμφοκυττάρων, άρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για την εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση μεταλλάξεων που αφορούν στο γονίδιο TNFRSF13B, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI, και ειδικότερα στα εξόνια 3 και 4 σε Έλληνες ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.

Προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας σχετικά με το γονίδιο σε ασθενείς που πάσχουν από Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια κατέδειξε μεταλλάξεις στα εξόνια 3 και 4 που κωδικοποιούν το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης TACI.

Με αφορμή λοιπόν αυτά τα αποτελέσματα η επιστημονική μας σκέψη προσανατολίστηκε στα συγκεκριμένα εξόνια και έτσι καθορίστηκε το ερευνητικό μας πλάνο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Πενήντα ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Όλοι οι ασθενείς διαγνώστηκαν με ΧΛΛ, σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO 2016 (1), ενώ τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό της έρευνας αποτελούν αρχειακό υλικό της Αιματολογικής κλινικής και του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ).

Η μελέτη διενεργήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της Συνθήκης του Ελσίνκι και έλαβε έγκριση από το αντίστοιχο τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν γνώση για την επεξεργασία των δειγμάτων και συναίνεσαν ενυπόγραφα.

Από τους 50 ασθενείς, οι 30 ήταν άνδρες (60%) και οι 20 γυναίκες (40%). Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 70 έτη (διακύμανση 40-80), ενώ οι 24 (48%) ασθενείς βρίσκονται σε παρακολούθηση χωρίς να έχουν λάβει μέχρι στιγμής κάποια θεραπεία. Οι υπόλοιποι 26 (52%) έχουν λάβει τουλάχιστον μία γραμμή θεραπείας. Επιπλέον, όσον αφορά στο μοριακό προφίλ της νόσου, αποτέλεσμα για την p53 υπήρχε σε 31 ασθενείς από τους οποίους οι 4 (13%) έφεραν τη μετάλλαξη και οι 24 όχι. Όσον αφορά στη μετάλλαξη της IGHV, τα δεδομένα αφορούσαν σε λιγότερους ασθενείς

Για όλους τους ασθενείς εκτός από έναν, οι αναλύσεις έλαβαν χώρα σε δείγμα από περιφερικό αίμα ενώ σε έναν μόνο σε δείγμα μυελού των οστών.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ να πάει πάνω από τον πίνακα

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	Del 17p (FISH)	IgHV mutation	Θεραπεία
1	64	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
2	73	A	ΝΑΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
3	36	Θ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
4	75	A	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
5	53	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Παρακολούθηση
6	68	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
7	65	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
8	71	A	ΝΑΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
9	55	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
10	79	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
11	67	A	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
12	71	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
13	84	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
14	83	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
15	81	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
16	54	Θ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
17	78	Θ	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
18	76	Θ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
19	49	Θ	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
20	77	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
21	90	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
22	60	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
23	88	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
24	81	Θ	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
25	76	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
26	65	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
27	64	Θ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
28	75	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
29	84	Θ	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
30	68	A	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Παρακολούθηση
31	59	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
32	65	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
33	74	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
34	80	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
35	32	Θ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	Παρακολούθηση
36	75	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
37	79	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
38	75	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
39	72	A	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
40	71	Θ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Παρακολούθηση
41	61	Θ	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
42	75	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
43	74	A	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
44	77	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
45	77	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
46	71	Θ	ΟΧΙ	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
47	65	A	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
48	80	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	ΝΑΙ
49	82	A	Δεν διατίθεται	Δεν διατίθεται	Παρακολούθηση
50	73	A	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή μελέτη του γονιδίου TNFRSF13B/TAC1 ήταν περιφερικό αίμα ή δείγμα μυελού των οστών. Στα δείγματα των ασθενών πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση DNA, έπειτα ενίσχυση των εξονίων 3 και 4 του γονιδίου TNFRSF13B/TAC1 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% και τέλος ανάλυση αλληλουχίας βάσεων sequencing.

3.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν ειδικά kit εμπορίου όπως το PureLink® Genomic DNA Kit και το Extract Me Genomic DNA 250preps (Invitrogen & blirt). Η διαδικασία απομόνωσης έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή και περιγράφεται παρακάτω:

1. Σε ένα Eppendorf tube (1,5 ml) προσθέτω 200μl περιφερικό αίμα και 1 ml RBCs lysis buffer (λυτικό-δικής μας κατασκευής). Επωάζω για 5 λεπτά μέχρι να προκύψει ένα διαυγές διάλυμα.
2. Φυγοκεντρώ για 4 λεπτά στις 8600 g. Πετάω το υπερκείμενο.
3. Επαναδιαλύω το ίζημα σε 375 μl GL Buffer και κάνω vortex για 20 δευτερόλεπτα.
4. Προσθέτω 10 μl Proteinase K (αποθηκεύεται στους -20° C) και κάνω ένα σύντομο vortex.
5. Επωάζω στους 55° C για 30 λεπτά.
6. Προσθέτω 4 μl RNAase A και επωάζω στους 37° C για 10 λεπτά.
7. Προσθέτω 400 μl GB Buffer και αναμειγνύω καλά για 10 δευτερόλεπτα.
8. Φυγοκεντρώ για 2 λεπτά στις 13000g για να απομακρύνω τα κυτταρικά παραπροϊόντα.
9. Μεταφέρω το υπερκείμενο σε μία στήλη Απομόνωσης DNA.
10. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13000g.
11. Μεταφέρω την στήλη σε νέο collection tube (2ml)
12. Προσθέτω 600 μl GW1 Buffer και φυγοκεντρώ για 30 δευτερόλεπτα στις 13000g. Πετάω το διήθημα και χρησιμοποιώ το ίδιο collection tube.

13. Προσθέτω 500 µl GW2 Buffer και φυγοκεντρώ για 30 δευτερόλεπτα στις 13000g.
14. Πετάω το διήθημα και χρησιμοποιώ το ίδιο collection tube.
15. Φυγοκεντρώ για 2 λεπτά στις 16000g για να απομακρύνω την αιθανόλη (στέγνωμα).
16. Πετάω το collection tube μαζί με το διήθημα και μεταφέρω προσεκτικά την στήλη σε καινούριο Eppendorf tube (1,5ml).
17. Προσθέτω 100 µl Elution Buffer, το οποίο έχουμε ζεστάνει προηγουμένως στους 70° C , απευθείας στη στήλη. Επωάζω για 5 λεπτά.
18. Φυγοκεντρώ για 1 λεπτό στα 13000g.
19. Πετάω την στήλη.
20. Αποθηκεύω το DNA στους -20° C.

3.2 PCR για το γονίδιο TNFRSF13B/TACI

Για τη μελέτη του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν από το εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη βοήθεια του προγράμματος Oligo-6 software (NBI, Plymouth, MN, USA), για τη συγκεκριμένη έρευνα ενισχύθηκαν 2 από τα 5 εξόνια του γονιδίου TNFRSF13B/TACI, και αυτά είναι το εξόνιο 3 (635bp) και το εξόνιο 4 (540bp). Στον **Πίνακα 4** μπορούμε να δούμε τους πρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές, το μήκος των εκκινητών, το μέγεθος του PCR προϊόντος καθώς και τις συνθήκες της PCR αντίδρασης για κάθε εξόνιο.

Πίνακας 4 : Εκκινητές TNFRSF13B/TACI

Εξόνιο	εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Μήκος (bp)	Μήκος(bp) PCR προϊόντος
3	Πρόσθιος Εκκινητής (F)	5' - ATCAAAATgCAATgCAGCTAAA - 3'	22 bp	635 bp
	Οπίσθιος Εκκινητής (R)	5' - AgACTTCTggAAATgTTgCCTA - 3'	22 bp	
4	Πρόσθιος Εκκινητής (F)	5' - gggggAgTggATCAAC - 3'	16 bp	540 bp
	Οπίσθιος Εκκινητής (R)	5' - gTCTgCCAggATgTCTTAACC - 3'	21 bp	

Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Veriti 96 well Thermal cycler AB Applied Biosystems.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Σε κάθε δείγμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο σαν μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank) , με αυτό τον τρόπο ελέγχθηκε η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 5**) βλέπουμε τις συνθήκες της PCR αντίδρασης για κάθε εξόνιο.

Πίνακας 5 : Οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 2 εξονίων του TNFRSF13B/TAC1

Στάδιο		Εξόνιο	
		3	4
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 2 min	94° C 2 min
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 30 sec	94° C 30 sec
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία Διάρκεια	62° C 30 sec	62° C 30 sec
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 30 sec	72° C 30 sec
Τελική Επέκταση (Final extension)	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 5 min	72° C 5 min
Κύκλοι		31	36

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

3.3 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

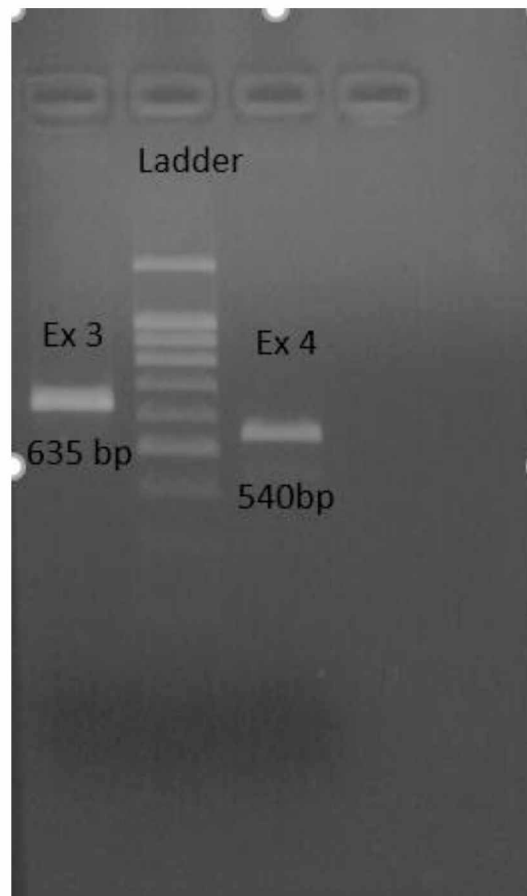
Μετά την PCR αντίδραση, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% [2 γραμμάρια αγαρόζης (w/v) σε 100 ml ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE] για να ελέγξουμε το μέγεθος και την καθαρότητα των προϊόντων της PCR καθώς η ύπαρξη και μόνο μιας ζώνης δεν είναι απόδειξη του ειδικού προϊόντος αφού μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων.

Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 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.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μ L δείγματος, 1 μ L

χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και ηλεκτροφορεύεται στα 120 V και 400 mA για 30 min.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση εξονίων του TAC1.

3.4 Αλληλούχιση των Προϊόντων της PCR

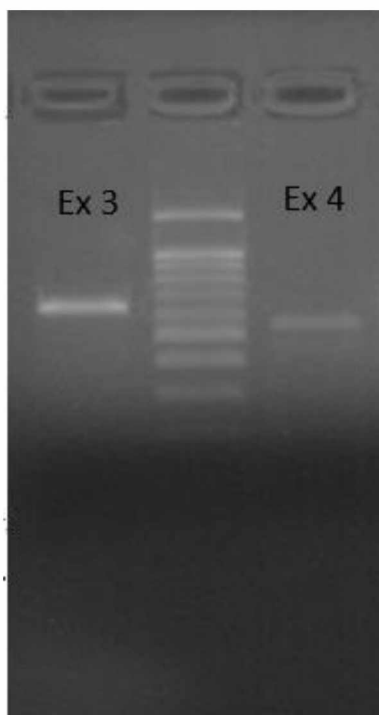
3.4.1 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Για να καταστεί δυνατή η διαδικασία της αλληλούχισης, τα προϊόντα της PCR πρέπει να καθαριστούν από τους εκκινητές, τα νουκλεοτίδια, τα ένζυμα και τα άλατα. Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση των Extract ME DNA Clean-up kit της Blirt DNA GDANSK και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/ Invitrogen).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο διπλάσιο από αυτόν του προϊόντος
2. Μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit)
3. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης
4. Πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer)
5. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
6. Πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer) για δεύτερη φορά
7. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
8. Ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (11.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη.
9. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.

Τα καθαρισμένα προϊόντα ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 30 μ L και κατόπιν ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε παραπάνω, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητάς τους. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20° C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων PCR προϊόντων του γονιδίου TAC1.

3.4.2 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Η αλληλούχιση (sequencing) των ειδικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο SANGER. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχίστηκαν με χρήση του αναλυτή ABI Prism BigDye (v1.1) και αναλύθηκαν με το ABI 3100 Sequencer. Οι εκκινητές της αλληλούχισης απεικονίζονται στον **Πίνακα 6**. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου συγκρίθηκε με την αλληλουχία [ENST00000261652.6](#) (από την βάση ensemble) για το γονίδιο TNFRSF13B/TAC1. Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SNAP GENE VIEWER.

Πίνακας 6 : Εκκινητές Αλληλούχισης του TAC1

Εξόνιο	Εκκινητής
3	5'- AGACTTCTGGAAATGTTGCCTA – 3'
4	5'- GTCAGAAAGGAGCCCAGCC– 3'

3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Η στατιστική δοκιμασία χ^2 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της συχνότητας των πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν στο υπο-μελέτη δείγμα με τη συχνότητα των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στον γενικό πληθυσμό. Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο επίπεδο $p < 0.05$. Η συχνότητα του κάθε αλληλόμορφου στον γενικό πληθυσμό αναζητήθηκε στην ηλεκτρονική βάση 1000genomes που αποτελεί τμήμα του IGSR (The International Genome Sample Resource)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πενήντα ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, οι οποίοι διαγνώστηκαν με ΧΛΛ, σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO 2016 (2). Το υλικό τους (περιφερικό αίμα ή δείγμα μυελού των οστών) ελέγχθηκε για παρουσία μεταλλάξεων που αφορούν στο γονίδιο TNFRSF13B, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TACI, και ειδικότερα στα εξόνια 3 και 4.

Στα δείγματα των ασθενών πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση DNA, έπειτα ενίσχυση των εξονίων 3 και 4 του γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράης PCR, ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% και τέλος ανάλυση αλληλουχίας βάσεων sequencing.

Πρόκειται για μια έρευνα που μελετά τις μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό και αφορά τον Ελληνικό πληθυσμό. Αφορμή για αυτή τη μελέτη στάθηκε η γνώση ότι η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου TNFRSF13B σχετίζεται με την Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια και μάλιστα οι παραλλαγές αυτές είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη είτε σε διπλά ετερόζυγη κατάσταση επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (61). Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις όπως η rs 34557412 (C104R) παρεμποδίζει την πρόσδεση του συνδέτη, υποδηλώνοντας βλάβη του υποδοχέα και ενδεχόμενη μειωμένη λειτουργικότητα (62)

Έτσι, ο στόχος πρωτίστως ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων και αν αυτές μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της ΧΛΛ. Ωστόσο, καμία μετάλλαξη δεν αναδείχθηκε

από την παρούσα έρευνα που να αφορά στα εξόνια 3 και 4 του υπό εξέταση γονιδίου. Ανιχνεύθηκαν μόνο κάποιοι πολυμορφισμοί, ο g.28376A>C, c.445+25A>C, rs2274893 intron variant (30 ασθενείς στους 50 που μελετήθηκαν) ενώ ο g.28197 T>G c.291T>G, P97P rs 35062843 ανιχνεύθηκε σε τρεις ασθενείς στους 50 που μελετήθηκαν. Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμασίας χ^2 δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των δύο αλληλόμορφων μεταξύ του πληθυσμού της μελέτης και του γενικού πληθυσμού ($p>0.05$). Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία που βρίσκονται καταχωρημένα σε διεθνείς βάσεις γονιδιώματος, ο πολυμορφισμός g.28376A>C, c.445+25A>C, rs2274893 απαντάται στο παγκόσμιο πληθυσμό σε συχνότητα 0.406 (2035 στους 5008) (στοιχεία από τη βάση 1000 Genomes), ενώ ο πολυμορφισμός g.28197 T>G c.291T>G, P97P rs 35062843, σύμφωνα πάντα με την ίδια βάση και στον ίδιο πληθυσμό, απαντάται σε συχνότητα 0.049 (243 στους 5008).

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου έχουν καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία και απεικονίζονται στην **Εικόνα 22**. Μεταξύ αυτών, συμμετέχουν και αυτοί που αναγνωρίστηκαν και στα υπό εξέταση δείγματα της παρούσας μελέτης.

Πρόκειται για πολυμορφισμούς όμως οι οποίοι ανιχνεύονται τόσο στον υγιή πληθυσμό όσο και σε νοσήματα όπως οι ανοσοανεπάρκειες και οι αυτοάνοσες παθήσεις, χωρίς σαφή αιτιοπαθογενετική συσχέτιση (63).

Nucleotide position ^a	Intronic/mRNA position	Protein residue ^b	Standard nomenclature ^b	SNP id ^c	SNP alleles ^d
22	22	Gly/Gly	G3G		C/G
84	20+10				C/T
85	20+11				G/A
90	20+14				C/T
19 525	94	Thr/Thr	T27T	rs8072293	G/A
19 566	135	Asp/Gly	D41G		A/G
19 588	157	Met/Ile	M48I		G/C
23 036	67-70				C/T
23 043	67-63				G/C
23 099	67-7				C/G
23 110	204		204insA		InsA
23 166	273	Ile/Asn	I87N		T/A
23 197	304	Pro/Pro	P97P	rs35062843	T/G
23 216	323	Cys/Arg	C104R	rs34755412	T/C
23 217	324	Cys/Tyr	C104Y		G/A
23 264	358 359		358 359delA		delA
23 376	149+25			rs2274892	A/C
23 382	149+31			rs55955502	T/A
31 492	150-86				G/A
31 518	150-60				G/T
31 538	150-49			rs56223325	C/T
31 674	555	Ala/Glu	A181E		C/A
31 695	576	Lys/Met	K188M		A/T
31 711	592	Cys/stop	C193X		C/A
31 726	606	Arg/Arg	R198R		G/A
31 757	638	Ser/Pro	S209P		T/C
31 759	640	Ser/Ser	S209S		C/T
31 819	210+55				C/T
32 153	211-139			rs11652843	T/G
32 208	211-84				G/C
32 232	211-60			rs11652811	T/C
32 319	672	Val/Ala	V220A	rs56063729	T/C
32 412	765	Pro/Leu	P251 L	rs34562254	C/T
32 436	789	Trp > stop	W259X		G/A
32 491	844	Ser/Ser	S275S	rs11078355	T/C

Εικόνα 22. Το γονίδιο TNFRSF13B και οι πολυμορφισμοί του.

Από: Sazzini M, et al. An evolutionary approach to the medical implications of the tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B (TNFRSF13B) gene. *Genes Immun*, 2009

Η ΧΛΑ είναι μια χρόνια και ετερογενής νόσος. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα μέλη της οικογένειας του TNF ενδέχεται να συνεισφέρουν στην ενισχυμένη δυνατότητα επιβίωσης του παθολογικού λεμφοκυττάρου. Ειδικότερα, τα νεοπλασματικά Β κύτταρα εκφράζουν σε ποικίλο βαθμό τους παράγοντες BAFF, τον υποδοχέα του (BAFF-R) και τον παράγοντα TACI, αν και η συσχέτιση του τελευταίου με την παθοφυσιολογία της νόσου δεν είναι ξεκάθαρη. Μια τέτοια αποσαφήνιση βέβαια παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς έχουν προταθεί νεότερες θεραπείες με αντι-BAFF/APRIL παράγοντες για τους ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα επαγόμενα από Β κύτταρα υποδηλώνοντας ότι ο TACI μπορεί να αποτελέσει στόχο θεραπευτικό και για τις αιματολογικές κακοήθειες Β κυτταρικής αρχής (64), (65). Ειδικότερα, υπάρχουν μελέτες φάσης 1, τα αποτελέσματα των οποίων αναμένονται με ενδιαφέρον που εξετάζουν τη δράση παραγόντων (atacicept) με στόχο την εξουδετέρωση-δέσμευση πρωτεϊνών που ευοδώνουν την επιβίωση του κακοήθους κλώνου παρά την απευθείας δράση τους στο παθολογικό κύτταρο (66).

Σε μια μελέτη του εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας από τους Mamara και συν. μελετήθηκαν 94 ασθενείς με διάγνωση ΧΛΛ ως προς την έκφραση του παράγοντα TACI (67). Η έρευνα απέδειξε ότι τα παθολογικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ποικίλη έκφραση του παράγοντα TACI (η πλειοψηφία παρουσιάζει χαμηλή έκφραση), χωρίς όμως να υπάρχει σαφής προγνωστική σημαντικότητα της έκφρασης του TACI, αν και φάνηκε να προσδίδει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στον παθολογικό κλώνο in vitro. Μια άλλη μεγάλη μελέτη από τον Bojarska-Junak και συν. , η οποία περιελάμβανε 62 ασθενείς, ανέδειξε αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης αλλά κατέδειξαν κάποια προγνωστική αξία της έκφρασης του TACI αφού συσχετίστηκαν τόσο με τα επίπεδα του CD38 και του ZAP-70 (60),(68).

Άλλες μελέτες παρατήρησαν αρκετά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του TACI, ωστόσο το δείγμα ήταν αρκετά μικρό, από 9 έως 23 ασθενείς (69) (70) (71).

Συνολικά, αν και η έκφραση του TACI μεταξύ των ασθενών με ΧΛΛ ποικίλει σημαντικά με εξατομικευμένο χαρακτήρα στα επίπεδα έκφρασής του, μάλλον παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα μεταξύ των ασθενών. Επιπλέον, τα νεοπλασματικά κύτταρα που τελικά εκφράζουν τον TACI χαρακτηρίζονται από καλύτερη επιβίωση in vitro υποδηλώνοντας ότι οι ασθενείς, οι παθολογικοί κλώνοι των οποίων τον εκφράζουν, είναι ενδεχομένως επιλέξιμοι για νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις (67).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A.V Hoffbrand, Catovsky D, Gd Tuddenham E, Green AR. Postgraduate Haematology, Sixth edition. Chapter 29 , page 533.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Vol. 127, Blood. American Society of Hematology; 2016. p. 2375–90.
3. Rodrigues CA, Gonçalves MV, Ikoma MRV, Lorand-Metze I, Pereira AD, Farias DLC de, et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. Rev Bras Hematol Hemoter. 2016 Oct 1;38(4):346–57.
4. Chronic Lymphocytic Leukemia - Cancer Stat Facts [Internet]. [cited 2020 Jan 9]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>
5. Slager SL, Kay NE. Familial chronic lymphocytic leukemia: what does it mean to me? Vol. 9 Suppl 3, Clinical lymphoma & myeloma. 2009.
6. Rai KR, Sawitsky A, Jagathambal K, Gartenhaus W, Phillips E. Chronic lymphocytic leukemia. Med Clin North Am. 1984;68(3):697–711.
7. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. Vol. 131, Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013. p. 959–71.
8. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. Vol. 16, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2016. p. 145–62.
9. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancer Cell. 2011 Aug 16;20(2):246–59.
10. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999 Sep 15;94(6):1840–7.

11. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848–54.
12. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis, natural history, and risk stratification. Vol. 126, *Blood*. American Society of Hematology; 2015. p. 454–62.
13. ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.; 2016. p. 401–13.
14. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563–74.
15. Burger JA. The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:25–45.
16. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. Vol. 2011, *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2011. p. 96–103.
17. Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M, et al. Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(5):1060–70.
18. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep 1;26:vi50–4.
19. Hallek M, Eichhorst B, Catovsky D, editors. *Chronic Lymphocytic Leukemia* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2020 Jan 11]. (Hematologic Malignancies). Available from:

- <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-11392-6>
20. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234. *Blood*. 2016 Oct 27;128(17):2109–2109.
 21. Binet JL, Lepage M, Dighiero G, Charron D, Vaugier G, Beral HM, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer*. 1977;40(2):855–64.
 22. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Vol. 352, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2005 [cited 2020 Feb 13]. p. 804–15. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra041720>
 23. Editor G. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ HELLENIC SOCIETY OF HAEMATOLOGY ΤΟΜΟΣ 4-ΤΕΥΧΟΣ 2 ΑΠΡΙΛΙΟΣ-ΙΟΥΝΙΟΣ 2013 Αίμα 4 (2) Χρόνιες Β λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις Χρόνιες Β λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις Κώστας Σταματόπουλος. [cited 2020 Feb 13];133–41. Available from: <http://www.vitacongress.gr>
 24. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018 Jun 21;131(25):2745–60.
 25. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4079–88.
 26. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 28;374(4):311–22.
 27. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32–42.

28. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997–1007.
29. Al-Sawaf O, Fischer K, Engelke A, Pflug N, Hallek M, Goede V. Obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia: Design, development and place in therapy. Vol. 11, *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 295–304.
30. CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016 Jun 1;17(6):779–90.
31. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. Vol. 8, *Blood Cancer Journal*. Nature Publishing Group; 2018.
32. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul 1;17(7):928–42.
33. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010 Oct 2;376(9747):1164–74.
34. Farooqui MZH, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015 Feb 1;16(2):169–76.
35. Koos JA, Bassett A. Genetics Home Reference: A Review. *Med Ref Serv Q*. 2018 Jul 3;37(3):292–9.
36. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. Vol. 2015, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2015.

37. Von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* (80-). 1997 Oct 3;278(5335):138–41.
38. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Jun;19(3–4):263–76.
39. Sook KC, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BLyS in the activation of innate immune cells. *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2687–94.
40. Martínez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Feb;131(2):468–76.
41. Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt S V., Sweet MJ, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1959–71.
42. Trembl LS, Carlesso G, Hoek KL, Stadanlick JE, Kambayashi T, Bram RJ, et al. TLR Stimulation Modifies BLyS Receptor Expression in Follicular and Marginal Zone B Cells. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7531–9.
43. Uslu K, Coleman AS, Allman WR, Katsenelson N, Bram RJ, Alugupalli KR, et al. Impaired B Cell Receptor Signaling Is Responsible for Reduced TACI Expression and Function in X-Linked Immunodeficient Mice. *J Immunol.* 2014 Apr 15;192(8):3582–95.
44. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, Leuvenink J, van Hout RWNM, van der Burg M, et al. Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children. *Scand J Immunol.* 2011 Nov;74(5):502–10.
45. Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood.* 2007 Oct 15;110(8):2948–54.

46. Gustafson CE, Higbee D, Yeckes AR, Wilson CC, De Zoeten EF, Jedlicka P, et al. Limited expression of APRIL and its receptors prior to intestinal IgA plasma cell development during human infancy. *Mucosal Immunol.* 2014;7(3):467–77.
47. Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1375–83.
48. Kimberley FC, Van Bostelen L, Cameron K, Hardenberg G, Marquart JA, Hahne M, et al. The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. *FASEB J.* 2009 May;23(5):1584–95.
49. Sindhava VJ, Scholz JL, Stohl W, Cancro MP. APRIL mediates peritoneal B-1 cell homeostasis. *Immunol Lett.* 2014;160(2):120–7.
50. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood.* 2008;111(3):1004–12.
51. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: Oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* 1999 May 15;13(10):1297–308.
52. Ye H, Wu H. Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):8961–6.
53. Tsuji S, Cortesão C, Bram RJ, Platt JL, Cascalho M. TACI deficiency impairs sustained Blimp-1 expression in B cells decreasing long-lived plasma cells in the bone marrow. *Blood.* 2011 Nov 24;118(22):5832–9.
54. Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):110–8.

55. Kanno Y, Sakurai D, Hase H, Kojima H, Kobata T. TACI induces cIAP1-mediated ubiquitination of NIK by TRAF2 and TANK to limit non-canonical NF- κ B signaling. *J Recept Signal Transduct*. 2010 Apr;30(2):121–32.
56. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Mar 16 [cited 2020 Feb 13];101(11):3903–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307348101>
57. He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):836–45.
58. Almejun MB, Cols M, Zelazko M, Oleastro M, Cerutti A, Opezzo P, et al. Naturally occurring mutation affecting the MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class switch recombination. *Eur J Immunol*. 2013 Mar;43(3):805–14.
59. Figgett WA, Fairfax K, Vincent FB, LePage MA, Katik I, Deliyanti D, et al. The TACI receptor regulates T-cell-independent marginal zone B cell responses through innate activation-induced cell death. *Immunity*. 2013 Sep 19;39(3):573–83.
60. Castigli E, Wilson SA, Elkhal A, Ozcan E, Garibyan L, Geha RS. Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;120(4):885–91.
61. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest*. 2007 Jun 1;117(6):1550–7.
62. Lee JJ, Jabara HH, Garibyan L, Rauter I, Sannikova T, Dillon SR, et al. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6).

63. Sazzini M, Zuntini R, Farjadian S, Quinti I, Ricci G, Romeo G, et al. An evolutionary approach to the medical implications of the tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B (TNFRSF13B) gene. *Genes Immun.* 2009;10(6):566–78.
64. Kim SS, Kirou KA, Erkan D. Belimumab in systemic lupus erythematosus: An update for clinicians. Vol. 3, *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2012. p. 11–23.
65. Fairfax K, MacKay IR, MacKay F. BAFF/BLyS inhibitors: A new prospect for treatment of systemic lupus erythematosus. Vol. 64, *IUBMB Life*. 2012. p. 595–602.
66. Kofler DM, Gawlik BB, Elter T, Gianella-Borradori A, Wendtner CM, Hallek M. Phase 1b trial of atacicept, a recombinant protein binding BLyS and APRIL, in patients with chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Vol. 26, *Leukemia*. 2012 [cited 2020 Feb 13]. p. 841–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu2011286>
67. Mamara A, Germenis AE, Kompoti M, Palassopoulou M, Mandala E, Banti A, et al. TACI expression and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol Res.* 2015;2015.
68. Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M, Surdacka A, Kusz ML, Wąsik-Szczepanek E, et al. The role of TACI expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cent J Immunol.* 2011;36(1):46–50.
69. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: A mechanism for survival. *Blood.* 2002 Oct 15;100(8):2973–9.
70. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):679–88.
71. Endo T, Nishio M, Enzler T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):703–

10.