



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αντιγονικής ειδικότητας των κλωνοτυπικών
ανοσοσφαιρινών από ασθενείς με Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης**

-

**Study of antigenic specificity of clonotypic immunoglobulins from
patients with Splenic Marginal Zone Lymphoma**

Χατζηνικολάου Μαρία-Παρασκευή

A.M.: 1815102

Επιβλέπων καθηγητής: Κώστας Σταματόπουλος M.D., PhD



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κώστας Σταματόπουλος (επιβλέπων)

M.D., PhD, Διευθυντής του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, ΕΚΕΤΑ

Αντώνιος Γιακουντής

Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	9
1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	10
1.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	11
2. ΑΝΤΙΓΟΝΑ.....	12
3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	13
3.1 ΔΟΜΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	13
3.2 ΤΥΠΟΙ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	15
3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	15
3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	17
3.4.1 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	18
3.4.2 ΣΥΝΔΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	19
3.4.3 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ.....	20
3.4.4 ΕΝΑΛΛΑΓΗ ΙΣΟΤΥΠΟΥ.....	21
4. Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
4.1 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	21
4.2 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	23
4.2.1 ΛΕΜΦΟΖΙΔΙΑΚΑ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	24
4.2.2 Β-1 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	25
4.2.3 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΛΗΝΟΣ.....	25
5. ΣΠΛΗΝΙΚΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ (ΣΛΟΖ).....	26
5.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	26
5.1.1 ΚΛΙΝΙΚΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	27
5.1.2 ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΛΟΖ.....	29

5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ(A).....	30
6. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	31
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (mAbs).....	33
1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ.....	33
1.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ PCR.....	35
1.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	38
1.4 ΠΕΨΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	38
1.5 ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ DNA ΛΙΓΑΣΗ.....	39
1.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.....	39
1.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ.....	41
1.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ.....	43
1.9 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ.....	43
2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	44
2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK293T.....	44
2.2 ΚΡΥΟΔΥΑΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK293T.....	45
2.3 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK293T ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (mAbs).....	46
2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (mAbs).....	47
2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	47
2.6 ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΥΠΟΥ Western Blot ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	48
3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ mAbs ΜΕ ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA.....	50
3.1 IN-HOUSE ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ELISA.....	50
3.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ELISA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ kit.....	52
4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	53

4.1	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HS-5.....	53
4.2	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	53
5.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	54
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
1.	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	55
2.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ mAbs.....	58
2.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA.....	59
2.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ.....	60
2.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ.....	61
2.4	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	62
2.5	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ Β-ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ.....	63
2.6	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ Fab'2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	64
2.7	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ.....	64
2.8	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΑΠΤΕΝΙΟΥ Tri-Nitro-Phenyl.....	65
2.9	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ MDA.....	66
2.10	ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ mAbs ΣΕ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ.....	67
2.10.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ.....	67
2.10.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ Epstein-Barr.....	68
2.10.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑΣ.....	69
2.10.4	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ Influenza A.....	70
2.10.5	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ Candida albicans.....	71
2.10.6	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ.....	72
3.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	75
4.	ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΣΕ HEK ΚΑΙ HS-5 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	77
9.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
10.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αντιγονική διέγερση μέσω της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης του Β κυτταρικού υποδοχέα (ΒκΥ) συμβάλλει καθοριστικά στην ανάπτυξη του Σπληνικού Λεμφώματος της Οριακής Ζώνης (ΣΛΟΖ). Συνεπώς, η μελέτη των χαρακτηριστικών του ΒκΥ των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες και να συμβάλλει δραστικά στην κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η παραγωγή των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ από ασθενείς με ΣΛΟΖ ως ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) και η μελέτη του προτύπου της αντιγονικής ειδικότητάς τους.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ) υπό την επίβλεψη του κ. Κώστα Σταματόπουλου, Διευθυντή του Ινστιτούτου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Γούναρη, όπως επίσης και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αναστασία Ιατρού, οι οποίες με καθοδηγούσαν καθημερινά στην πορεία των πειραμάτων μου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου: Νίκο Παπακωνσταντίνου, Σταυρούλα Ντούφα, Σπύρο Πετράκη, Σταματία Λαΐδου, Γιάννη Γκέκα, Μαρίνα Γερούση, Μαρία Καρυπίδου, Μαρία Κουτρουμάνη, Γιώργο Γαβριηλίδη, Κατερίνα Γεμεντζή, Έλσα Βλαχονικόλα και στη συνάδελφο Σοφία Νοτοπούλου, οι οποίοι εμπλούτισαν τις γνώσεις μου σε θεωρητικά και πρακτικά επιστημονικά ζητήματα και ήταν πάντα πρόθυμοι να διαλευκάνουν απορίες που τυχόν μου προέκυπταν.

Τέλος, αξιοσημείωτη ήταν η συμβολή της οικογένειάς μου και των κοντινών μου ανθρώπων που συνεχώς μου προσέφεραν την κατανόηση και την στήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του Β κυτταρικού Υποδοχέα (ΒκΥ) έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της μοριακής βάσης των κακοηθειών από ώριμα Β λεμφοκύτταρα και στηρίζει την ιδέα της αντιγονικής επιλογής στην ανάπτυξη και την εξέλιξη αυτών των νόσων. Ωστόσο, τα αντιγόνα που εμπλέκονται στην επιλογή και τη διέγερση των νεοπλασματικών κλώνων παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Επομένως, η λειτουργική ανάλυση των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ και η ταυτοποίηση των αντιγόνων που αναγνωρίζονται μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στον καθορισμό της παθογένεσης αυτών των νεοπλασιών.

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στο λειτουργικό χαρακτηρισμό των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ από ασθενείς με Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (ΣΛΟΖ). Συγκεκριμένα, οι κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες του ΒκΥ από 14 ασθενείς με ΣΛΟΖ παράχθηκαν ως IgM μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) και ελέγχθηκαν ως προς την αντιγονική τους ειδικότητα με ανοσοδοκιμασίες ELISA και κυτταρομετρία ροής.

Αναλυτικά, το πάνελ των αντιγονικών στόχων που εξετάστηκαν περιλάμβανε μεμβρανικά, οργανοειδικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά αντιγόνα όπως επίσης και μικροβιακούς παράγοντες: τα περισσότερα από τα αντιγόνα αυτά είναι συνηθισμένοι αντιγονικοί στόχοι φυσικών και παθολογικών αντισωμάτων. Σχεδόν στις μισές περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη αυτο- και πολυ- αντιδραστικότητα, χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των φυσικών και παθολογικών (αυτο)αντισωμάτων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι ΣΛΟΖ Β κυτταρικοί κλώνοι πιθανόν προκύπτουν από την εξαλλαγή πολυαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων στην οριακή ζώνη του σπλήνα.

ABSTRACT

The study of the clonotypic B cell receptor immunoglobulins (BcR IG) has been very informative for the understanding of the molecular basis of the mature B cell malignancies and supports the crucial role of the antigen selection in their pathogenesis. However, the nature of the implicated antigen(s) remains largely unknown. Therefore, it becomes crucial to analyze the functional characteristics of the BcR IG and their antigen recognition pattern in order to shed light into disease pathogenesis.

The present study focuses on the functional characterization of the clonotypic BcR IG from patients with Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL). Specifically, the clonotypic BcR IGs from 14 SMZL patients were produced as recombinant IgM monoclonal antibodies (mAbs) and the antigenic specificity was assessed using ELISA immunoassays and flow cytometry.

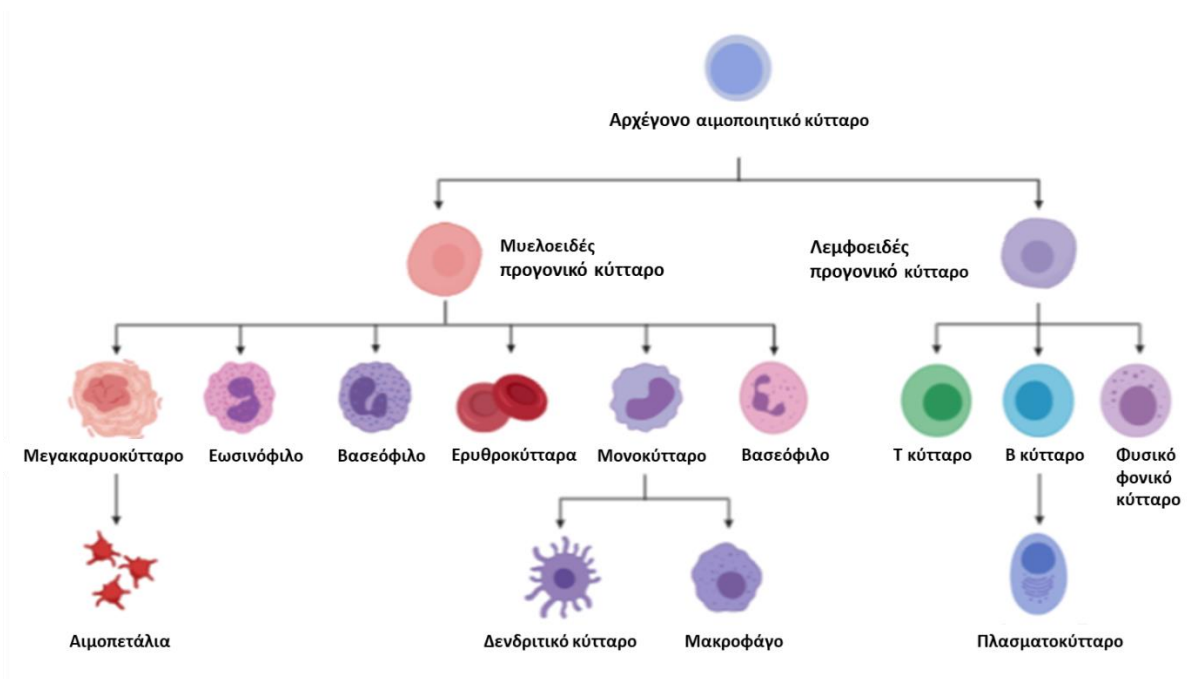
In particular, the panel of antigenic targets studied included membrane, organ-specific, cytoplasmic and nuclear antigens, as well as microbial agents: most of these antigens are common antigenic targets of naturally and pathologically occurring (auto) antibodies. In almost half of the cases, extensive auto- and poly- reactivity was observed, an antigen recognition pattern reminiscent of naturally and pathologically occurring (auto)antibodies, indicating that SMZL B cell clones may arise from polyreactive B cells likely resident in the splenic marginal zone.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, ένα εξαιρετικά πολύπλοκο αμυντικό σύστημα, εξελίχθηκε με σκοπό την προστασία του ξενιστή έναντι των μολυσματικών παραγόντων του περιβάλλοντος και του καρκίνου¹. Οι μολυσματικοί παράγοντες περιέχουν πληθώρα ουσιών (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) που ονομάζονται ανοσογόνα (immunogen) ή αντιγόνα (antigen - Ag) και έχουν την ιδιότητα να προκαλούν ανοσοαπόκριση². Οι ανοσοαποκρίσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τη μη ειδική (έμφυτη ή φυσική) και την ειδική (επίκτητη), οι οποίες λειτουργούν συνεργατικά και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές έναντι των παθογόνων. Και οι δύο εξαρτώνται από τις ιδιότητες και τις λειτουργίες των λευκοκυττάρων. Συγκεκριμένα, η μη ειδική μεσολαβείται από φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα), ενώ η ειδική στηρίζεται στη δράση των Β και Τ λεμφοκυττάρων³.

Τα λευκοκύτταρα παράγονται, φιλοξενούνται και αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα στα όργανα και τους ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος που διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα ανήκουν ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας που παρέχουν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των λευκοκυττάρων από αρχέγονα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα (HSC: hematopoietic stem cell). Από τα HSC κύτταρα προκύπτει ο κοινός πρόγονος της μυελικής σειράς (common myeloid progenitor-CMP) που αποδίδει τελικά τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα και ο κοινός λεμφοειδής πρόγονος (common lymphoid progenitor-CLP) που αποδίδει τα κύτταρα της λεμφικής σειράς (Β λεμφοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα – natural killer cells, NK) (Εικόνα 1). Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στο περιβάλλον των οποίων τα ώριμα λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα, είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, ο διάχυτος λεμφικός ιστός στο αίμα, οι λεμφικοί ιστοί των βλενογόνων, οι αμυγδαλές, τα λεμφογάγγλια και οι πλάκες Payer^{1,4}.



Εικόνα 1: Κυτταρικοί πλυθισμοί του αίματος που προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών.

1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η έμφυτη ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Αρχικά, το παθογόνο έρχεται αντιμέτωπο με τους ανατομικούς, φυσιολογικούς και βιοχημικούς φραγμούς που περιλαμβάνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος που παρεμποδίζουν την είσοδο των παθογόνων, τους βλενογόνους, την θερμοκρασία, το pH, τη λυσοζύμη που βρίσκεται στο σάλιο και τα δάκρυα και διασπά το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, το συμπλήρωμα, η ενεργοποίηση του οποίου οδηγεί σε κυτταρόλυση των μικροβίων, τις ιντερφερόνες που παρεμποδίζουν τη μεταγραφή του ιικού γενετικού υλικού κ.ά⁵.

Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία είναι τα φαγοκύτταρα (κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα), τα NK κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα⁵. Οι αποκρίσεις της έμφυτης ανοσίας μεσολαβούνται από την αναγνώριση των μοριακών προτύπων των παθογόνων (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns ή DAMPs, danger-associated molecular patterns) από ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs, pattern-recognition receptors). Στα PAMPs ανήκουν αντιγόνα όπως είναι η φλαγγελίνη, το ιικό μονόκλωνο ή δίκλωνο RNA, τα μη μεθυλιωμένα CpG ολιγονουκλεοτίδια, οι λιποπολυσακχαρίτες, τα λιπαρά οξέα. Στα DAMPs ανήκουν αντιγόνα όπως είναι τα λιπαρά οξέα, οι πρωτεΐνες HSP (heat shock proteins) και το ουρικό οξύ⁶. Στην κατηγορία των PRR υποδοχέων ανήκουν οι υποδοχείς TLR (Toll-like receptor) και CLR (C-type lectin

receptor) που αναγνωρίζουν βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα, οι υποδοχείς RLR (RIG-I-like receptors) που ανιχνεύουν ιικό RNA και οι υποδοχείς NLR (NOD-like receptors) είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης ως απόκριση σε επιβλαβή σήματα εντός του κυττάρου⁷.

1.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Όταν ένα παθογόνο διαφύγει από τους αμυντικούς μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας, τότε η δράση της ειδικής ή προσαρμοστικής ανοσίας είναι κρίσιμη για τον έλεγχο της μόλυνσης. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η αναγνώριση συγκεκριμένων μορίων που υπάρχουν σε παθογόνα και απουσιάζουν από τον ξενιστή. Μεσολαμβάνεται από τα T και B λεμφοκύτταρα και χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση, μνήμη και τη διάκριση του εαυτού από το ξένο¹.

Η ειδική ανοσοαπόκριση διακρίνεται σε χυμική και κυτταρική. Η χυμική χαρακτηρίζεται από αναγνώριση του αντιγόνου μέσω του B κυτταρικού υποδοχέα (BκΥ), ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων και παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων, τα οποία μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μετακινούνται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπου αντιδρούν με το αντιγόνο. Η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων πυροδοτείται μέσω σημάτων που λαμβάνουν από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και από άλλα κύτταρα, όπως τα δενδριτικά⁸.

Η κυτταρική ανοσοαπόκριση κατευθύνεται έναντι ενδοκυττάρων μικροβίων. Κατά την κυτταρική ανοσοαπόκριση, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω της σύνδεσης του T λεμφοκυτταρικού υποδοχέα (TκΥ) με αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται σε σύμπλοκο με ένα μόριο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex - MHC) τάξης I. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα προκαλούν την κυτταρόλυση των μολυσμένων κυττάρων^{8,9}.

2. ΑΝΤΙΓΟΝΑ

Με τον όρο αντιγόνα χαρακτηρίζονται ουσίες που αναγνωρίζονται από τον BκΥ και, σε συνδυασμό με ένα μόριο MHC, από τον TκΥ. Με τον όρο ανοσογόνα ορίζονται τα αντιγόνα που είναι ικανά να προκαλέσουν μια ανοσοαπόκριση. Η διάκριση αυτή είναι απαραίτητη καθώς υπάρχουν αντιγόνα, όπως τα απτένια που δεν έχουν την ιδιότητα της ανοσογονικότητας. Ωστόσο, στην καθημερινή πράξη αλλά και στην παρούσα διπλωματική εργασία, χάριν ευκολίας, ο όρος αντιγόνο αναφέρεται

και στην ιδιότητα της ανοσογονικότητας. Η ανοσογονικότητα των αντιγόνων εξαρτάται από παραμέτρους όπως η ιδιότητα του ξένου, η χημική φύση και η χημική πολυπλοκότητα, η δόση και η οδός χορήγησης, το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού και η δυνατότητα επεξεργασίας και της παρουσίας μέσω μορίων MHC¹⁰.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές ενός μακρομορίου, τους επιτόπους ή αντιγονικούς καθοριστές, που είναι ικανοί να διεγείρουν μια ανοσοαπόκριση. Ο επίτοπος είναι μέρος του αντιγόνου που προσδέεται στον αντιγονικό υποδοχέα στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων (ΒκΥ). Έτσι, τα αντιγόνα χαρακτηρίζονται από ένα εύρος διαφορετικών επιτόπων που μπορούν να αναγνωριστούν και να συνδεθούν με περισσότερους από έναν υποδοχείς⁴.

Η ανοσοαπόκριση από τα Β λεμφοκύτταρα ξεκινά είτε απευθείας μετά την αναγνώριση του αντιγόνου από τον ΒκΥ είτε μετά την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων από συνδιεγερτικό σήμα από ένα δραστικό Τ βοηθητικό λεμφοκύτταρο. Με βάση αυτή τη διάκριση τα αντιγόνα διακρίνονται σε θυμοανεξάρτητα και θυμοεξαρτώμενα και οι ανοσοαποκρίσεις Τ-ανεξάρτητες ή θυμοανεξάρτητες και σε Τ-εξαρτώμενες ή θυμοεξαρτώμενες, αντίστοιχα. Τ-εξαρτώμενες ανοσοαποκρίσεις εγείρουν κυρίως τα πρωτεϊνικά αντιγόνα τα οποία δεσμεύονται σε μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (major histocompatibility complex-II, MHC-II) και αναγνωρίζονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, στις Τ-ανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις συμμετέχουν οι πολυσακχαρίτες, τα λιπίδια και άλλα μη πρωτεϊνικά αντιγόνα εγείροντας την χυμική ανοσοαπόκριση (παραγωγή αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα) χωρίς τη βοήθεια των Τ-λεμφοκυττάρων¹⁰.

Επιπλέον, με βάση την προέλευσή τους τα αντιγόνα διακρίνονται σε τρεις τύπους: ξένα, ενδογενή και αυτοαντιγόνα. Τα ξένα αντιγόνα προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον του οργανισμού και σε αυτά ανήκουν ουσίες, όπως είναι οι ιοί, τα βακτήρια, πρωτόζωα, συστατικά τροφίμων, ακόμα και ο ορός ή τα ερυθροκύτταρα από άλλον οργανισμό. Τα ενδογενή αντιγόνα προκύπτουν είτε από τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό, είτε από ιική ή ενδοκυττάρια μικροβιακή μόλυνση. Τα αυτοαντιγόνα προέρχονται από τον ίδιο τον οργανισμό και είναι συνήθως φυσιολογικές πρωτεΐνες ή σύμπλοκα πρωτεϊνών (πολλές φορές με DNA ή RNA), οι οποίες αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού σε περιπτώσεις αυτοάνοσων ασθενειών¹¹.

Αυτοαντιγόνα αναγνωρίζονται και σε μη παθολογικές συνθήκες από τα φυσικά αυτοαντισώματα (natural autoantibodies, NABs) που υπάρχουν φυσιολογικά στον ορό, απουσία αντιγονικής διέγερσης και συμμετέχουν στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι μικροβίων και στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων και παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Τα φυσικά αυτοαντισώματα είναι πολυαντιδραστικά και αναγνωρίζουν μικροβιακά αντιγόνα και αυτοαντιγόνα μη-ειδικά και με χαμηλή συγγένεια^{12,13}.

3. ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

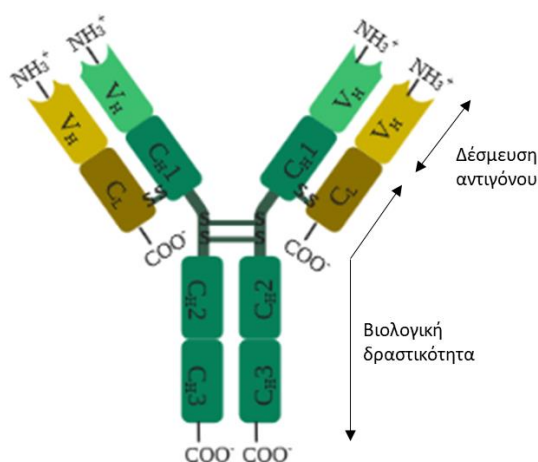
3.1 ΔΟΜΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που συναντώνται είτε ως μέρος του BκΥ στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, είτε ως εκκρινόμενα από τα πλασματοκύτταρα αντισώματα. Τα διαλυτά αντισώματα μεσολαβούν στη χυμική ανοσοαπόκριση, ενώ οι ανοσοσφαιρίνες επιφανείας επάγουν τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων, αφού συνδεθούν με το κατάλληλο αντιγόνο³. Τα αντισώματα συμβάλλουν στην ανοσία με τρεις κύριους τρόπους. Πρώτον, συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών και των τοξινών. Δεύτερον, πραγματοποιούν οψωνινοποίηση, δηλαδή κάλυψη της επιφάνειας ενός παθογόνου μικροοργανισμού από αντισώματα με σκοπό την αύξηση της φαγοκυττάρωσής του. Τρίτον, ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος, μιας ομάδας πρωτεϊνών στο πλάσμα του αίματος που σχετίζονται με την ανοσία και την άμυνα του οργανισμού⁴.

Η ανοσοσφαιρίνη αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες μοριακού βάρους 50-75 kDa και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες μοριακού βάρους 25 kDa¹⁴. Οι βαριές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφυδρικούς δεσμούς και κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με τη βαριά αλυσίδα με δισουλφυδρικό δεσμό και με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα το σχηματισμό τετραμερούς με δομή που μοιάζει με το γράμμα "Υ" (Εικόνα 2)¹. Κάθε αλυσίδα φέρει στο αμινοτελικό της άκρο τη μεταβλητή περιοχή (V, Variable) και στο καρβοξυτελικό άκρο την σταθερή περιοχή (C, Constant) που αποτελούνται, ξεχωριστά, από 110-130 αμινοξέα (περίπου 12,000-13,000 kDa)^{3,15}. Οι ελαφριές αλυσίδες αποτελούνται από μια μεταβλητή, VL, και μια σταθερή, CL, επικράτεια, ενώ οι βαριές αλυσίδες φέρουν μια μεταβλητή, VH, και τρεις σταθερές επικράτειες, CH1, CH2 και CH3 (Εικόνα 2)⁴.

Η σταθερή περιοχή ευθύνεται για τις διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες των ανοσοσφαιρινών και ανάλογα με την αλληλουχία της δημιουργεί πέντε κύριες τάξεις ανοσοσφαιρινών: IgM, IgG, IgA, IgD

και IgE. Η μεταβλητή περιοχή των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων διακρίνεται στις υπερμεταβλητές περιοχές (HV, hypervariable) και στις περιοχές πλαισίου (FR, framework regions). Οι περιοχές πλαισίου είναι τέσσερις, βρίσκονται ενδιάμεσα των τριών υπερμεταβλητών περιοχών (HV1, HV2, HV3) και αποτελούνται από σχετικά σταθερά αμινοξέα. Οι υπερμεταβλητές περιοχές, γνωστές και ως CDRs (complementarity determining regions) αποτελούν περιοχές πρόσδεσης του αντιγόνου με υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας στην αμινοξική τους αλληλουχία και καθορίζουν την ειδικότητα των αντισωμάτων^{1,4}.



Εικόνα 2: Δομή της ανοσοσφαιρίνης

3.2 ΤΥΠΟΙ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας (μ, γ, δ, ε, α), οι ανοσοσφαιρίνες διακρίνονται σε πέντε τάξεις ή ισοτύπους (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA). Στις ελαφριές αλυσίδες διακρίνονται μόνο δύο τύποι [κάππα (κ) και λάμβδα (λ)] και κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης διαθέτει μόνο έναν από τους δυο τύπους⁴.

Οι ανοσοσφαιρίνες IgM αντιπροσωπεύουν το 5-10% του συνόλου των ανοσοσφαιρινών του ορού και εκκρίνονται στη μορφή πενταμερών με τις σταθερές περιοχές στο κέντρο του πενταμερούς και τις 10 θέσεις αντιγονικής πρόσδεσης περιφερικά. Η IgM είναι η πρώτη τάξη ανοσοσφαιρίνης που παράγεται σε μια πρωτογενή άνοση απόκριση προς ένα αντιγόνο και η πρώτη τάξη ανοσοσφαιρίνης που συντίθεται στα νεογνά. Ο ισοτύπος IgG αντιπροσωπεύει το 80% των ανοσοσφαιρινών του ορού και έχει τον μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τάξεις των ανοσοσφαιρινών.

Βάσει διαφορών στη δομή και στην αλληλουχία της βαριάς αλυσίδας της σταθερής περιοχής προκύπτουν τέσσερις υποτάξεις: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄. Οι ανοσοσφαιρίνες IgG παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του εμβρύου, στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος κατά την οψωνοποίηση και στη δευτερογενή ανοσοαπόκριση. Ο ισότυπος IgA, αν και αποτελεί μόνο το 10-15% των ανοσοσφαιρινών στον ορό, είναι η κυρίαρχη μορφή στις εκκρίσεις και στους βλεννογόνους (μητρικό γάλα, σίελος, βλέννα των αναπνευστικών, γεννητικών, ουροποιητικών και γαστρεντερικών οδών κ.α.). Οι ανοσοσφαιρίνες IgE βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στον ορό και έχουν μια ιδιαίτερη βιολογική δράση που περιλαμβάνει την αντίδραση της άμεσης υπερευαισθησίας κατά τη διάρκεια των αλλεργικών αποκρίσεων και την απόκριση σε μολύνσεις από παρασιτικούς σκώληκες. Τέλος, ο ισότυπος IgD αποτελεί μόλις το 0.2% των ανοσοσφαιρινών του ορού. Η εκκρινόμενη μορφή προσδένεται σε βακτηριακές πρωτεΐνες ενεργοποιώντας τα Β λεμφοκύτταρα και η μεμβρανική IgD λειτουργεί ως υποδοχέας για αντιγόνα και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων^{1,15}.

3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

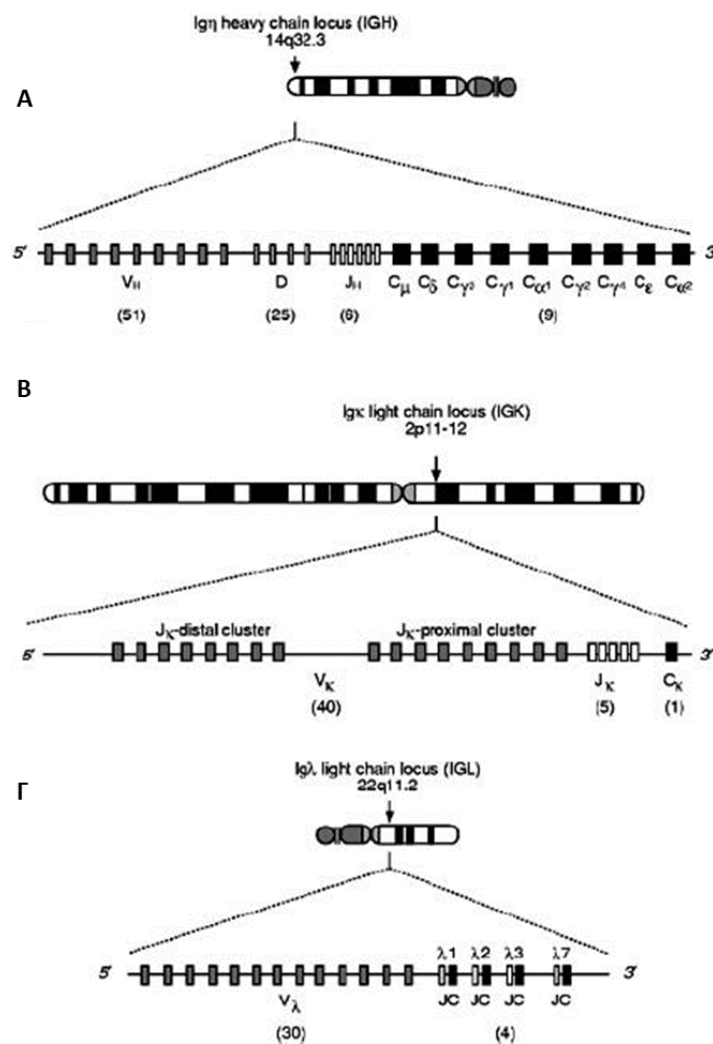
Οι ανοσοσφαιρίνες αναγνωρίζουν μεγάλο αριθμό αντιγόνων χάρη στην πικιλομορφία τους, η οποία πηγάζει από τη δομική οργάνωση των γονιδίων της σταθερής και της μεταβλητής περιοχής και από τη μοναδικότητα των Β λεμφοκυττάρων να τροποποιούν τα γονίδια αναδιατάσσοντας το χρωμοσωμικό τους DNA¹⁶. Η δομική ποικιλότητα που απαιτείται για την αναγνώριση των αντιγόνων προκύπτει από μια πολύπλοκη συστοιχία γονιδίων⁴. Οι περιοχές των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών κωδικοποιούνται από ξεχωριστές οικογένειες γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ και οι μεταβλητές και σταθερές περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών κωδικοποιούνται από ανεξάρτητα γονίδια¹⁵.

Συγκεκριμένα, η μεταβλητή περιοχή τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας κωδικοποιείται από τα γονίδια V (Variable: μεταβλητο) και J (Joining: συνδετικό). Επιπλέον, στην περίπτωση της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας υπάρχουν επίσης και τα γονίδια D (Diversity: ποικιλότητα)⁴. Στο 5'-άκρο κάθε γονιδίου V υπάρχει μια αλληλουχία που κωδικοποιεί ένα μικρό πεπτίδιο οδηγό (L: Leader sequence) μήκους 120-150 bp που κατευθύνει τη βαριά ή την ελαφριά αλυσίδα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η σταθερή περιοχή των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών κωδικοποιείται από τα γονίδια C (Constant: σταθερό)^{1,4}.

Στο γονιδιακό τόπο της βαριάς αλυσίδας (IGH) ανήκουν περίπου 44 λειτουργικά γονίδια IGHV, 23 γονίδια IGHD και 6 γονίδια IGHJ, τα οποία βρίσκονται στη χρωμοσωμική θέση 14q32.3 με συνολικό

μήκος περίπου 1250 kb. Ένα από τα εννιά γονίδια C της βαριάς αλυσίδας κωδικοποιεί τη σταθερή περιοχή της (Εικόνα 3A)¹⁷.

Η πολυγονιδιακή οικογένεια της κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK) βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 2p11-12 έχει συνολικό μήκος 1820 kb και περιλαμβάνει 31-35 λειτουργικά γονίδια IGKV, 5 γονίδια IGKJ και ένα γονίδιο IGKC^{4,16} (Εικόνα 3B). Η πολυγονιδιακή οικογένεια της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL) βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 22q11.2, έχει μήκος 1050 kb και περιλαμβάνει 29-33 γονίδια IGLV, 4 γονίδια IGLJ και 7 γονίδια IGLC (Εικόνα 3Γ)^{1,11,18}.



Εικόνα 3: Οργάνωση των γονιδίων ανοσοσφαιρινών του ανθρώπου: (Α) γονίδια της βαριάς αλυσίδας, (Β) γονίδια της κ ελαφριάς αλυσίδας, (Γ) γονίδια της λ ελαφριάς αλυσίδας (Tomlinson M. Ian, Encyclopedia of Immunology (Second Edition), 1998).

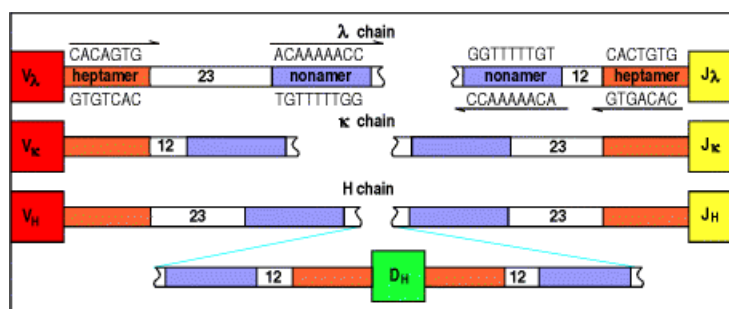
3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες χαρακτηρίζονται από σημαντική ετερογένεια αναγνωρίζοντας πολύ μεγάλο εύρος αντιγονικών επιτόπων με σκοπό την αποτελεσματική προστασία του οργανισμού. Το συνολικό ρεπερτόριο αντιγονικών ειδικοτήτων ανέρχεται σε 10^7 - 10^9 και είναι αποτέλεσμα της συλλογικής δράσης ειδικών μηχανισμών: συνδυαστική και συνδετική ποικιλότητα, σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και εναλλαγή ισοτύπου.

3.4.1 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Οι μεταβλητές περιοχές των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών δεν κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο, αλλά από τα γονίδια V, (D) και J μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται ανασυνδυασμός V(D)J. Κατά τον ανασυνδυασμό V(D)J συμβαίνει τυχαία αναδιάταξη ενός γονιδίου από κάθε ομάδα γονιδίων V, D που οδηγεί στην παραγωγή ενός V-D-J και ενός V-J πρωτογενούς μετάγραφου για τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα, αντίστοιχα. Καθώς τα διαθέσιμα γονίδια V, D και J είναι πολλά και ο ανασυνδυασμός τυχαίος, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός συνδυασμών. Επιπλέον, η ποικιλομορφία αυξάνει με τον συνδυασμό μιας βαριάς αλυσίδας με κάθε πιθανή ελαφριά αλυσίδα κ ή λ, οδηγώντας σε περίπου 3.5×10^6 πιθανούς συνδυασμούς⁴.

Ο ανασυνδυασμός V(D)J καθοδηγείται από τις αλληλουχίες σηματοδότησης ανασυνδυασμού (RSS, Recombination Signal Sequence). Οι RSS εντοπίζονται στο 3' άκρο του γονιδίου V, στα δύο άκρα του D και στο 5' άκρο του J και αποτελούνται από ένα συντηρημένο επταμερές, ένα λιγότερο συντηρημένο εννεαμερές και μια διαστηματική αλληλουχία (space region) μήκους 12 ή 23 ζευγών βάσεων που παρεμβάλεται μεταξύ των δύο (Εικόνα 4)^{4,16}. Το μήκος της διαστηματικής αλληλουχίας είναι συντηρημένο και συμμετέχει στη δημιουργία μίας ή δυο στροφών της διπλής έλικας του DNA που φέρνει στην ίδια πλευρά της έλικας το επταμερές και το εννεαμερές, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών που θα πραγματοποιήσουν τον ανασυνδυασμό⁴.



Εικόνα 4: Η αλληλουχία RSS στις μεταβλητές περιοχές των βαριών και ελαφριών αλυσίδων (Janeway CA, Travers P, Walport MSM. Immunobiology: The Immune System In Health And Disease; 2001).

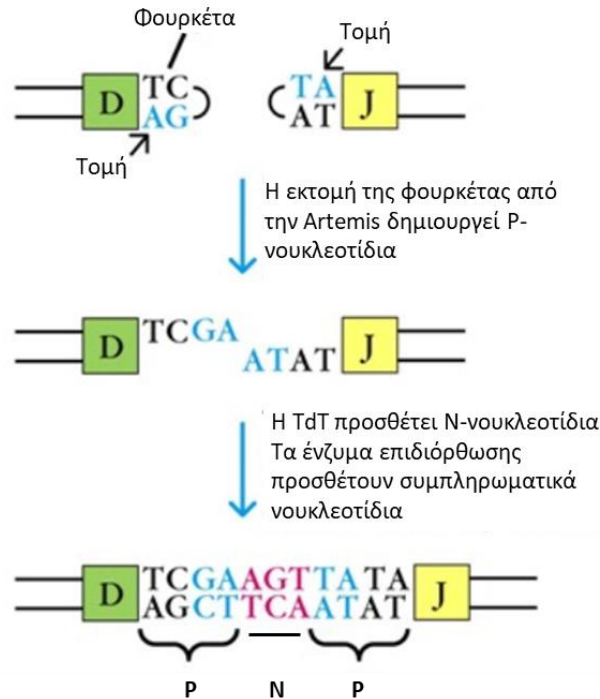
Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μόνο κατά την αναγνώριση της αλληλουχίας RSS και ακολουθεί τον κανόνα 12/23, καθώς η διαστηματική αλληλουχία μήκους 12 ζευγών βάσεων του ενός γονιδίου θα συνδυαστεί με τη διαστηματική αλληλουχία 23 ζευγών βάσεων ενός άλλου γονιδίου. Με αυτόν τον τρόπο για παράδειγμα, τα γονίδια IGHV και IGHJ που φέρουν διαστηματική αλληλουχία μήκους 23 ζευγών βάσεων θα ανασυνδυαστούν μόνο με τα γονίδια IGHD που φέρουν αλληλουχία 12 ζευγών βάσεων¹⁶. Κατά τη διαδικασία του ανασυνδυασμού σημασία έχει και η φορά της μεταγραφής των γονιδίων. Στην περίπτωση που η φορά είναι ίδια τότε το παρεμβαλλόμενο DNA μεταξύ των γονιδίων που ενώνονται θα διαγραφεί. Αντίθετα, αν η φορά της μεταγραφής των δυο γονιδίων είναι αντίστροφη, τότε το παρεμβαλλόμενο DNA θα αντιστραφεί και θα διατηρηθεί στο χρωμόσωμα⁴.

Ο V(D)J ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών καταλύεται από τα ένζυμα RAG-1 RAG-2 που λειτουργούν συνδυαστικά με άλλα ένζυμα¹. Το σύμπλοκο RAG1/2 αναγνωρίζει τις αλληλουχίες RSS, δημιουργεί μονόκλωνη εντομή στο DNA μεταξύ του γονιδίου και του επταμερούς δημιουργώντας ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο το οποίο μέσω μιας αντίδρασης trans-εστεροποίησης δημιουργεί μια δίκλωνη εντομή στο DNA. Το νουκλεοτίδιο με την ελεύθερη 3'-OH ρίζα σχηματίζει φωσφωδιεστερικό δεσμό με το συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο και ενώνει τα άκρα των δύο κλώνων σε μια κλειστή δομή φουρκέτας (hairpin)^{1,19}.

3.4.2 ΣΥΝΔΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Κατά την σύνδεση των γονιδίων V, D και J πραγματοποιείται τυχαία προσθήκη ή διαγραφή νουκλεοτιδίων στα άκρα τους, φαινόμενο γνωστό ως συνδετική ποικιλότητα (junctional diversity)^{1,11}. Η πρωτεΐνη Artemis δημιουργεί τυχαία τομή σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο της φουρκέτας που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων στις κωδικές αλληλουχίες. Αν η τομή δε συμβεί στην κορυφή της φουρκέτας προκύπτουν παλίνδρομα νουκλεοτίδια (P-νουκλεοτίδια) στο σημείο σύνδεσης των κωδικών αλληλουχιών συμβάλλοντας στην ποικιλομορφία της αλληλουχίας (Εικόνα 5)^{1,20}. Στη συνέχεια, τα μονόκλινα άκρα επιδιορθώνονται από κατάλληλα ένζυμα, ώστε τελικά να συνδυαστούν^{1,19}. Κατά την επιδιόρθωση των άκρων, εξωνουκλεάσες αφαιρούν μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων και η απαλειφή αυτή ευθύνεται για το 80% της συνδετικής ποικιλότητας που εντοπίζεται στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών ενός ενήλικου ατόμου. Επιπλέον,

το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT) καταλύει την προσθήκη νουκλεοτιδίων με τυχαίο τρόπο (N-νουκλεοτίδια) στα μονόκλωνα άκρα χωρίς να απαιτεί εκμαγείο⁴.



Εικόνα 5: Προσθήκη P- και N-νουκλεοτιδίων (Τροποποιημένη από Goldsby RA, Immunology, 6th Ed, W H Freeman & Co)

3.4.3 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ

Οι μηχανισμοί ετερογένειας που ήδη αναφέρθηκαν αφορούν σε συμβάντα κατά τον ανασυνδυασμό των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στο στάδιο της αρχικής ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων στα πρωτογενή λεμφικά όργανα¹. Μετά την έκθεση των B λεμφοκυττάρων στο αντιγόνο, η συγγένεια μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος μπορεί να βελτιωθεί μέσω του μηχανισμού της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ)¹⁶. Κατά τη ΣΥΜ, τα ανασυνδυασμένα γονίδια των μεταβλητών περιοχών των βαριών και ελαφριών αλυσίδων υφίστανται σημειακές μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων, κυρίως αντικαταστάσεις βάσεων, με συχνότητα της τάξης του 10^{-3} ανά ζεύγος βάσεων ανά κυτταρικό κύκλο¹⁵. Η συσσώρευση μεταλλάξεων ακολουθείται από την επιλογή των B λεμφοκυττάρων που φέρουν υποδοχείς με μεγαλύτερη συγγένεια για το αντιγόνο. Μόνο τα συγκεκριμένα B λεμφοκύτταρα που φέρουν BκΥ με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο επιλέγονται για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Η διεργασία αυτή καλείται ωρίμανση συγγένειας⁴.

Οι αλλαγές των βάσεων πραγματοποιούνται κατά μήκος των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής, αλλά όχι τυχαία, καθώς έχουν εντοπιστεί “επίκεντρα” εισαγωγής μεταλλάξεων που συχνά είναι αλληλουχίες μήκους τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Μεταλλάξεις που μετατοπίζουν το πλαίσιο ανάγνωσης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και οδηγούν σε μη λειτουργική ανοσοσφαιρίνη δεν επιλέγονται. Στις λειτουργικές αναδιατάξεις οι μεταλλάξεις εντοπίζονται με υψηλότερη συχνότητα στις περιοχές CDR , ενώ στις περιοχές FR κυριαρχούν οι σιωπηρές μεταλλάξεις⁴.

Ο μηχανισμός της ΣΥΜ ρυθμίζεται από διάφορα λειτουργικά στοιχεία, όπως οι αλληλουχίες των ενισχυτών και των υποκινητών. Η ΣΥΜ μεσολαβείται από ρήξεις της δίκλωνης έλικας του DNA που επιδιορθώνονται με μηχανισμό επιρρεπή σε λάθη. Κεντρικό ρόλο παίζει το ένζυμο απαμινάση της κυτιδίνης (AID, activation-induced deaminase)⁴.

3.4.4 ΕΝΑΛΛΑΓΗ ΙΣΟΤΥΠΟΥ

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των Β λεμφοκυττάρων, η πρώτη τάξη ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται είναι η IgM. Στα ώριμα Β λεμφοκύτταρα, μετά την αντιγονική διέγερση, το γενετικό σύμπλοκο VDJ μπορεί να εκφραστεί σε συνδυασμό με το γονίδιο C και των υπολοίπων τάξεων ανοσοσφαιρίνης μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται εναλλαγή ισότυπου^{1,4,15}. Η αναδιάταξη των γονιδίων C και VDJ πραγματοποιείται μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA που βρίσκονται πριν από τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας (εκτός από το IGCD) και ονομάζονται περιοχές εναλλαγής (switch regions)²¹. Οι περιοχές αυτές αναγνωρίζονται από το ένζυμο AID (activation-induced cytidine deaminase) που απαμινώνει κατάλοιπα κυτιδίνης σε ουρακίλη. Στη συνέχεια, το ένζυμο UNG (uracil DNA glycosylase) απομακρύνει το κατάλοιπο ουρακίλης, δημιουργώντας μια αβασική θέση στην οποία προσδένονται AP-ενδονουκλεάσες (APE1, APE2) και την κόβουν. Έτσι, δημιουργείται μονόκλωνη εντομή του DNA και με τη βοήθεια μηχανισμών επιδιόρθωσης, όπως ο MMR (mismatch repair), μετατρέπεται σε δίκλωνη εντομή. Στη συνέχεια, τα νέα άκρα που έχουν δημιουργηθεί υπόκεινται σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό, ώστε να ανασυνδυαστούν τα εξόνια της σταθερής και της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης²².

Η εναλλαγή ισότυπου ενεργοποιείται από σήματα που δέχεται το Β λεμφοκύτταρο από Τ λεμφοκύτταρα, διάφορες κυτταροκίνες (π.χ. IL-4, IFN-γ), καθώς και από την αλληλεπίδρασή του με το αντιγόνο²¹.

4. Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

4.1 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Μετά την γέννηση, τα Β λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο μυελό των οστών. Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSC) εξαρτάται άμεσα από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και συγκεκριμένα από τα μη λεμφοειδή στρωματικά κύτταρα, τα οποία παρέχουν την απαραίτητη στήριξη. Τα στρωματικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αναπτυσσόμενα Β λεμφοκύτταρα με τη βοήθεια κυτταρικών μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, SDF-1) και επίσης εκκρίνουν ένα σύνολο χημειοκινών και κυτταροκινών (SCF, IL-7) που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων^{4,19}.

Τα Β λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται από τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (CLP: common lymphoid progenitor), ο οποίος με τη σειρά του προκύπτει από τη διαφοροποίηση των HSC. Ο CLP χαρακτηρίζεται από την έκφραση των υποδοχέων c-kit και IL-7Rα²³ και αποδίδει Τ και Β λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Ο CLP βρίσκεται ακριβώς ένα βήμα πριν από τη δέσμευση στη Β λεμφική σειρά. Στο στάδιο αυτό δεν έχει συμβεί ο ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και οι πρωτεΐνες RAG1 και RAG2 εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Ο ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ακολουθεί αυστηρή ιεραρχική σειρά και ξεκινάει στο επόμενο στάδιο διαφοροποίησης στη Β λεμφική σειρά, στο στάδιο του πρώιμου προ-προ Β λεμφοκυττάρου στο οποίο ανασυνδυάζονται τα γονίδια IGHD και IGHJ^{24,25}.

Στη συνέχεια, στο στάδιο του όψιμου προ-προ Β λεμφοκυττάρου, το ανασυνδυασμένο σύμπλοκο IGHD-IGHJ συνδέεται με ένα γονίδιο IGHV⁴. Αυτό το στάδιο είναι κρίσιμο, καθώς για την περαιτέρω διαφοροποίηση σε προ-Β λεμφοκύτταρα απαιτείται ένας λειτουργικός IGHV-D-J ανασυνδυασμός. Σε αντίθετη περίπτωση, αν ο ανασυνδυασμός δεν είναι επιτυχής, τα προγονικά Β λεμφοκύτταρα αποπίπτουν²⁵.

Τα προ-Β λεμφοκύτταρα (pre-B cells: precursor B-cells) εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον προ-Β κυτταρικό υποδοχέα (προ-BκΥ) που αποτελείται από τους συνυποδοχείς Igα και Igβ και την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη που σχηματίζεται από τη βαριά αλυσίδα μ που προέκυψε από τον ανασυνδυασμό των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας και την υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (SLC: surrogate light chain). Η SLC αποτελείται από τις πρωτεΐνες VpreB και λ5 που είναι ομόλογες με τη μεταβλητή περιοχή και τη σταθερή περιοχή της λ ελαφριάς αλυσίδας, αντίστοιχα¹⁹. Τα προ-Β λεμφοκύτταρα που φέρουν βαριές αλυσίδες οι οποίες δε μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικό σύμπλοκο με την SLC οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Μόνο τα προ-Β λεμφοκύτταρα με τις

κατάλληλες μ βαριές αλυσίδες επιλέγονται για πολλαπλασιασμό με 3 ή 4 κυτταρικές διαιρέσεις και περαιτέρω ωρίμανση²³.

Στη συνέχεια, αναδιατάσσονται τα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων κατά παρόμοιο, ιεραρχικό τρόπο (πρώτα τα κ μετά τα λ). Στα ανώριμα πλέον B λεμφοκύτταρα, οι σωστές αναδιατάξεις των γονιδίων της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας οδηγούν στην έκφραση της επιφανειακής IgM (mIgM, membrane IgM) που συνδυαστικά με τους συνυποδοχείς Igα και Igβ σχηματίζουν τον BκΥ που είναι ικανός να συνδέεται με αντιγόνα και να μεταδίδει σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου²⁶.

Περίπου το 75% των ανώριμων B λεμφοκυττάρων που παράγονται είναι αυτοαντιδραστικά και υπόκεινται σε μια διαδικασία θετικής και αρνητικής επιλογής για αποφυγή της αυτοανοσίας και εγκαθίδρυση της αυτοανοχής. Στο μυελό των οστών, ο BκΥ αντιδρά με αυτοαντιγόνα και οι κλώνοι που επιβιώνουν χαρακτηρίζονται από μειωμένη σηματοδότηση του BκΥ. Η αυτοανοχή εξασφαλίζεται μέσω των μηχανισμών της κεντρική ανοχής:

- Κλωνική απαλοιφή: Όταν οι κλώνοι παρουσιάζουν αυξημένη σηματοδότηση BκΥ υπόκεινται σε κλωνική απαλοιφή, δηλαδή εξαλείφονται με απόπτωση.
- Διόρθωση του υποδοχέα: Σε ορισμένους κλώνους με ισχυρή BκΥ σηματοδότηση, ενεργοποιείται ξανά η έκφραση των πρωτεϊνών RAG-1 και -2 με αποτέλεσμα την περαιτέρω αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων, διεργασία που μπορεί να προκαλέσει αντικατάσταση της ελαφριάς αλυσίδας, δημιουργώντας έτσι νέα αντιγονική ειδικότητα της mIgM.
- Ανεργία: ασθενής BκΥ σηματοδότηση οδηγεί σε απώλεια έκφρασης της mIgM παράλληλα με έκφραση υψηλών επιπέδων IgD. Αυτά τα B λεμφοκύτταρα δε μπορούν να ανταποκριθούν στο συγγενές αντιγόνο τους, γίνονται δηλαδή ανεργικά²⁷.

4.2 ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα που εξέρχονται από το μυελό των οστών και μετακινούνται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος προς τον σπλήνα. Σε αυτό το μεταβατικό στάδιο ωρίμανσης τα B λεμφοκύτταρα ονομάζονται μεταβατικά (transitional), εκφράζουν και επιφανειακή IgD παράλληλα με την επιφανειακή IgM. Τα μεταβατικά B λεμφοκύτταρα δε συμμετέχουν σε ανοσοαποκρίσεις καθώς πρέπει να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους στο σπλήνα, περνώντας από αρνητική και θετική επιλογή πριν εισέλθουν στα λεμφοζίδια ή την οριακή ζώνη^{28,32}.

4.2.1 ΛΕΜΦΟΖΙΔΙΑΚΑ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα Β λεμφοκύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular B cells, FO) με φαινότυπο IgD^{high}, IgM^{low}, CD23⁺, CD21^{int}, CD1d^{low} αποτελούν Β λεμφοκύτταρα της Τ-εξαρτώμενης χυμικής ανοσίας³⁰. Προέρχονται από τα μεταβατικά Β κύτταρα του σπλήνα μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού του BκΥ εξαρτώμενου από την κινάση τυροσίνης Bruton (Btk)²⁹. Ευθύνονται για την παραγωγή IgG αντισωμάτων υψηλής συγγένειας και με μεγάλη διάρκεια ημιζωής, ιδιότητα πολύ σημαντική για τη διεκπεραίωση της χυμικής ανοσίας κατά τη διάρκεια μολύνσεων και εμβολιασμών².

Τα FO λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν διαμέσου του αίματος και της λέμφου παγιδεύοντας αντιγόνα και λειτουργώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που εκθέτουν αντιγονικά πεπτίδια στην επιφάνειά τους προς αναγνώριση από τα Τ λεμφοκύτταρα. Τα FO Β λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στα λεμφοζίδια του σπλήνα και των λεμφαδένων, όπου περιστοιχίζονται από βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα και είναι έτοιμα να αντιδράσουν με αντιγόνα πρωτεϊνικής φύσης²⁷.

Κατά την αντιγονική διέγερση, τα FO Β λεμφοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης με τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα και τον αρχικό τους πολλαπλασιασμό στις ζώνες των Τ λεμφοκυττάρων ενεργοποιούνται και κατόπιν μετακινούνται στο κέντρο των λεμφοζιδίων και συμμετέχουν στη δημιουργία του βλαστικού κέντρου^{4,31}.

Το βλαστικό κέντρο είναι ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον όπου τα Β λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε εκτενή πολλαπλασιασμό, ωρίμανση συγγένειας και εναλλαγή ισοτύπου. Τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (FDCs: follicular dendritic cells) παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του βλαστικού κέντρου μέσω των αλληλεπιδράσεων επιφανειακών υποδοχέων με τους κατάλληλους προσδέτες στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, όπως η σύνδεση του προσδέτη CD40L των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων στον υποδοχέα CD40 των Β λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και μέσω της παραγωγής κυτταροκινών όπως είναι οι CXCL13 και SAP³².

Το βλαστικό κέντρο παρουσιάζει πολικότητα με δύο ευδιάκριτες ζώνες, μια σκοτεινή και μια φωτεινή. Στη σκοτεινή ζώνη εντοπίζονται οι κεντροβλάστες, πολλαπλασιαζόμενα Β λεμφοκύτταρα

που υπόκεινται σε ΣΥΜ και εναλλαγή ισοτύπου. Στη συνέχεια, οι κεντροβλάστες μετακινούνται στη φωτεινή ζώνη όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σταματά και διαφοροποιούνται σε κεντροκύτταρα που επιλέγονται με βάση τη συγγένειά τους με το αντιγόνο. Μόνο τα κεντροκύτταρα που διαθέτουν ανοσοσφαιρίνες υψηλής συγγένειας είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με τα λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα (FDC) και βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα βοηθητικά Τ οδηγούν στη διαφοροποίηση των κεντροκυττάρων τα οποία θα εξέλθουν από το βλαστικό κέντρο και θα διαφοροποιηθούν είτε σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο είτε σε Β λεμφοκύτταρα μνήμης³³.

4.2.2 B-1 ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα B-1 κύτταρα έχουν φαινότυπο $IgM^{high} IgD^{low} CD5^{+}$, ικανότητα αυτοανανέωσης και αποτελούν το μικρότερο πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων (περίπου το 5%) στον ποντικό^{4,34}. Τα B-1 κύτταρα είναι ο κύριος υποπληθυσμός των πλευρικών και περιτοναϊκών κοιλοτήτων, αποτελώντας το 30-60% των Β λεμφοκυττάρων αυτών των περιοχών. Θεωρείται ότι προέρχονται από συγκεκριμένα εμβρυϊκά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, διαφορετικά από τα κύτταρα στο μυελό των οστών ενός ενήλικου ατόμου, ακολουθώντας ένα ξεχωριστό μονοπάτι οντογένεσης από τα υπόλοιπα Β λεμφοκύτταρα³⁴.

Τα αντισώματα των B-1 κυττάρων είναι πολυαντιδραστικά και προσδέονται με χαμηλή συγγένεια σε αυταντιγόνα, συμβάλλοντας στην κυτταρική ομοιόσταση και στην έμφυτη ανοσία, καθώς δρουν ως πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον παθογόνων^{34,35}. Τα B-1 κύτταρα παράγουν κυρίως IgM και πολύ σπάνια IgG3 αντισώματα εναντίον Τ-ανεξάρτητων αντιγόνων, όπως αυτοαντιγόνα, τροποποιημένα αυτοαντιγόνα της επιφάνειας αποπτωτικών κυττάρων²⁷ και ξένα αντιγόνα, συνήθως των μικροβίων *Streptococcus pneumoniae*, *Influenza*, *Borrelia hermsii* και *Salmonella*³⁶. Επίσης, παράγουν IgA αντισώματα συμβάλλοντας στην προστασία των βλεννογόνων²⁷. Τέλος, τα αντισώματα των B-1 κυττάρων σπάνια φέρουν σωματικές μεταλλάξεις³⁶.

Η ύπαρξη των B-1 κυττάρων στον άνθρωπο είναι αμφιλεγόμενη, παρότι σε ορισμένες μελέτες έχει χαρακτηριστεί ένας πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων με φαινότυπο $CD20^{+}CD27^{+}CD43^{+}CD40^{+}$ ως τα ανθρώπινα B-1 κύτταρα³⁷.

4.2.3 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΛΗΝΟΣ

Τα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (MZ Β λεμφοκύτταρα) αποτελούν περίπου το 5-10% των Β λεμφοκυττάρων του σπληνός²⁴, ενώ επίσης εντοπίζονται στους λεμφαδένες, τις αμυγδαλές και τις

πλάκες Peyer. Συμμετέχουν κυρίως σε T-ανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις και παρουσιάζουν τον φαινότυπο $IgM^{hi}IgD^{low}CD1c^{+}CD21^{hi}CD23^{-}CD27^{+}$ ²⁵. Στον άνθρωπο, η ανάπτυξη της οριακής ζώνης και των MZ B λεμφοκυττάρων καθυστερεί μέχρι την ηλικία των 2 ετών, γεγονός που εξηγεί τις ασθενείς T-ανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις των βρεφών²⁴.

Η οριακή ζώνη του σπληνός εντοπίζεται μεταξύ του λευκού και του ερυθρού πολφού. Εκεί, τα MZ B λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε συνεχή επαφή με το αίμα και τα συστατικά του και αποκρίνονται άμεσα ως πρώτη γραμμή άμυνας σε αντιγόνα που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος¹⁹. Κυρίαρχος ρόλος τους είναι η αντιμετώπιση μικροβιακών αντιγόνων, όπως οι πολυσακχαρίτες βακτηρίων με πολυσακχαριτιδική κάψα²⁶.

Η επιβίωση και η διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα εξαρτάται από τον παράγοντα ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων (BAFF: B cell activating factor) και από τη σηματοδότηση μέσω της οδού Notch. Έτσι, διατηρούνται ενεργοποιημένα ώστε να αντιδράσουν γρήγορα σε αντιγόνα που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια σε αυτοαντιγόνα¹⁹.

Τα MZ B λεμφοκύτταρα αποκρίνονται άμεσα σε αντιγονικά ερεθίσματα καθώς εκφράζουν τους υποδοχείς TLR της έμφυτης ανοσίας. Επιπλέον, μαζί με τα B1 λεμφοκύτταρα, τα MZ B λεμφοκύτταρα δρουν άμεσα εναντίον των αντιγόνων, παράγοντας IgM 1-3 μέρες μετά τη μόλυνση. Έτσι, καλύπτουν το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για την κορύφωση της δράσης των FO B λεμφοκυττάρων (περίπου 7 μέρες μετά τη μόλυνση)¹⁸.

Εκτός από τη συμμετοχή τους στην έμφυτη ανοσία, τα MZ B λεμφοκύτταρα αποκρίνονται σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα καθώς εκφράζουν υψηλά επίπεδα των αντιγόνων MHC τάξης II και των πρωτεϊνών B7.1 και B7.2, τα οποία είναι απαραίτητα συνδιεγερτικά μόρια των T λεμφοκυττάρων.¹⁸ Επιπλέον τα MZ B λεμφοκύτταρα μπορούν να συγκεντρώσουν μεταλλάξεις με τη ΣΥΜ και να αλλάξουν τον ισότυπό τους μέσω της εναλλαγής ισότυπου.

5. ΣΠΛΗΝΙΚΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ

5.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

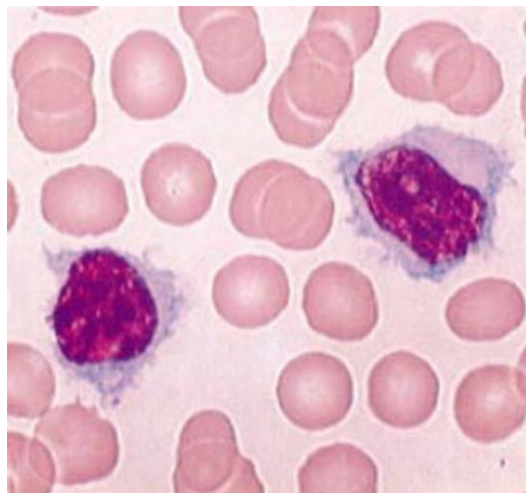
Το Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (ΣΛΟΖ) είναι σπάνια B-λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή χαμηλής κακοήθειας που προσβάλλει το σπλήνα, το μυελό των οστών και συχνά το αίμα. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι περίπου τα 65 έτη³⁸, ενώ δεν υπάρχει διαφορά στην επίπτωση μεταξύ των

δύο φύλων. Η εξέλιξη του νοσήματος γενικά είναι αργή με διάμεση επιβίωση των ασθενών 8-10 χρόνια. Ωστόσο, περίπου το 30% των ασθενών έχουν δυσμενή εξέλιξη και 5-10% των περιπτώσεων παρουσιάζει μετατροπή σε διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β λεμφοκύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL)³⁹.

5.1.1 ΚΛΙΝΙΚΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η νόσος εκδηλώνεται κυρίως με σπληνομεγαλία, συχνά με λεμφοκυττάρωση, πιο σπάνια συνυπάρχει θρομβοπενία ή αναιμία, ενώ αυτοάνοσες διαταραχές, όπως αιμολυτική αναιμία, παρατηρούνται σε ποσοστό 10-15% του συνόλου των ασθενών⁴⁰. Η διάγνωση βασίζεται στην ιστολογία του σπληνός, στην κυτταρική μορφολογία και τον ανοσοφαινότυπο του μυελού των οστών και του αίματος³⁹.

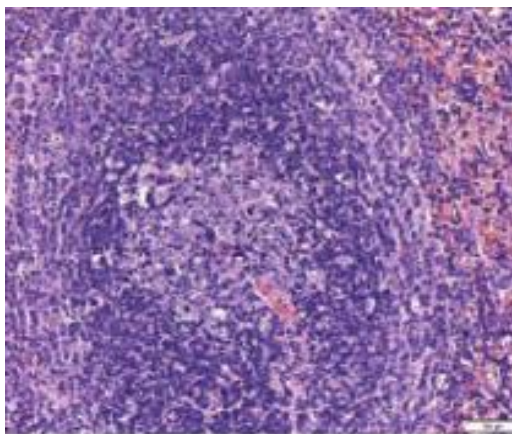
Λεμφοκυττάρωση παρατηρείται περίπου στο 75% των ασθενών. Τα παθολογικά Β λεμφοκύτταρα είναι μετρίου μεγέθους με ωοειδή πυρήνα με συμπυκνωμένη χρωματίνη, βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και άνισες κυτταροπλασματικές προεκβολές (Εικόνα 6)⁴¹. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται επίσης διήθηση του μυελού των οστών. Ωστόσο, ο βαθμός και το πρότυπο διήθησης ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ασθενών⁴².



Εικόνα 6: Μορφολογικά χαρακτηριστικά λαχνωτών λεμφοκυττάρων του ΣΛΟΖ. (Tayse Silva dos Santos, Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy, 2017; 39(2):146-154)

Ιστοπαθολογικά, παρατηρείται διήθηση του λευκού πολφού του σπληνός από νεοπλασματικά κύτταρα που περιβάλλουν και με το χρόνο αντικαθιστούν τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου. Η νεοπλασματική διήθηση δημιουργεί μια εσωτερική και μια εξωτερική ζώνη: η εσωτερική ζώνη

αποτελείται από μικρά λεμφοκύτταρα που αποικίζουν τα βλαστικά κέντρα και αντικαθιστούν τη φυσιολογική ζώνη του μανδύα του σπληνός, ενώ η εξωτερική ζώνη που αποτελείται από λεμφοκύτταρα μέσου μεγέθους με διαυγές κυτταρόπλασμα τα οποία μοιάζουν με τα κύτταρα της οριακής ζώνης (Εικόνα 7)^{38,40,44}.



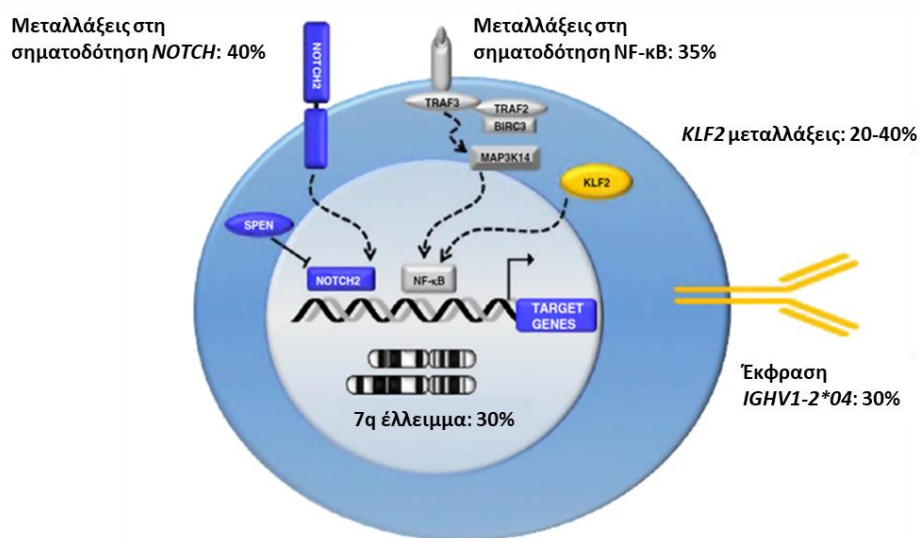
Εικόνα 7: Νεοπλασματικός πολλαπλασιασμός και εξάλειψη της φυσιολογικής ζώνης του μανδύα (Larissa SenaTeixeira Mendes, Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy 2014:4 29–38)

Στο ΣΛΟΖ, τα νεοπλασματικά κύτταρα συνήθως εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη IgM και IgD. Επιπλέον, είναι θετικά για τους δείκτες CD19, CD20, CD22, CD79b, DBA44 και συνήθως αρνητικά ως προς τους δείκτες CD5, CD10, CD23, CD43, BCL2, κυκλίνη D1, BCL6, CDw75, αννεξίνη A1, LEF1, CD103, CD123^{44,45}. Ιδιαίτερα η απουσία έκφρασης των επιφανειακών δεικτών CD5 και CD10 συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση του ΣΛΟΖ από άλλες κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CD5⁺/CD23⁺), το λεμφοζιδιακό λέμφωμα (CD10⁺) και το λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα (CD5⁺)⁴⁶. Τέλος, πολύ μικρός αριθμός κυττάρων (<5%) εκφράζει τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού Mib-1 και Ki-67³⁹.

Περίπου στο 30% των περιπτώσεων ανιχνεύεται έλλειψη στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα στην περιοχή (7q22-q32)^{38,40}. Επίσης, περίπου στο 20% των περιπτώσεων παρατηρείται τρισωμία του χρωμοσώματος 3/3q⁴⁷. Μεταθέσεις στο γονιδιακό τόπο της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών ανιχνεύονται στο 12% των περιπτώσεων ενώ μεταθέσεις που εμπλέκουν τους γονιδιακούς τόπους της ελαφριάς αλυσίδας είναι σπανιότερες⁴⁸.

Μελέτες αλληλούχησης του γονιδιώματος με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς έδειξαν συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *KLF2* και *NOTCH2*, με το τελευταίο να εμφανίζεται περίπου στο 40% των περιπτώσεων (Εικόνα 8)^{47,49,50}. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *KLF2* είναι συχνότερες στις περιπτώσεις με έλλειψη 7q και σχετίζονται με δυσμενή κλινική έκβαση^{51,52}. Μεταλλάξεις έχουν

εντοπιστεί και σε αρκετά άλλα γονίδια που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια NF-κΒ (*TNFAIP/A20*, *BIRC3*, *TRAF3* και *CARD11*) και NOTCH (*NOTCH2*, *NOTCH1*, *SPEN* και *DTX1*) και σε άλλα γονίδια (*ARID1A*, *FAT4*, *MLL2*, *AMOTL1*, *CREBBP*, *FAT1*, *MUC4*, *USH2A*, *TNGAIP3*, *CARD11*, *MYD88*, *SPEN*, *IKBKB*, *TBL1XR1*, *SIN3A*, *NOTCH1*, *SWAP70*)^{49,47,51}.



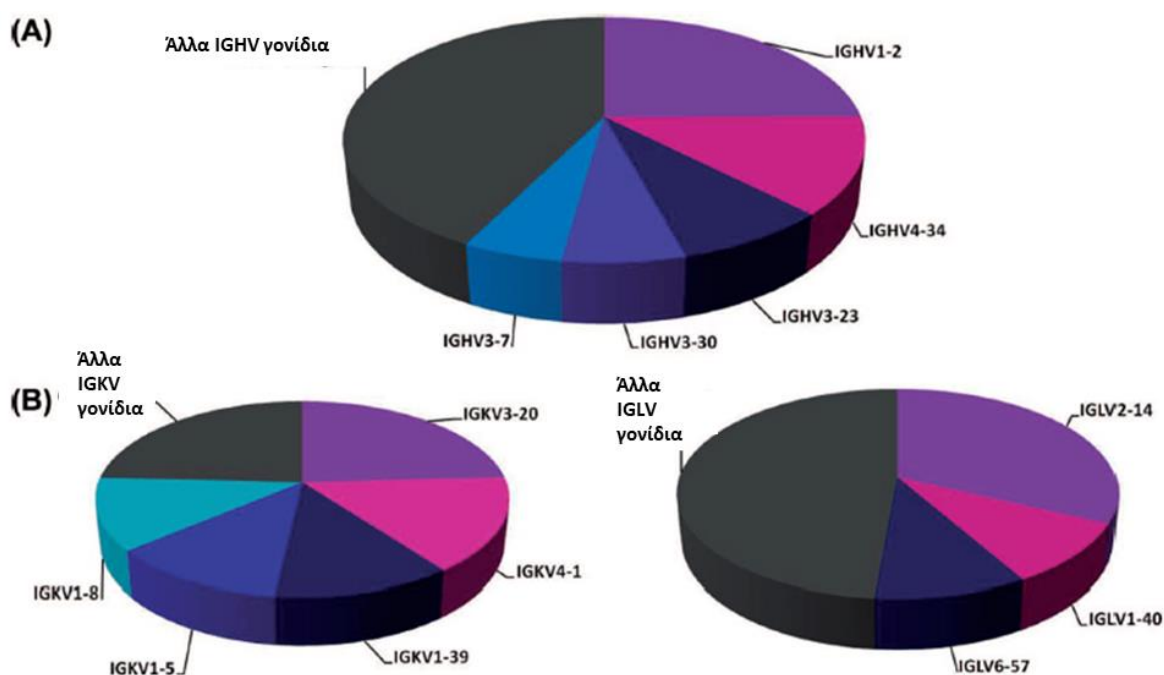
Εικόνα 8: Κύριες μοριακές τροποποιήσεις στο ΣΛΟΖ. Σχηματική απεικόνιση των απορρυθμισμένων γονιδίων και των μονοπατιών (Τροποποιημένη από Arcaini, L., Rossi, 2016, Splenic marginal zone lymphoma: From genetics to management. Blood, 127(17), 2072–2081).

5.1.2 ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΠΛΗΝΙΚΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ

Η ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στο ΣΛΟΖ αποκάλυψε ότι τρία μόλις γονίδια της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, τα γονίδια IGHV1-2, IGHV4-34 και IGHV3-23 χρησιμοποιούνται στις μισές σχεδόν περιπτώσεις (45,8%), με το IGHV1-2 να αντιπροσωπεύει σχεδόν το 30% των ασθενών (Εικόνα 9Α). Επιπλέον, μεταξύ των αναδιατάξεων IGHV1-2 επικρατεί το αλληλόμορφο IGHV1-2*04 υποδηλώνοντας την ύπαρξη ισχυρής λειτουργικής επιλογής⁴⁹. Η πολύ υψηλή έκφραση του αλληλόμορφου IGHV1-2*04 παρουσιάζει ενδιαφέρον και για το γεγονός ότι ενώ σχεδόν όλα τα ανθρώπινα γονίδια IGHV κωδικοποιούν αργινίνη (R, βασικό υδρόφιλο αμινοξύ) στη θέση VH FR3-75, το αλληλόμορφο IGHV1-2*04 κωδικοποιεί τρυπτοφάνη (W, υδρόφοβο αμινοξύ) σε αυτή τη θέση. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι η R στη θέση VH FR3-75 συμβάλλει δραστικά στη διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής της ανοσοσφαιρίνης⁵⁴ επηρεάζοντας κατά συνέπεια την αναγνώριση του/ων αντιγόνου/ων.

Επιπλέον, το αλληλόμορφο IGHV1-2*04 εμφανίζει επιλεκτικότητα ανασυνδυασμού με συγκεκριμένα γονίδια IGHD (IGHD3). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τον σχηματισμό κοινών αμινοξικών μοτίβων περιοχές CDR3 της βαριάς αλυσίδας⁵⁵. Οι IGHV1-2*04 αναδιατάξεις φέρουν συνήθως περιοχές CDR3 μεγάλου μήκους και σωματικές μεταλλάξεις μέσω της διαδικασίας της ΣΥΜ, ωστόσο σχετικά περιορισμένες⁵⁶. Επίσης, εμφανίζουν εκτεταμένη ενδοκλωνική ετερογένεια, εύρημα που υποδηλώνει κλωνική εξέλιξη υπό τη συνεχή διέγερση από αντιγόνο/α^{39,50,57}.

Επιλεκτικότητα παρατηρείται επίσης και στη χρήση των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας, αφού σε ποσοστό 60% των περιπτώσεων εκφράζονται τα εξής έξι γονίδια: IGKV3-20, IGKV4-1, IGKV1-5, IGKV1-8, IGKV1-39, IGLV2-14 (Εικόνα 9B). Επίσης, το 80% των αναδιατάξεων IGHV1-2*04 συνδυάζονται με αναδιατάξεις μόλις 3 γονιδίων V της ελαφριάς αλυσίδας (IGKV3-20, IGKV1-8 και IGLV2-14)⁵⁸ γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της επιλογής από συγκεκριμένο(α) αντιγόνο(α)⁴⁹.



Εικόνα 9: Ρεπερτόριο γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (A) της βαριάς αλυσίδας και (B) των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών στο ΣΛΟΖ (Τροποποιημένη από P. Baliakas et al, *Leukemia & Lymphoma*, February 2015; 56(2): 301–310)

5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

Στο ΣΛΟΖ η πλειονότητα των αναδιατάξεων (86.7%) φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα Β λεμφοκύτταρα έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο. Επίσης, η τοπολογία των μεταλλάξεων είναι χαρακτηριστική αντισωμάτων που έχουν επιλεγεί από αντιγόνο⁵⁶.

Το ΣΛΟΖ, όπως και άλλα κακοήθη λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους (“στερεότυπους”) ΒΚΥ^{49,56}. Η στερεοτυπία αντιβαίνει στην εξαιρετικά χαμηλή πιθανότητα της έκφρασης πανομοιότυπων ΒΚΥ⁵⁹ και υποδηλώνει την αναγνώριση ιδιαίτερων, ξεχωριστών αντιγόνων ή κατηγοριών δομικά όμοιων επιτόπων, οι οποίοι επιλέγουν τους κακοήθεις κλώνους.

Δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες παρέχουν ενδείξεις για αιτιοπαθογενετική συσχέτιση του ΣΛΟΖ με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), καθώς η επιτυχής αντιμετώπιση της ηπατίτιδας με κατάλληλη αντι-ική θεραπεία οδήγησε σε πλήρη ύφεση του λεμφώματος στους HCV⁺ ασθενείς^{40,60}. Στο HCV-σχετιζόμενο ΣΛΟΖ (HCV⁺ ΣΛΟΖ) παρατηρείται επιλεκτικότητα ως προς τη χρήση του γονιδίου IGHV1-69, που πιθανώς αντανακλά το ρόλο της αντιγονικής διέγερσης στην επιλογή των κλωνογενών κυττάρων, ενώ για κάποιες περιπτώσεις HCV⁺ λεμφωμάτων έχει αποδειχθεί και πειραματικά η αναγνώριση ικών επιτόπων^{40,43,61,62,63}.

Στη μοναδική δημοσιευμένη μελέτη της αντιγονικής ειδικότητας των ΣΛΟΖ ανοσοσφαιρινών, οι IGHV1-2*04 κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες από 5 ασθενείς παράχθηκαν ως ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs). Στη συνέχεια, μελετήθηκαν ως προς την αντιγονική τους ειδικότητα και βρέθηκε ότι αναγνωρίζουν πολυάριθμα μόρια, όπως πυρηνικά, κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά αντιγόνα, υποδηλώνοντας ότι οι περιπτώσεις IGHV1-2*04 ΣΛΟΖ μπορεί να προέρχονται από πολυαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα⁶⁴. Ωστόσο, τα mAbs από τις ΣΛΟΖ περιπτώσεις δεν αντιδρούν με πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια αποπτωτικών κυττάρων, σε αντίθεση με τα ΧΛΛ mAbs⁶⁵.

Η συμβολή του μικροπεριβάλλοντος στην εξέλιξη του ΣΛΟΖ υποστηρίζεται και από τη μελέτη της σηματοδότησης των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας TLR. Η σηματοδότηση TLR παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης του σπληνός, ιδιαίτερα όσον αφορά στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους⁴⁰. Στα κύτταρα του ΣΛΟΖ εκφράζονται οι ισομορφές TLR1, TLR7, TLR9 και TLR10⁶⁶. Ο βαθμός ενεργοποίησης των κυττάρων μέσω του TLR εξαρτάται από το προφίλ της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης του κυττάρου και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός επάγεται σημαντικά παρουσία βακτηριακών αντιγόνων⁶⁶.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η διέγερση από αντιγόνο και η άνοση σηματοδότηση εμπλέκονται στη φυσική ιστορία του ΣΛΟΖ. Συγκεκριμένα, αυτό υποστηρίζεται από την έντονη επιλεκτικότητα στο ρεπερτόριο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, την ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με στερεότυπους ΒΚΥ, την ύπαρξη ΣΥΜ στις περισσότερες περιπτώσεις και την παρουσία ενδοκλωνικής ετερογένειας που υποδηλώνει συνεχή αλληλεπίδραση με αντιγόνα^{55,56,57,58}.

Εκτός από τη συσχέτιση του ΣΛΟΖ με λοίμωξη από τον ιό ΗCV στο 15% περίπου των περιπτώσεων ΣΛΟΖ, ελάχιστα δεδομένα είναι διαθέσιμα για τη φύση των αντιγόνων που διεγείρουν τον ΒΚΥ και πιθανώς εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Η μοναδική έως σήμερα μελέτη της αντιγονικής ειδικότητας ΣΛΟΖ αντισωμάτων αφορούσε μόνο 5 περιπτώσεις που εκφράζουν το γονίδιο IGHV1-2*04 και έδειξε πολυαντιδραστικότητα και αυτοαντιδραστικότητα⁶⁴. Η περαιτέρω εξέταση της αντιγονικής ειδικότητας των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒΚΥ σε ευρύτερο δείγμα ασθενών εξακολουθεί να αποτελεί προτεραιότητα για την κατανόηση της οντογένεσης της ασθένειας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση των αντιγόνων που αναγνωρίζονται από την κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη του ΒΚΥ στο ΣΛΟΖ και η διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ του προτύπου αντιγονικής αντιδραστικότητας με μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων. Αυτό θα συμβάλλει στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεση του ΣΛΟΖ και στον εντοπισμό πιθανής αιτιολογικής σχέσης μεταξύ του ΣΛΟΖ με ορισμένα παθογόνα.

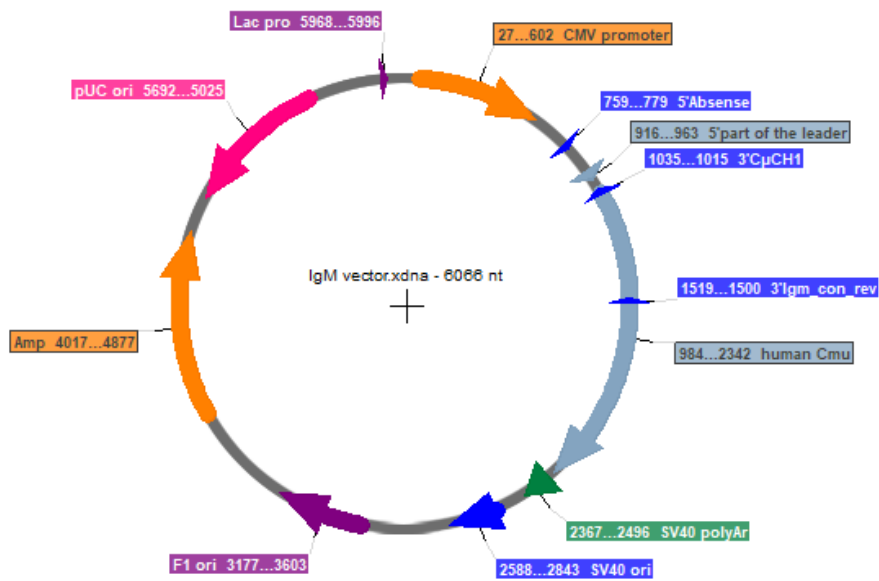
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

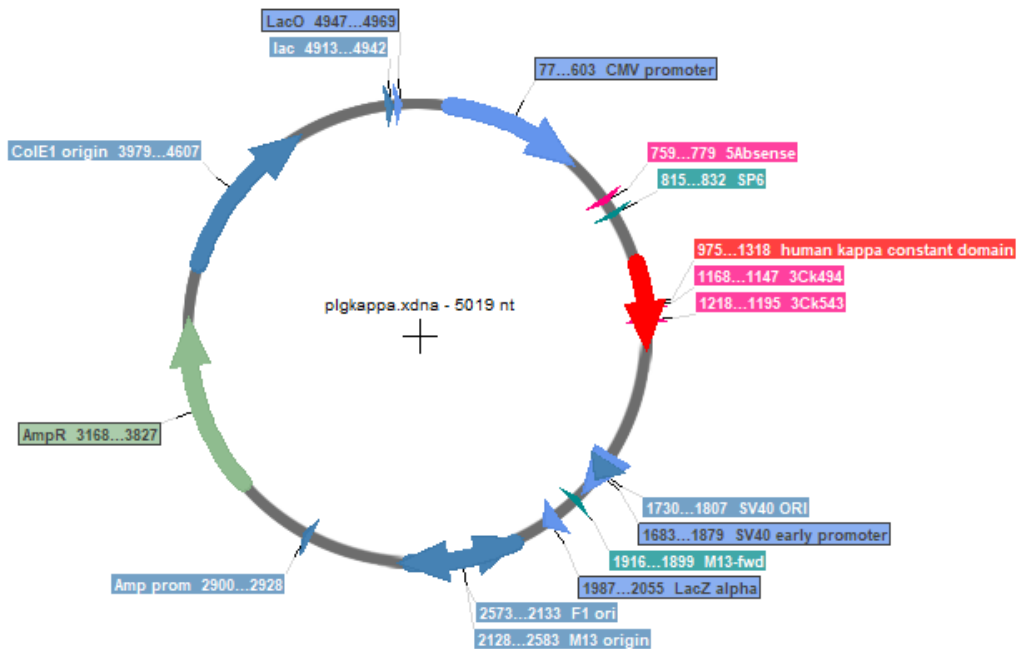
1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Οι βαριές και ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pIgMu, pIgKappa και pIgLambda που περιέχουν τη σταθερή περιοχή της μ3 βαριάς αλυσίδας, της κ ελαφριάς και της λ ελαφριάς αλυσίδας, αντίστοιχα. Ανοδικά της σταθερής περιοχής υπάρχει η αλληλουχία πεπτιδίου-οδηγού από ποντικό (GenBank accession no. DQ407610), μια περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης που περιέχει θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού και ο υποκινητής του κυτταρομεγαλοϊού του ανθρώπου (human cytomegalovirus promoter) που ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων. Τα πλασμίδια διαθέτουν τις περιοχές έναρξης της αντιγραφής pUC ori, SV40 ori και F1 ori. Επιπλέον, οι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, επιτρέποντας τη διάκριση των μετασχηματισμένων βακτηρίων από αυτά που δεν έχουν λάβει πλασμίδιο, καθώς τους παρέχει την ικανότητα ανάπτυξης παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού.

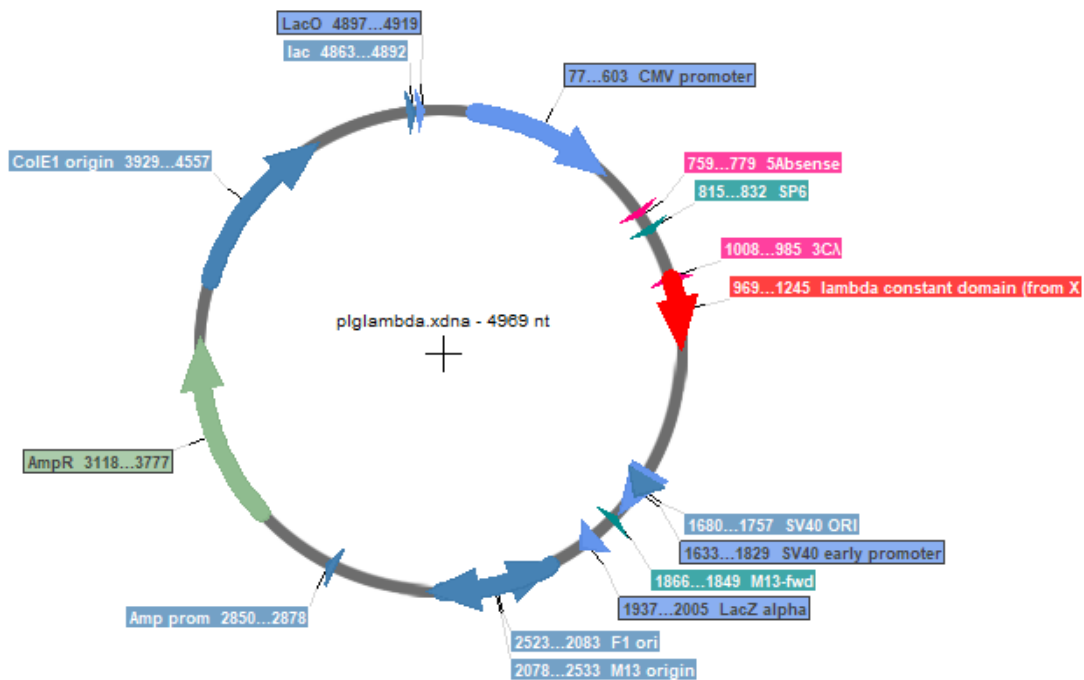
Η μεταβλητή περιοχή των ανοσοσφαιρινών κλωνοποιήθηκε με τη βοήθεια της PCR μεταξύ των θέσεων περιορισμού των ενζύμων AgeI και AfeI για το pIgMu, AgeI και BsiWI για το πλασμίδιο pIgKappa και AgeI και XhoI για το pIglambda (Εικόνες 10, 11 και 12).



Εικόνα 10: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα IgMu.



Εικόνα 11: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα plgkappa.



Εικόνα 12: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pIglambda.

1.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ PCR

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία το cDNA (complementary DNA) της μεταβλητής περιοχής των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών κλωνοποιήθηκε στους πλασμιδιακούς φορείς μετά από ενίσχυση των κατάλληλων τμημάτων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μεταβλητή περιοχή της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pIgMu και pIgKappa ή pIgLambda, αντίστοιχα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μονοκλωνικά αντισώματα παράχθηκαν ως μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες του ανθρώπου με ισότυπο IgM διατηρώντας τον ισότυπο που εξέφραζε ο λευχαιμικός κλώνος.

Για την ενίσχυση μέσω PCR της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας (IGHV/D/J) και της ελαφριάς αλυσίδας (IGKV/J, IGLV/J) των ανοσοσφαιρινών και την εισαγωγή κατάλληλων θέσεων αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα AgeI, AfeI, BsiWI, Sall και XhoI χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ/ IGKV-IGKJ/ IGLV-IGLJ και την προσθήκη των θέσεων περιορισμού. Οι θέσεις περιορισμού εμφανίζονται με υπογράμμιση: (Θέση ενδονουκλεάσης AgeI: XXXX, κοκ).

Εκκινητής	5'-3' Νουκλεοτιδική αλληλουχία
5' AgeI VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
5' AgeI VH1/5/7	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
5' AgeI VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
5' AgeI VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
5' AgeI VH 4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG
5' AgeI Vk1-39/1-16/1-5	CTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGWTGACCCAGTC
5' AgeI Vk3.11	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC
5' AgeI Vk3.15	CTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC
5' AgeI VK4.1	CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC
5' AgeI Vk1-8	CTGCAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC
5' AgeI Vk2.24	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC
5' AgeI Vk 3-20	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACGCAGTCT
5' AgeI Vλ1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
5' AgeI Vλ2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
3' Afel JH1/4/5	GGTTGGAGCGCTTGCACTGCCTGAGGAGACGGTGACCAGG
3' Afel JH6	GGTTGGAGCGCTTGCACTGCCTGAGGAGACGGTGACCGT
3' Afel JH3	GGTTGGAGCGCTTGCACTGCCTGAAGAGACGGTGACCAT
3' Sall JH1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG
3' BsiWI Jk 1/4	GCCACCGTACGTTTGATYTCCACCTTGGTC

3' BsiWI Jk 2	GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC
3' BsiWI Jk 3	GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTC
3'XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

Τα συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης αναγράφονται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5
Μείγμα dNTPs (10mM)	2,5
Ανοδικός εκκινητής	1,5
Καθοδικός εκκινητής	1,5
Νερό	37,5
Pfu DNA πολυμεράση	1
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 3: Συνθήκες αντίδρασης PCR.

Φάσεις αντίδρασης	Θερμοκρασία και χρόνος	
Φάση αποδιάταξης	94°C, 5'	
Φάση υβριδοποίησης	94°C, 30''	} 45 κύκλοι
	58°C IgH/Igκ ή 60 Igλ, 30''	
	72°C, 30''	
Φάση επιμήκυνσης	72°C, 5'	
Αποθήκευση	4°C, ∞	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζης 2%.

1.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR από πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με χρήση του Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, NEB) σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

1. Κοπή του τμήματος του προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζης και μεταφορά του σε eppendorf 1.5 ml.
 2. Προσθήκη τεσσάρων όγκων από το Gel Dissolving Buffer στο eppendorf.
 3. Επώαση του δείγματος στους 50°C για 5-10 λεπτά.
 4. Μεταφορά του δείγματος στη στήλη και εισαγωγή της στήλης σε σωληνάριο συλλογής.
 5. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 16,000 xg και απόρριψη του διηθήματος.
 6. Επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 200 μl από το DNA Wash Buffer.
 7. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 16,000 xg και απόρριψη του διηθήματος.
- Επανάληψη των βημάτων 5-6.
8. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό eppendorf 1.5 ml.
 9. Προσθήκη 30 μl νερού ελεύθερου νουκλεασών και επώαση για 3-4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 10. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 16,000 xg για συλλογή του καθαρισμένου προϊόντος PCR.

1.4 ΠΕΨΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Η πέψη των προϊόντων PCR, καθώς και των φορέων κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για κάθε τύπο βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας. Συγκεκριμένα, τα ζεύγος ενζύμων AgeI-AfeI χρησιμοποιήθηκε για την βαριά αλυσίδα της IgM ανοσοσφαιρίνης. Για τις ελαφριές αλυσίδες κ και λ χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη ενζύμων AgeI-BsiWI και AgeI-XhoI, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα της εταιρείας New England Biolabs (NEB) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συνθήκες της πέψης ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε ενζύμου από 1,5 έως 3 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Για ποσότητα DNA 0,1-2 μg χρησιμοποιήθηκαν 10 έως 20 μονάδες ενζύμου και με τυπικό χρόνο επώασης 2 ωρών στους 37°C. Ακολούθησε

τερματισμός της αντίδρασης με επώαση στους 65 °C για 10 λεπτά και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης και καθαρισμός του με την χρήση του Monarch® DNA Gel Extraction Kit όπως περιγράφηκε παραπάνω.

1.5 ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ DNA ΛΙΓΑΣΗ

Μετά την πέψη, η ενσωμάτωση των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών, στον φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της T4 DNA λιγκάσης (Invitrogen) σε μια αντίδραση με τελικό όγκο 10 μL της οποίας τα συστατικά αναγράφονται στον Πίνακα 7. Ακολούθησε επώαση στους 16°C για 12-16 ώρες.

Πίνακας 7: Συστατικά αντίδρασης λιγάσης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγκάσης (10x)	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης	100-200 ng
T4 DNA λιγκάση	10 Units
DNA προς ένθεση	Ανάλογη ποσότητα για 1:3 αναλογία φορέα:ενθέματος
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	Μέχρι τελικό όγκο 10 μl

1.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των βακτηρίων *E.coli* TOP10 τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) με σκοπό την αυξημένη επιδεκτικότητα στην εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA. Ο μετασχηματισμός έγινε με τη τεχνική του θερμικού σοκ:

1. Ανάμειξη 5 μl προϊόντος λιγκάσης και 50 μl βακτηρίων και επώαση στον πάγο για 20-30 λεπτά.
2. Θερμικό σοκ στους 42°C για 30-40 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση ξανά στον πάγο για 5 λεπτά.

3. Επίστρωση σε τρυβλία με άγαρ, παρουσία αμπικιλίνης ώστε να γίνει η θετική επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων και ολονύχτια επώαση στους 37°C.

Οι βακτηριακές αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία ελέγχθηκαν ως προς την εισαγωγή του ενθέματος στο πλασμίδιο με PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές που υβριδίζουν εκατέρωθεν του ενθέματος στο πλασμίδιο. Ο εκκινητής 5' Absense υβριδίζει ανοδικά του ενθέματος σε όλους τους πλασμιδιακούς φορείς ενώ οι εκκινητές 3' CmCH1, 3' Clambda και 3' Cκ494 υβριδίζουν καθοδικά του ενθέματος στους πλασμιδιακούς φορείς IgMu, pIgKappa και pIgLambda αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, τα συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στους Πίνακες 8,9 και 10.

Πίνακας 8: Αλληλουχίες υβριδοποίησης των εκκινητών.

Εκκινητής	5'-3' αλληλουχία
5' Absense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC
3' Cκ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
3' Cλ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGC
3' CmCH1	GGAATTCTCACAGGAGACGA

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 10x	2
MgCl ₂	1
Μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	1
Ανοδικός εκκινητής (5' Absense)	1
Καθοδικός εκκινητής (3' Cκ494 ή 3' C λάμβδα ή 3' CmCH1)	1

H ₂ O	14
Ταq Πολυμεράση	0,2
Τελικός όγκος	20

Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης PCR.

Φάση αντίδρασης	Θερμοκρασία και χρόνος
Φάση αποδιάταξης	94°C 5'
Φάση υβριδοποίησης	94°C 30''
Φάση επιμήκυνσης	58°C 30''
	72°C 1'
	72°C 10'
Αποθήκευση	4°C, ∞

} 35 κύκλοι

Οι αποικίες που απέδωσαν προϊόν ενίσχυσης PCR του αναμενόμενου μεγέθους (650 bp για τις βαριές αλυσίδες γ1 και μ, 700 bp για την ελαφριά αλυσίδα λ και 590 bp για την ελαφριά αλυσίδα κ) επιλέχθηκαν για να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες με θρεπτικό Lennox LB Broth Base (Invitrogen) τελικού όγκου 20 ml παρουσία 100 μg/ml αμπικιλίνης με ολονύχτια επώαση στους 37°C και στις 250 στροφές.

1.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε με τη βοήθεια του ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου χρήσης:

1. Φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας για 15 λεπτά σε 4000 rpm.
2. Προσθήκη 250 μl του διαλύματος ZymoPURE™ P1 (κόκκινο) και επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος.

3. Μεταφορά σε erpendorf 2ml και προσθήκη 250 μl του διαλύματος ZymoPURE™ P2 , χειροκίνητη ανακίνηση για λύση των βακτηριακών κυττάρων και επώαση για 3 λεπτά.
4. Προσθήκη 250 μl του διαλύματος ZymoPURE™ P3(το οποίο διατηρείται παγωμένο πριν τη χρήση του), χειροκίνητη ανακίνηση μέχρι το μείγμα να αποκτήσει ομοιόμορφο κίτρινο χρώμα και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση σε 16,000 xg για 5 λεπτά.
6. Μεταφορά 600 μl από το υπερκείμενο σε καθαρό Eppendorf 1.5 ml.
7. Προσθήκη 275 μl από το Binding Buffer και χειροκίνητη ανακίνηση.
8. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα σωληνάριο συλλογής των 2 ml και μεταφορά του διαλύματος στη στήλη.
9. Επώαση της στήλης για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση σε 5,000 xg για 1 λεπτό και απόρριψη του διηθήματος.
10. Προσθήκη 800 μl του διαλύματος ZymoPURE™ Wash 1, φυγοκέντρηση σε 5,000 xg για 1 λεπτό και απόρριψη του διηθήματος.
11. Προσθήκη 800 μl του διαλύματος ZymoPURE™ Wash 2, φυγοκέντρηση σε 5,000 xg για 1 λεπτό και απόρριψη του διηθήματος.
12. Επανάληψη του βήματος 11 με 200 μl του διαλύματος ZymoPURE™ Wash 2.
13. Φυγοκέντρηση σε 11,000 xg για 1 λεπτό για στέγνωμα της στήλης.
14. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό erpendorf, προσθήκη 25μl νερού ελεύθερου νουκλεασών στο κέντρο της στήλης, επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000 xg για έκλυση του πλασμιδιακού DNA.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA μετρήθηκε με την βοήθεια της φωτομετρικής τεχνικής Nanodrop.

Ποσότητα από το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για αλληλούχηση με σκοπό την επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης που κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο.

1.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση κατά Sanger από την εταιρεία CEMIA (<https://cemia.eu/>). Η αλληλουχία σε μορφή αρχείου FASTA αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το εργαλείο IMG/VT-QUEST (<http://www.imgt.org>) για να επιβεβαιωθεί η 100% ταυτότητα της αλληλουχίας του ενθέματος με την αλληλουχία της ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται από το λευχαιμικό κλώνο.

1.9 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Οι βακτηριακές αποικίες με το επιβεβαιωμένο από αλληλούχηση κατά Sanger ένθεμα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε 100 ml Lennox LB Broth Base (Invitrogen) παρουσία 100 μg/ml αμπικιλίνης και ολονύχτια επώαση στους 37°C και στις 250 στροφές.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του MACHEREY-NAGEL Endotoxin-free plasmid DNA purification kit (NucleoBond® XtraMidiEF/MaxiEF), σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου χρήσης:

1. Φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας σε 4000 rpm για 15 λεπτά.
2. Προσθήκη 8 ml του διαλύματος RES-EF για επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος.
3. Προσθήκη 8 ml του διαλύματος LYS-EF για λύση των κυττάρων και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Τοποθέτηση της στήλης σε falcon 50ml και εφαρμογή 15 ml διαλύματος EQU-EF περιμετρικά της στήλης για την ενεργοποίησή της.
5. Προσθήκη 8 ml του διαλύματος NEU-EF για ουδετεροποίηση του διαλύματος λύσης και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
6. Ομογενοποίηση με καλή ανακίνηση του μίγματος που εμπεριέχει τα λυμμένα βακτηριακά κύτταρα και μεταφορά του στη στήλη.
7. Προσθήκη 5 ml του διαλύματος πλύσης του φίλτρου FIL-EF. Το διάλυμα πλύσης αφήνεται να διαπεράσει το φίλτρο.

8. Αφαίρεση του φίλτρου από την στήλη.
9. Προσθήκη 35 ml του διαλύματος πλύσης ENDO-EF στην στήλη και στη συνέχεια 15 ml του διαλύματος πλύσης WASH-EF για πλύση της στήλης. Τα διαλύματα πλύσης αφήνονται να διαπεράσουν την στήλη.
10. Μεταφορά τη στήλης σε καθαρό falcon και προσθήκη 5 ml του διαλύματος ELU-EF για έκλουση του πλασμιδιακού DNA.
11. Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση σε 4,500 xg για 15 λεπτά.
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 2 ml διαλύματος 70% αιθανόλης ελεύθερης ενδοτοξινών και φυγοκέντρηση στις 4,500 xg για 15 λεπτά.
13. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 10-15 λεπτά για στέγνωμα του ιζήματος.
14. Επαναιώρηση ιζήματος σε 100 μl νερό ελεύθερου νουκλεασών.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA μετρήθηκε με τη βοήθεια της φωτομετρικής τεχνικής Nanodrop.

Ακολούθησε επανεπιβεβαίωση της αλληλουχίας του ενθέματος με αλληλούχηση κατά Sanger (CEMIA, <https://cemia.eu/>).

2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK293T.

Η ευκαρυωτική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) είναι η HEK293. Τα κύτταρα HEK293 είναι εμβρυϊκά, νεφρικά κύτταρα ανθρώπου με μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων που προσκολλώνται σε γυάλινο ή πλαστικό υπόστρωμα. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αποστειρωμένα τρυβλία καλλιέργειας (100x20 mm), σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) σε κλίβανο επώασης στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο είναι εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum - FBS) και παρουσία 0,1% (v/v) υδατικού διαλύματος των αντιβιοτικών πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη (Gibco) και 15 μg/mL γενταμικίνης (DMEM complete). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων με επίδραση θρυψίνης πραγματοποιείται όταν παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο

70-90% κάλυψη της επιφάνειας ανάπτυξης (περίπου ανά 48 ώρες) υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες ως εξής:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου.
2. Πλύση με 5 ml PBS 1x.
3. Προσθήκη 1 ml θρυψίνης (Gibco) και επώαση στους 37°C για ~5λεπτά ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από το τρυβλίο.
4. Προσθήκη 10 ml θρεπτικού DMEM complete για απενεργοποίηση της θρυψίνης.
5. Επαναιώρηση των κυττάρων με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας και μεταφορά τους σε νέο τρυβλίο, όπου προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού ώστε να επιτευχθεί αραιώση 1:4 - 1:8 ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

2.2 ΚΡΥΟΔΥΑΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK293T

Η κρυοδιατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Φυγοκέντρηση της κυτταρικής καλλιέργειας σε 2000 rpm για 7 λεπτά.
2. Απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύση με 5 ml PBS 1x.
3. Φυγοκέντρηση σε 2000 rpm για 7 λεπτά.
4. Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο DMEM complete.
5. Μέτρηση αριθμού των κυττάρων με την χρήση πλάκας Neubauer
6. Μεταφορά επιθυμητής ποσότητας κυττάρων σε cryovial.
7. Φυγοκέντρηση του cryovial σε 2000 rpm για 7 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
8. Επαναιώρηση σε 1 ml κρυοπροστατευτικού διαλύματος (freezing medium) που περιλαμβάνει 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και 90% FBS (ορός εμβρύου βοός).
9. Ψύξη στους -80°C.

Κατά την απόψυξη των κυττάρων, η ποσότητα 1 ml του cryovial μεταφέρεται σε 15 ml falcon που περιέχει 9 ml θρεπτικό μέσο DMEM και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 7 λεπτά,

απομάκρυνση υπερκείμενου, πλύση με 5 ml PBS 1x, επαναιώρηση σε θρεπτικό μέσο DMEM complete και προσθήκη στο τρυβλίο καλλιέργειας, όπου υπάρχει η επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού μέσου.

2.3 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK293T ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Μια μέρα πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν ώστε να επιτευχθεί 50-70% κάλυψη του τρυβλίου καλλιέργειας διαμέτρου 10 εκ. Το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε 2-3 ώρες πριν τη διαμόλυνση. Για κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τρυβλία και για κάθε τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε συνολική ποσότητα πλασμιδιακού DNA ίση με 10 µg. Η διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA έγινε με τη βοήθεια γραμμικής πολυαιθυλενιμίνης (PEI) μοριακού βάρους 25 kDa. Η πολυαιθυλενιμίνη είναι κατιονικό πολυμερές που διευκολύνει την είσοδο του DNA στα κύτταρα καθώς σχηματίζει θετικά φορτισμένα σύμπλοκα με το DNA που αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες στην επιφάνεια των κυττάρων επιτρέποντας την ενδοκυττάρωσή τους. Για την αποτελεσματική διαμόλυνση των κυττάρων HEK293T χρησιμοποιήθηκε PEI σε αναλογία 3:1 με το πλασμιδιακό DNA ως εξής:

- Θέρμανση του PEI στους 65°C μέχρι να γίνει διαυγές.
- Ανάμιξη 30 µl PEI συγκέντρωσης 1 mg/ml και 0,5 ml optiMEM και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό προστέθηκε στο διάλυμα DNA/optiMEM, ώστε να επιτευχθεί αναλογία PEI προς DNA σε 3:1.
- Ανακίνηση του μίγματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Προσθήκη του μίγματος στην επιφάνεια του κάθε τρυβλίου σταγόνα-σταγόνα.
- Επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 12 με 16 ώρες.
- Αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με DMEM εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά και Nutridoma-SP (Roche) 1x, το οποίο παρέμεινε για περίπου μια εβδομάδα στα τρυβλία χωρίς αλλαγή.

Το Nutridoma-SP χρησιμοποιήθηκε ως συμπλήρωμα του θρεπτικού μέσου αντί του ορού εμβρύου βοός έτσι ώστε να διευκολυνθεί ο επακόλουθος καθαρισμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων από το υπερκείμενο των καλλιέργειών.

2.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Έξι με επτά μέρες μετά τη διαμόλυνση, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση σε 1000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Η συμπύκνωση του υπερκειμένου πραγματοποιήθηκε με χρήση των φίλτρων Millipore® Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Concentrators με μοριακό κατώφλι στα 100 kDa για τις IgM ανοσοσφαιρίνες. Στα δείγματα προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών (ThermoFisher Scientific) και ο αντιβακτηριδιακός παράγοντας αζίδιο του νατρίου (NaN₃) σε τελική συγκέντρωση 0,05% (w/v) για την προστασία και τη διατήρησή τους.

2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η ποσοτικοποίηση των IgM ανοσοσφαιρινών πραγματοποιήθηκε με ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA τύπου Sandwich, χρησιμοποιώντας το Human IgM ELISA development kit της MABTECH. Το πρωτόκολλο περιγράφεται παρακάτω σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

1. Αραίωση του μονοκλωνικού αντισώματος επικάλυψης της πλάκας αντι-IgM σε PBS σε τελική συγκέντρωση 2 µg/ml.
2. Προσθήκη 100 µl σε κάθε πηγαδάκι και ολονύχτια επώαση στους 4-8°C.
3. Δύο πλύσεις με 200 µl PBS ανά πηγαδάκι.
4. Προσθήκη 200 µl PBS 0,05% Tween 20 (PBS-T) που περιέχει 0,1% BSA (διάλυμα επώασης) ανά πηγαδάκι και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να παρεμποδιστούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.
5. Πέντε πλύσεις με PBS-T.
6. Προετοιμασία των δειγμάτων της πρότυπης καμπύλης: χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα IgM που παρέχεται από τον κατασκευαστή σε συγκέντρωση 50µg/ml αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα επώασης.
7. Προσθήκη 100 µl ανά πηγαδάκι των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και των υπό εξέταση μονοκλωνικών αντισωμάτων διαλυμένων επίσης στο διάλυμα επώασης και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πέντε πλύσεις με PBS-T.

9. Προσθήκη 100 μl ανά πηγαδάκι από το δευτερογενές αντίσωμα (αντι-IgM mu chain) το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο την αλκαλική φωσφατάση, αραιωμένα 1:1000 στο διάλυμα επώασης και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Πέντε πλύσεις με PBS-T.
11. Προσθήκη 100 μl ανά πηγαδάκι του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης (pNitrophenyl Phosphate, pNPP, Sigma).
12. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 405 nm σε συσκευή μέτρησης ELx800™ Absorbance Microplate Reader (BioTek).

2.6 ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΥΠΟΥ Western Blot ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Ο έλεγχος της ακεραιότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) ακολουθούμενη από ανοσοανίχνευση τύπου Western Blot.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης, αποτελούμενη από το Resolving gel και το Stacking gel κατασκευάστηκε με χρήση των συστατικών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Τα συστατικά των ρυθμιστικών διαλυμάτων Running Buffer και Transfer Buffer αναφέρονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 11: Συστατικά της πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%.

Resolving gel	Stacking gel
1.90 ml απιονισμένο νερό	1.40 ml απιονισμένο νερό
1.70 ml 30% ακρυλαμίδη	0.33 ml 30% ακρυλαμίδη
1.30 ml 1.5M Tris (pH 8.8)	0.25 ml 1.0M Tris (pH 6.8)
0.05 ml 10% APS	0.02 ml 10% APS
0.05 ml 10% SDS	0.02 ml 10% SDS
0.002 ml TEMED	0.002 ml TEMED
Τελικός όγκος	Τελικός όγκος
5 ml	2 ml

Πίνακας 12: Συστατικά των ρυθμιστικών διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης (Running buffer) και μεταφοράς (Transfer buffer).

Running buffer (1L)	Transfer buffer (1L)
3 gr TRIS	3 gr TRIS
14.4 gr γλυκίνη	14.4 gr γλυκίνη
1 gr SDS/10 ml 10% SDS	200 ml μεθανόλη
Απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1L	Απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1L

Οι ανοσοσφαιρίνες φορτώθηκαν στα πηγαδάκια της πηκτής και ηλεκτροφορήθηκαν παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer) στα 200V για περίπου 2 ώρες στη συσκευή Invitrogen X Cell SureLock device.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη PVDF επώαστηκε σε μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθησε η ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer). Από την κάθοδο προς την άνοδο τοποθετήθηκαν: τρία σφουγγάρια, χαρτί Whatman, πηκτή πολυακρυλαμίδης, μεμβράνη PVDF, χαρτί Whatman, τρία σφουγγάρια και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο παρουσία Transferbuffer στα 35 volt για περίπου 2,5 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση της μεμβράνης με επώαση σε διάλυμα Ponceau S, ώσπου να φανούν οι ζώνες των πρωτεϊνών και έπειτα πραγματοποιήθηκε πλύσιμο και παρεμπόδιση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με επώαση της μεμβράνης σε 5% γάλα αραιωμένο σε PBS-0,01% Tween για 45 λεπτά. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS-0,01% Tween και επώαστηκε με το αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης που μελετάται (anti-human IgM, abcam) συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση ρεπανίου, (horseradish peroxidase, HRP) αραιωμένο 1:20000 σε 5% γάλα για 40 λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης με PBS-0,01% Tween και επώασή της με το υπόστρωμα του ενζύμου [Luminata™Classico Western HRP Substrate (Miliopore)] και εμφάνιση του σήματος στη συσκευή GENE Genome BIOIMAGING®.

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ mAbs ΜΕ ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

Τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που παράχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την αναγνώριση ενός εύρους αυτοαντιγόνων και μικροβιακών αντιγόνων. Στο πάνελ της παρούσας μελέτης περιλαμβάνονται το απτένιο τρινιτροφαινόλη (TNP), ο δείκτης οξειδωσης MDA (μαλονδϋαλδεϋδη)-BSA και τα εξής αυτοαντιγόνα: δίκλωνο DNA, ακτίνη, μυοσίνη, θυρεοσφαιρίνη, πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς, καρβονική ανυδράση, θραύσμα F(ab')₂-από ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη IgG. Επίσης ελέγχθηκε η αναγνώριση των εξής παθογόνων: κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus, CMV), ιός Epstein-Bar (Epstein-Bar virus, EBV), ιός Influenza A (Influenza A virus), μυκόπλασμα πνευμονίας (*Mycoplasma pneumoniae*), ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) και ο μύκητας *Candida albicans*.

3.1 IN-HOUSE ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ELISA

Για τον έλεγχο των αυτοαντιγόνων, του απτενίου TNP και του δείκτη οξειδωσης MDA πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης in-house ELISA κατά τις οποίες τα προς εξέταση mAbs χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτογενή αντισώματα. Για τον έλεγχο της εγκυρότητας των δοκιμασιών ELISA ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν mAbs προερχόμενα από άλλου τύπου λεμφώματα: αυτά τα mAbs έχουν παραχθεί στο πλαίσιο άλλων μελετών στο εργαστήριο και έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζουν ένα ή περισσότερα από τα αντιγόνα του πάνελ. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Κάλυψη της πλάκας υψηλής ικανότητας σύνδεσης (Costar 3361) με 100 μl του κάθε αντιγόνου σε συγκέντρωση 2-5 μg/ml διαλυμένο σε PBS 1x και ολονύχτια επώαση στους 4°C.
2. Πλύντε φορές πλύση με 200 μl PBS 0,1% Tween 20.
3. Προσθήκη 200 μl PBS-0,1% Tween 20-1,5% BSA σε κάθε πηγαδάκι για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες.
4. Πέντε φορές πλύση με 200 μl PBS 0,1% Tween 20.
5. Προσθήκη σε κάθε ξεχωριστό πηγαδάκι 100 μl του κάθε εξεταζόμενου πρωτογενούς αντισώματος σε συγκέντρωση 20 μg/ml αραιωμένου σε PBS 0,1% Tween 20 1% BSA και ολονύχτια επώαση στους 4°C.
6. Πέντε φορές πλύση με 200 μl PBS 0,1% Tween 20.

7. Προσθήκη 100 μl από το δευτερογενές anti-humanIgM αντίσωμα συζευγμένο με την αλκαλική φωσφατάση (ALP) ή υπεροξειδάση ρεπανίου (HRP) σε κατάλληλη αραιώση PBS-0,1% Tween-1% BSA και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πέντε φορές πλύση με 200 μl PBS 0,1% Tween 20.
9. Προσθήκη 50 μl υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης (pNitrophenyl Phosphate, pNPP, Sigma) ή της υπεροξειδάσης (3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνη, TMB) και επώαση για 10-30 λεπτά στο σκοτάδι. Στην περίπτωση χρήσης δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση ρεπανίου πραγματοποιήθηκε τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη 50 μl 0,18 M H₂SO₄ (διάλυμα αναστολής).
10. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OD) στα 405 nm ή στα 450 nm (ανάλογα με το υπόστρωμα της αντίδρασης: αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση αντίστοιχα) χρησιμοποιώντας το ELx800™ Absorbance Microplate Reader (BioTek).

Ως κατώφλι ελάχιστης θετικότητας για τις in-house δοκιμασίες ELISA ορίστηκε η οπτική απορρόφηση OD = 0.200. Τα αντισώματα χαρακτηρίστηκαν ως προς την αναγνώριση κάθε αντιγόνου του πάνελ ως αρνητικά, ασθενώς θετικά, θετικά ή έντονα με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Χαρακτηρισμός των ΣΛΟΖ αντισωμάτων ως προς την αντιγονική τους αναγνώρισης στις in-house δοκιμασίες ELISA.

Χαρακτηρισμός	Όρια οπτικής απορρόφησης
Αρνητικά	OD < 0.200
Ασθενώς θετικά	0.200 < OD < 0.500
Θετικά	0.500 < OD < 1.000
Έντονα θετικά	OD > 1.000

3.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ELISA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ kit

1. Η αναγνώριση των μικροβίων ελέγχθηκε με τη χρήση εμπορικών kit ELISA (IBL International kit) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή κι όπως περιγράφεται παρακάτω. Επώαση της επικαλυμμένης με το αντιγόνο πλάκας ELISA σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
2. Προσθήκη σε ξεχωριστά πηγαδάκια 100 μl (α) από το κάθε εξεταζόμενο πρωτογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 30 μg/ml (αραιωμένου με το διάλυμα αραιώσης που παρέχεται από το kit) και (β) από το κάθε control που παρέχεται από το kit. Επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.
3. Τρεις πλύσεις με 300 μl από το διάλυμα πλύσης.
4. Προσθήκη 100 μl αντι-IgM δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση ρεπανίου (HRP) σε κάθε πηγαδάκι και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τρεις πλύσεις με 300 μl από το διάλυμα πλύσης.
6. Προσθήκη 100 μl υποστρώματος υπεροξειδάσης (TMB) σε κάθε πηγαδάκι και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
7. Προσθήκη 100 μl διαλύματος αναστολής σε κάθε πηγαδάκι.
8. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm χρησιμοποιώντας το ELx800™ Absorbance Microplate Reader (BioTek).

Ως κατώφλι της ελάχιστης θετικότητας για τις μικροβιακές δοκιμασίες ELISA ορίστηκε η μισή τιμή της οπτικής απορρόφησης του cut-off control. Τα αντισώματα χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά, ασθενώς θετικά, θετικά ή έντονα θετικά ως προς την αντιγονική αναγνώριση, βάσει της οπτικής τους απορρόφησης όπως περιγράφεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Χαρακτηρισμός των ΣΛΟΖ αντισωμάτων ως προς την αναγνώριση μικροβίων στις εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ELISA.

Συμβολισμός	Όρια οπτικής απορρόφησης
Αρνητικά	$OD < OD \text{ του cut-off κοντρόλ} * 0,5$
Ασθενώς θετικά	$OD \text{ του cut-off κοντρόλ} * 0,5 < OD < OD \text{ του cut-off κοντρόλ}$

Θετικά	OD του cut-off κοντρόλ <OD<OD του θετικού κοντρόλ
Έντονα θετικά	OD>OD του θετικού κοντρόλ

4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

4.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HS-5

Ένας ακόμη κυτταρικός τύπος που καλλιεργήθηκε με σκοπό την εξέταση της αντιγονικότητάς τους από τα mAbs που παράχθηκαν είναι η ευκαρυωτική σειρά των HS-5 κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν ανθρώπινη κυτταρική σειρά στρωματικών κυττάρων με μορφολογία ινοβλαστών που προσκολλώνται σε γυάλινο ή πλαστικό υπόστρωμα. Τα κύτταρα καλλιεργούνται ακριβώς όπως τα HEK κύτταρα (κεφάλαιο 2.1), με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS) και παρουσία 0,1% (v/v) υδατικού διαλύματος των αντιβιοτικών πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη (Gibco) και 15 µg/mL γενταμικίνης (RPMI complete).

4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων HEK293 και των HS-5 από τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα ελέγχθηκε με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Ως θετικές περιπτώσεις θεωρήθηκαν εκείνες που ξεπερνούσαν το 10% του ποσοστού αναγνώρισης του συνόλου των κυττάρων.

1. Τοποθέτηση 25×10^4 των κυττάρων της καλλιέργειας και μοίρασμα σε κάθε flow tube από αριθμό κυττάρων.
2. Πλύση με 400 µl PBS 1x – FBS και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 2000 rpm.
3. Απόρριψη υπερκείμενου με απόχυση
4. Προσθήκη των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων σε συγκέντρωση 25 µg/ml και επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι.
5. Πλύση με 400 µl PBS 1x – FBS και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 2000 rpm.

6. Απόρριψη υπερκείμενου, προσθήκη 10 μl δευτερογενούς PE αντισώματος (PE Mouse Anti-Human Igκ Light chain ή PE Mouse Anti-Human Igλ Light chain, BD) και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι.
7. Πλύση με 500 μl PBS 1x και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 2000rpm.
8. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 400 μl PBS 1x.
9. Προσδιορισμός του ποσοστού των PE θετικών στον κυτταρομετρητή ροής.

5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση και γραφική απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Excel 2007 της Microsoft και του λογισμικού Graphpad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA).

Για τα ποσοτικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση. Οι συγκριτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με δοκιμές t-test για ανεξάρτητα δείγματα (μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney). Για την ανάλυση συσχέτισης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Παράχθηκαν πλασμίδια που έφεραν τα ανασυνδυασμένα γονίδια IGHV-IGHD-IGHJ (μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης) ή τα ανασυνδυασμένα γονίδια IGLV-IGVJ (μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης) από 14 ΣΛΟΖ περιπτώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pIgMu που φέρει τη σταθερή περιοχή της μ3 βαριάς αλυσίδας του ανθρώπου ώστε να διατηρηθεί ο IgM ισότυπος της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται από τα κλωνικά κύτταρα του λεμφώματος των ασθενών. Αντίστοιχα, τα γονίδια της ελαφριάς αλυσίδας κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν την σταθερή περιοχή της κάππα ή λάμδα ελαφριάς αλυσίδας του ανθρώπου, ανάλογα με τον ισότυπο της ελαφριάς αλυσίδας που εκφράζει ο λευχαιμικός κλώνος του κάθε ασθενούς. Οι αλληλουχίες των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που κλωνοποιήθηκαν στους πλασμιδιακούς φορείς επιβεβαιώθηκαν ως προς την ταυτότητά τους με τις αλληλουχίες της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται από τον λευχαιμικό κλώνο με αλληλούχηση κατά Sanger και ανάλυση της αλληλουχίας με την χρήση του εργαλείου IMGT/V-QUEST (Εικόνες 13A, B).

A

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV1-2*04 F	score = 1435	identity = 100.00% (288/288 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ4*02 F	score = 240	identity = 100.00% (48/48 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD3-22*01 F	D-REGION is in reading frame 2	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.11]	[8.8.16]	CARDQGGGSGYHYFDYW

B

Result summary:	Productive IGK rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGKV3-20*01 F	score = 1351	identity = 97.87% (276/282 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGKJ1*01 F	score = 163	identity = 92.11% (35/38 nt)
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[26.17.36.10]	[7.3.9]	CQQYGNSPGTF

Εικόνα 13: Επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του επιθυμητού γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα με τη χρήση του εργαλείου IMGT/V-QUEST για το πλασμίδιο που φέρει (A) τη βαριά και (B) την ελαφριά αλυσίδα του ασθενούς P19994.

Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε περιπτώσεις με τα πιο συχνά γονίδια IGHV και IGKV γονίδια στο ΣΛΟΖ, συγκεκριμένα τα IGHV1-2, IGHV4-34, IGHV3-23, IGKV3-20, IGKV4-1, IGKV1-5 και IGKV1-8^{55,58}. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και ο ισότυπος των ανοσοσφαιρινών παρουσιάζονται στους Πίνακες 15 και 16.

Οι περιπτώσεις του ΣΛΟΖ κατατάχθηκαν με βάση το φορτίο των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων σύμφωνα με τη δημοσίευση Bikos et. al⁵⁶: α) αμετάλλακτες περιπτώσεις (100% ταυτότητα με το πλησιέστερο IGHV γονίδιο), β) ελάχιστα μεταλλαγμένες περιπτώσεις (97-99,9% ταυτότητα με το πλησιέστερο IGHV γονίδιο) και γ) μεταλλαγμένες περιπτώσεις (<97% ταυτότητα με το πλησιέστερο IGHV γονίδιο), όπως φαίνεται στους Πίνακες 15 και 16.

Πίνακας 15: Οι αλληλουχίες των IGHV-IGHD-IGHJ γονιδίων των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Περίπτωση	Ισότυπος	IGHV	IGHV νουκλεο- τιδική ταυτότητα	IGHD	IGHJ	HCDR3 αμινοξική αλληλουχία
P19994	IgM/κ	1-2*04	100.00%	3-22*01	4*02	CARDQGGGSGYHYFDYW
P411	IgM/κ	1-2*04	97.57%	3-3*01	5*02	CARGGRITIFGVLMGRENWFDPW
P13836	IgM/λ	1-2*04	94.10%	3-10*01	4*02	CAKDRARTYYGSGSYNRPQYFDYW
P23776	IgM/λ	1-2*04	98.96%	3-3*01	5*02	CARGPRITIFGVVIGRGTTLDPW
P8761	IgM/κ	1-2*04	100.00%	3-3*01	5*02	CARGGRASVFGVVLIGDPIFGPW
P11573	IgM/κ	3-15*07	95.58%	3-22*01	4*02	CTTSSDPRDYW
P7427	IgM/κ	3-21*01	100.00%	6-13*01	3*02	CARDLIAAAPGAFDIW
P15740	IgM/κ	3-21*01	98.61%	3-10*01	6*02	CARDHFGSGSYGIRSYGMDVW
P2120	IgM/κ	3-23*01	97.92%	4-17*01	4*02	CAKKGDAQPYGDNLYYFDYW
P11388	IgM/κ	3-23*01	98.61%	3-3*01	4*02	CAKNSKSYDFWSGYGYPYFDYW
P5729	IgM/κ	3-23*01	100.00%	6-19*01	4*02	CAKSPVTGGGQWLDEYYFDYW
P4366	IgM/κ	3-53*01	100.00%	3-3*01	5*02	CARSPYYDFWSGYTGGWFDPW

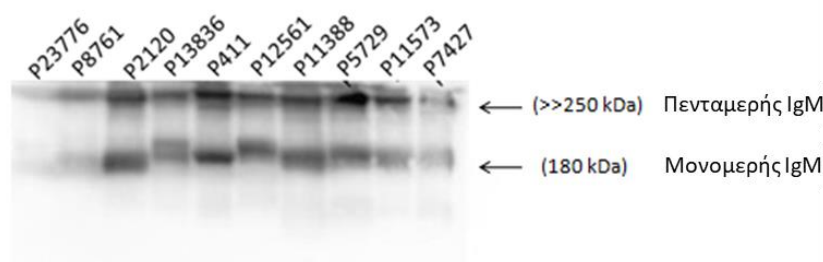
P8257	IgM/κ	4-34*01	100.00%	2-21*01	6*03	CARVWGGGLVGSYFYSGYYYYYMDVW
P20463	IgM/κ	4-61*02	98.63%	3-9*01	6*03	CARSAPQSYDILTGYYRYYYYYLDVW

Πίνακας 16: Οι αλληλουχίες των IGKV-IGKJ/IGLV-IGLJ γονιδίων των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Περίπτωση	Ισοτύπος	IGKV/LV	IGK/LV νουκλεο- τιδική ταυτότητα	IGKJ/LJ	VK/VL CDR3 αμινοξική αλληλουχία
P8761	IgM/κ	1-8*01	99.64%	1*01	CQQYYSYPRTF
P15740	IgM/κ	1-8*01	98.92%	2*01	CQQYYSYPYTF
P19994	IgM/κ	1-39*01	100.00%	2*01	CQQSYSTPPDTF
P23776	IgM/λ	1-40*01	98.26%	3*02	CQSYDSSLSGSVF
P13836	IgM/λ	2-11*01	96.18%	2*01	CCSYAGFYTSKAF
P11388	IgM/κ	3-11*02	99.28%	1*01	CQQRSNWQWTF
P8257	IgM/κ	3-11*01	100.00%	2*04	CQQRSNWPPVCSF
P4366	IgM/κ	3-15*01	99.64%	1*01	CQQYNNWPETF
P5729	IgM/κ	3-15*01	100.00%	1*01	CQQYNNWPPTF
P411	IgM/κ	3-20*01	97.52%	3*01	CQQYGNPPTF
P20463	IgM/κ	3-20*01	98.58%	2*01	CQQYGSSPDTF
P2120	IgM/κ	4-1*01	99.66%	3*01	CQQYYSTPFTF
P7427	IgM/κ	4-1*01	99.33%	3*01	CQQYYSTPFTF
P11573	IgM/κ	4-1*01	98.32%	1*01	CQQYHGTPPFVTF

Στη συνέχεια, τα πλασμίδια με τα κλωνοποιημένα γονίδια των ανοσοσφαιρινών χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK293T και την έκκριση των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) ισotypes IgM στο υπερκείμενο της κυτταρικής

καλλιέργειας. Το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε και η συγκέντρωση των αντισωμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής ELISA: το εύρος της συγκέντρωσης των mAbs μετά την συμπύκνωση κυμάνθηκε μεταξύ 70 µg/ml και 400 µg/ml. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-PAGE ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση τύπου Western επιβεβαίωσε την ακεραιότητα των mAbs (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Παράδειγμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης 10 συμπυκνωμένων mAbs κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση Western που πραγματοποιήθηκε με goat anti-Human IgM συζευγμένο με HRP (abcam).

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ mAbs

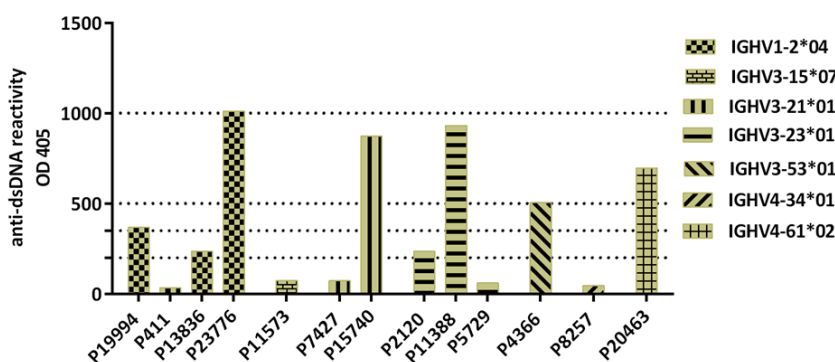
Τα ΣΛΟΖ ανασυνδυασμένα mAbs εξετάστηκαν με τη χρήση δοκιμασιών ELISA για την αναγνώριση ποικίλων αντιγόνων που έχουν αναφερθεί ως συχνοί αντιγονικοί στόχοι των φυσικών (αυτό)αντισωμάτων αλλά και παθολογικών (αυτό)αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένων αντισωμάτων από ασθενείς με άλλες κακοήθεις νόσους των Β λεμφοκυττάρων όπως η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). Στις αναλύσεις ελέγχθηκαν και οι διαφορές στο πρότυπο αντιγονικής αναγνώρισης μεταξύ mAbs που εκφράζουν συγκεκριμένα IGHV γονίδια και διερευνήθηκε τυχόν συσχέτιση του προτύπου αντιγονικής αναγνώρισης με το φορτίο μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Για το σκοπό αυτό, και λόγω του χαμηλού αριθμού περιπτώσεων με μεγάλο μεταλλακτικό φορτίο (μεταλλαγμένες περιπτώσεις, <97% ταυτότητα με το πλησιέστερο γονίδιο), οι ελάχιστα μεταλλαγμένες περιπτώσεις κατηγοριοποιήθηκαν μαζί με τις μεταλλαγμένες (για λόγους συντομίας, στις παρακάτω αναλύσεις θα αναφέρονται συνολικά ως μεταλλαγμένες περιπτώσεις) και συγκρίθηκαν με τις αμετάλλακτες περιπτώσεις.

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΔΙΚΛΩΝΟΥ DNA

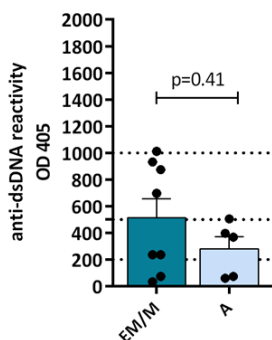
Δεκατρία mAbs εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν δίκλωνο DNA (dsDNA). Εννέα από τα 13 (69%) mAbs πέρασαν το κατώφλι θετικότητας. Τρία/4 (75%) IGHV1-2*04 mAbs έδειξαν αντι-DNA δράση: το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P23776 ήταν έντονα θετικό, το «αμετάλλακτο» P19994 και το «μεταλλαγμένο» P13836 πέρασαν οριακά το κατώφλι θετικότητας,

ενώ το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P411 δεν αναγνώρισε το dsDNA. Επίσης, 2/3 IGHV3-23*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και P2120 και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P15740 αναγνώρισαν το dsDNA. Το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) και το «αμετάλλακτο» P4366 (IGHV3-53*01) ήταν επίσης θετικά, το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) ήταν ασθενώς θετικό, ενώ το «μεταλλαγμένο» P11573 (IGHV3-15*07) δεν αναγνώρισε το δίκλωνο DNA (Εικόνα 15A). Μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων mAbs, τα μεταλλαγμένα σημείωσαν ελαφρώς ισχυρότερη αναγνώριση του αντιγόνου όπως φαίνεται από την υψηλότερη μέση τιμή της OD. Οι διαφορές ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 15B).

A



B

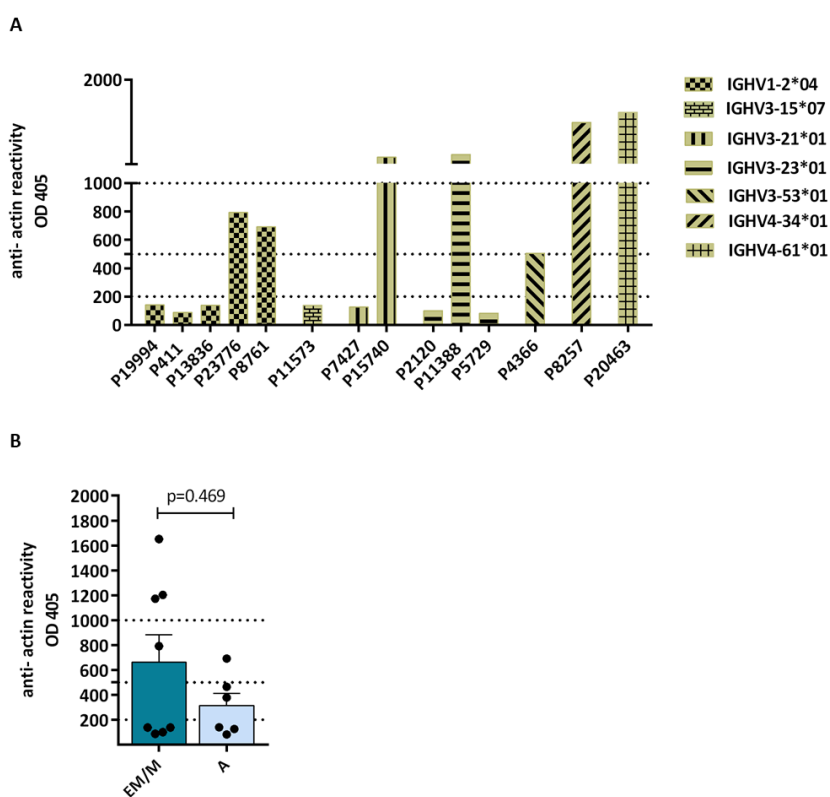


Εικόνα 15: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του δίκλωνου DNA: A) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. B) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .41, στατιστικά μη σημαντικό.

2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ

Εξετάστηκαν 14 mAbs ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν την ακτίνη. Επτά/14 (50%) κρίθηκαν θετικά. Δύο/5 IGHV1-2*04 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P23776 και το

«αμετάλλακτο» P8761 ήταν θετικά, σε αντίθεση με το «αμετάλλακτο» P19994, το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P411 και το «μεταλλαγμένο» P13836 που δεν ξεπέρασαν το κατώφλι ελάχιστης θετικότητας. Ένα/3 IGHV3-23*01 mAbs, το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P11388 και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P15740 παρουσίασαν ισχυρή σύνδεση. Το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) ήταν έντονα θετικά ενώ το «αμετάλλακτο» P4366 mAb (IGHV3-53*01) ήταν οριακά θετικό. Τέλος, το «μεταλλαγμένο» P11573 (IGHV3-15*07) δεν αναγνώρισε την ακτίνη (Εικόνα 16A). Συνολικά, τα μεταλλαγμένα mAbs αναγνώρισαν ελαφρώς ισχυρότερα το αντιγόνο χωρίς ωστόσο οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 16B).



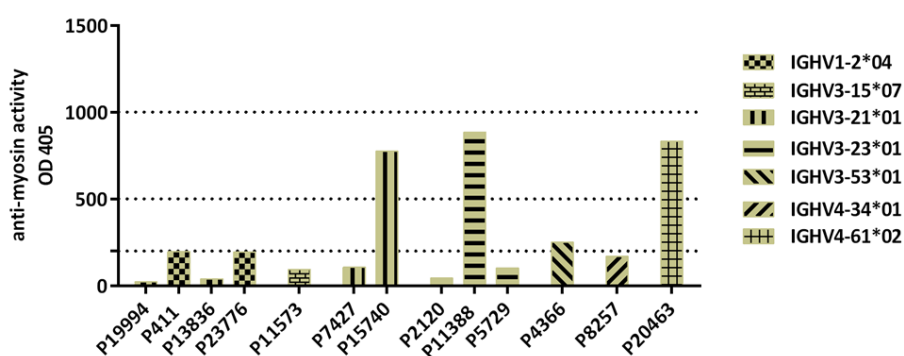
Εικόνα 16: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι της ακτίνης: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. $P= .469$, στατιστικά μη σημαντικό.

2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ

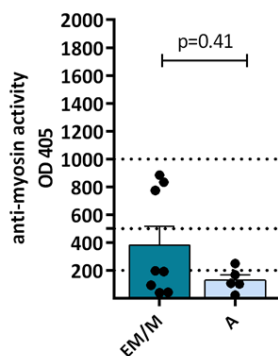
Τέσσερα από τα 13 (30,7%) mAbs παρουσίασαν σύνδεση με τη μυοσίνη. Αναλυτικότερα, κανένα από τα IGHV1-2*04 mAbs δεν παρουσίασε σύνδεση που να ξεπερνά το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας.

Από την άλλη, 1/3 IGHV3-23*01 mAbs και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και P15740, αντίστοιχα, αναγνώρισαν τη μυοσίνη. Από τα υπόλοιπα mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) ήταν θετικό, ενώ το «αμετάλλακτο» P4366 (IGHV3-23*01) πέρασε οριακά το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας. Τέλος, το «μεταλλαγμένο» P11573 (IGHV3-15*07) και το αμετάλλακτο P8257 (IGHV4-34*01) δεν αναγνώρισαν τη μυοσίνη (Εικόνα 17A). Τα μεταλλαγμένα mAbs αναγνώρισαν ελαφρώς ισχυρότερα την μυοσίνη χωρίς ωστόσο οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 17B).

A



B



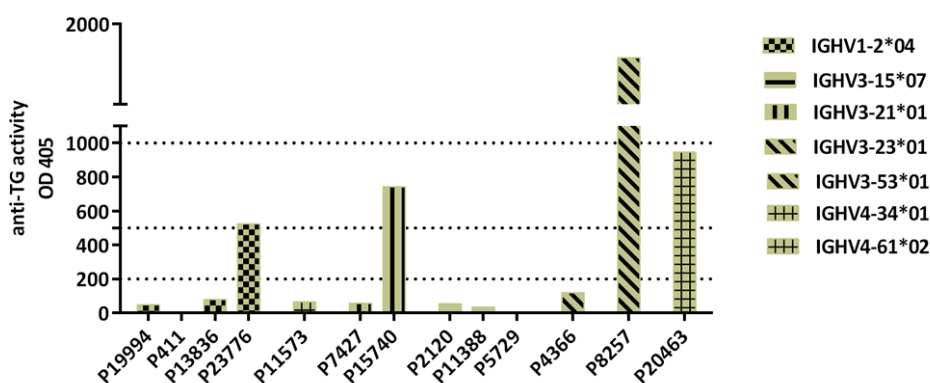
Εικόνα 17: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι της μυοσίνης: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, Α: Αμετάλλακτα mAbs. P= .41, στατιστικά μη σημαντικό.

2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

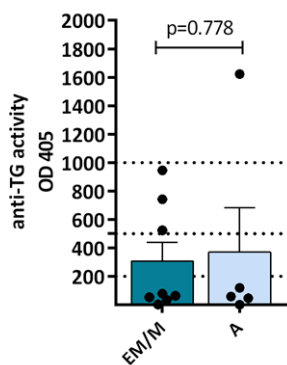
Εξετάστηκαν 13 mAbs ως προς την ικανότητά τους να αντιδρούν με τη θυρεοσφαιρίνη (TG). Τέσσερα/13 (30,7%) πέρασαν το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας. Ένα/4 IGHV1-2*04 mAbs, το

«ελάχιστα μεταλλαγμένο» P23776, αναγνώρισε την TG, ενώ κανένα από τα 3 IGHV3-23 mAbs που εξετάστηκαν δεν αντέδρασε με το αντιγόνο. Ένα/2 IGHV3-21*01 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P15740 εμφάνισε σύνδεση με το αντιγόνο. Από τα υπόλοιπα mAbs, το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) εμφάνισαν αντι-TG δράση, με το πρώτο να είναι έντονα θετικό και δεύτερο θετικό (Εικόνα 18Α). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το αντιγόνο μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων περιπτώσεων (Εικόνα 18Β).

A



B

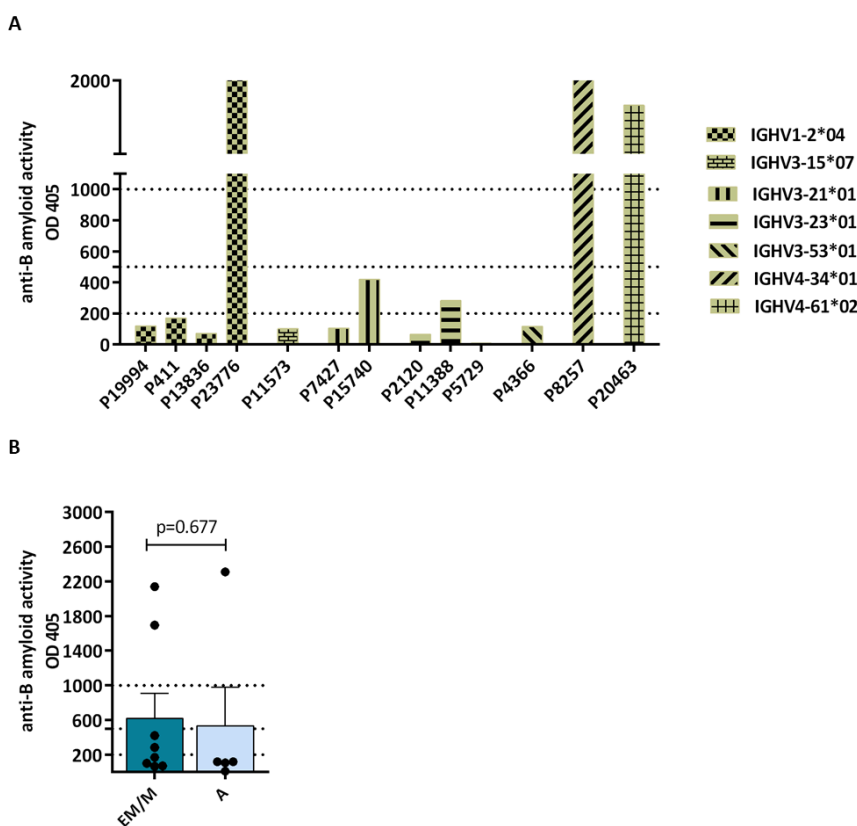


Εικόνα 18: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι θυρεοσφαιρίνης: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .778, στατιστικά μη σημαντικό.

2.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ Β-ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ

Εξετάστηκε η αντιδραστικότητα 13 mAbs έναντι της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς (Αβ). Πέντε/13 περιπτώσεις (38%) αναγνώρισαν την πρωτεΐνη. Ένα/4 IGHV1-2*04 mAbs, το «ελάχιστα

μεταλλαγμένο» P23776 αναγνώρισε έντονα το Αβ. Επίσης, 1/3 IGHV3-23*01 και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και P15740 αντίστοιχα, αντέδρασαν με το αντιγόνο. Από τα υπόλοιπα mAbs, τη σημαντικότερη αντιδραστικότητα παρουσίασαν το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) που κρίθηκαν ως έντονα θετικά. Τέλος, το «αμετάλλακτο» IGHV3-23*01 mAb P4366 και το «μεταλλαγμένο» IGHV3-15*07 mAb P11573 δεν εμφάνισαν αξιόλογη αντιδραστικότητα (Εικόνα 19Α). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το αντιγόνο μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων mAbs (Εικόνα 19Β).



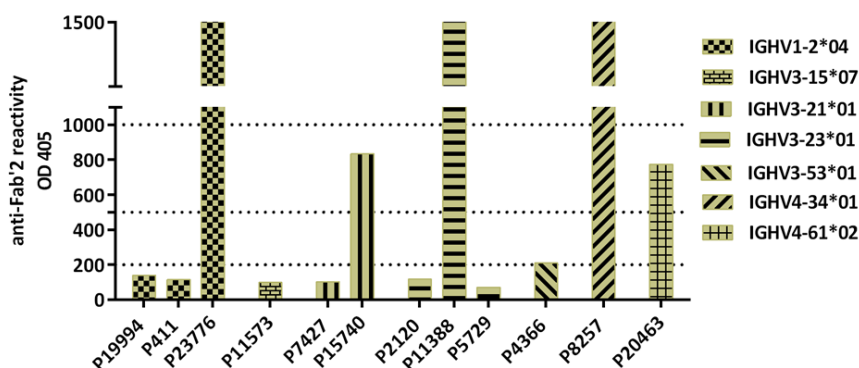
Εικόνα 19: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του β-αμυλοειδούς: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .677, στατιστικά μη σημαντικό.

2.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ Fab'2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

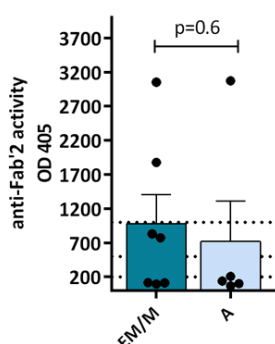
Δώδεκα mAbs εξετάστηκαν για την αντιδραστικότητά τους έναντι του τμήματος Fab'2 ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Έξι/12 (50%) mAbs ξεπέρασαν το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας. Ένα/3 IGHV1-

2*04 mAbs, το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P23776, 1/3 IGHV3-23*01 mAbs, το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P11388 και το «αμετάλλακτο» P8257 mAb (IGHV4-34*01) ήταν έντονα θετικά. Τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» mAbs P15740 (IGHV3-21*01) και P20463 (IGHV4-61*02) ήταν θετικά ενώ το «αμετάλλακτο» P4366 mAb (IGHV3-53*01) ήταν ασθενώς θετικό (Εικόνα 20A). Το μεταλλακτικό φορτίο των IGHV γονιδίων δεν επηρέασε σημαντικά την ισχύ πρόσδεσης στο αντιγόνο (Εικόνα 20B).

A



B



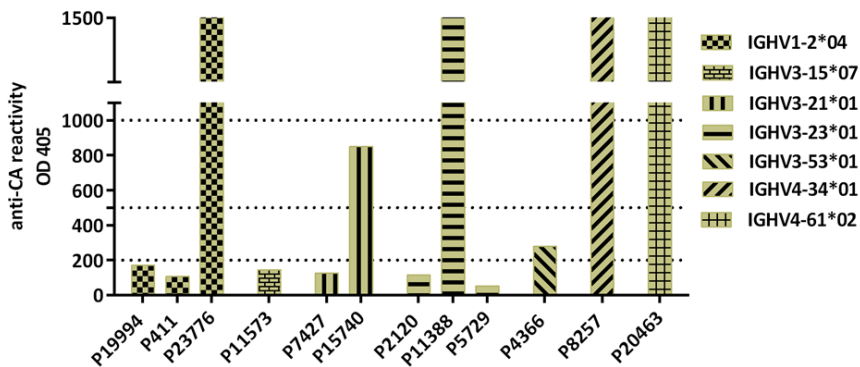
Εικόνα 20: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του δίκλωνου του τμήματος Fab'2 ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης: A) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. B) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P=.6, στατιστικά μη σημαντικό.

2.7 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΝΙΚΗΣ ΑΝΥΔΡΑΣΗΣ

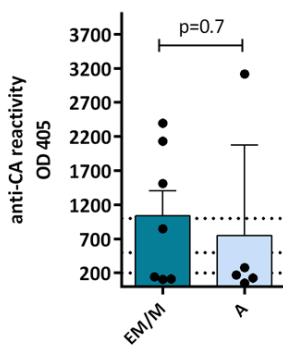
Δώδεκα mAbs ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν την καρβονική ανυδράση (CA). Έξι/12 (50%) mAbs πέρασαν το κατώφλι θετικότητας. Ένα/3 IGHV1-2*04 mAbs και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P23776 και P11388 αντίστοιχα ήταν έντονα θετικά. Επίσης 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P15740 αντίστοιχα έδειξαν θετική αντι-CA δράση. Έντονα θετικά ήταν και το «αμετάλλακτο» P8257 mAb (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P20463 mAb (IGHV4-61*02). Το «αμετάλλακτο» P4366 mAb (IGHV3-

53*01) ήταν ασθενώς θετικό (Εικόνα 21A). Μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων mAbs δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης στο αντιγόνο (Εικόνα 21B).

A



B

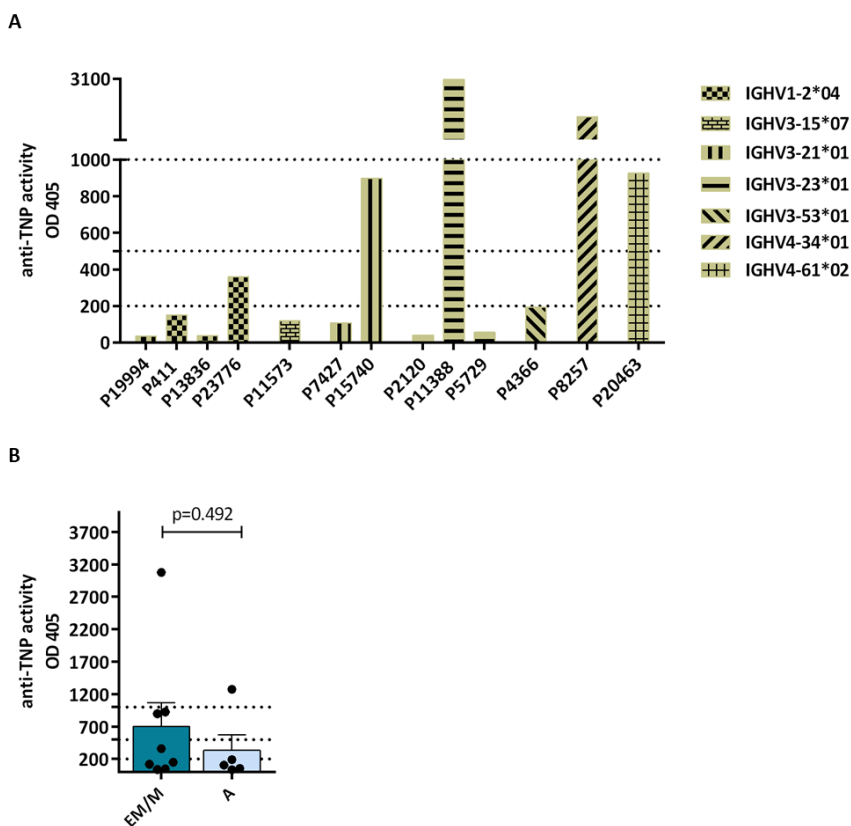


Εικόνα 21: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι της καρβονικής ανυδράσης: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .7, στατιστικά μη σημαντικό.

2.8 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΑΠΤΕΝΙΟΥ Tri-Nitro-Phenyl

Εξετάστηκαν 13 mAbs ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν το απτένιο TNP. Πέντε/13 περιπτώσεις (38,4%) ήταν θετικές. Ένα/4 IGHV1-2*04 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P23776, εμφάνισε ασθενή σύνδεση με το αντιγόνο. Από τα 3 IGHV3-23*01 mAbs που εξετάστηκαν, μόνο το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P11388 αντέδρασε με το TNP (έντονα θετικό). Ένα/2 IGHV3-21*01 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P15740 έδειξε επίσης θετικότητα. Το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) κρίθηκε ως έντονα θετικό και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) ως θετικό ενώ το «μεταλλαγμένο» P11573 (IGHV3-15*07) δεν συνδέθηκε στο TNP (Εικόνα 22A). Δεν υπήρξαν

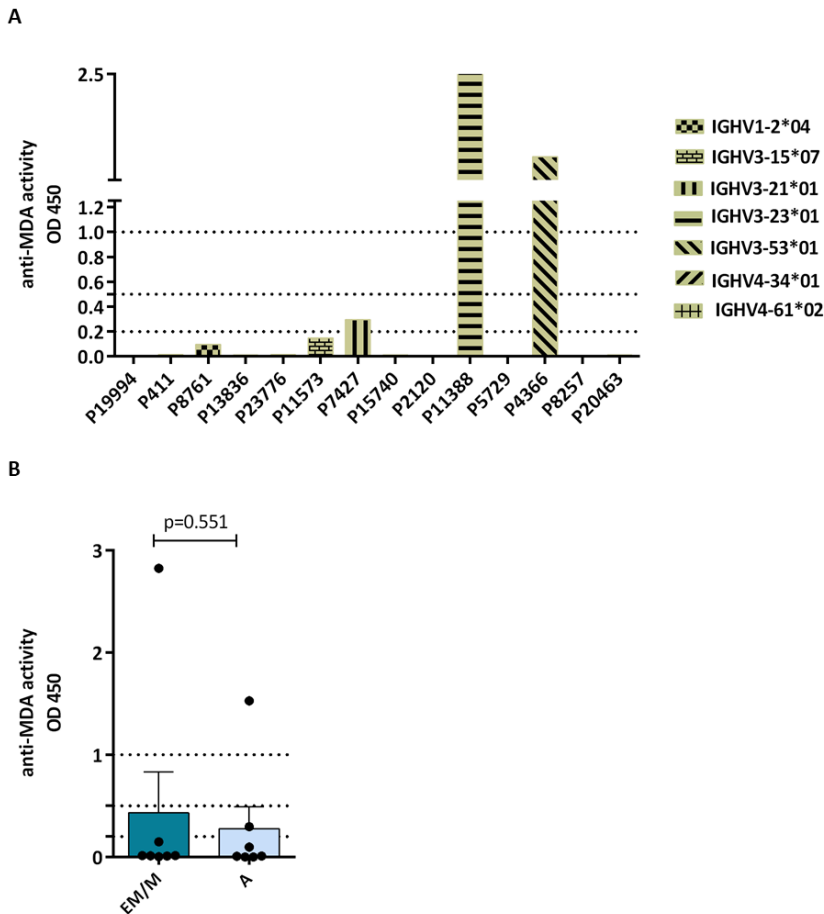
στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το αντιγόνο μεταξύ αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων mAbs (Εικόνα 22B).



Εικόνα 22: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του απτενίου TNP: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .492, στατιστικά μη σημαντικό.

2.9 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ MDA

Δεκατέσσερα mAbs εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αντιδρούν με το MDA. Τρεις/14 περιπτώσεις (21%) εμφάνισαν πρόσδεση με το αντιγόνο. Κανένα από τα IGHV1-2*04 mAbs που εξετάστηκαν δεν ήταν θετικό, ενώ μόνο 1/3 IGHV3-23*01 mAbs, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P11388, εμφάνισε αντι-MDA δράση (έντονα θετικό). Τα «αμετάλλακτα» mAbs P4366 (IGHV3-53*01) και P7427 (IGHV3-21*01) παρουσίασαν ισχυρή και οριακά θετική σύνδεση με το MDA αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα mAbs που ελέγχθηκαν κωδικοποιούνται από τα IGHV4-34*01, IGHV4-61*02 και IGHV3-15*07 ήταν αρνητικά ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν το αντιγόνο MDA (Εικόνα 23A). Δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το αντιγόνο μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων περιπτώσεων (Εικόνα 23B).



Εικόνα 23: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του MDA: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .551, στατιστικά μη σημαντικό.

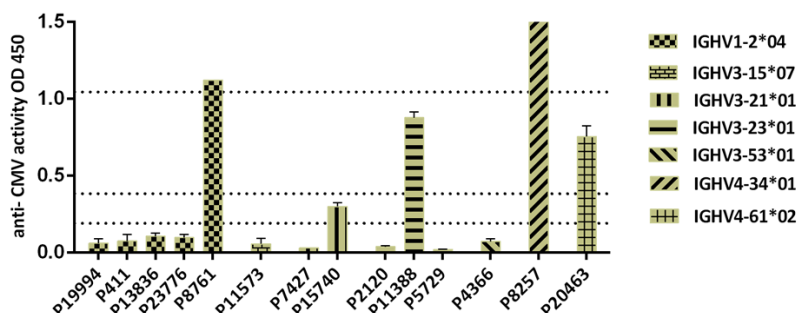
2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ mAbs ΣΕ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ

2.10.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ

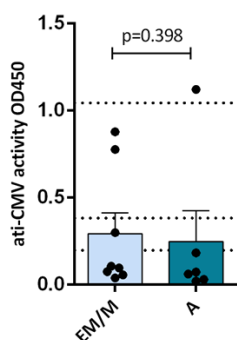
Δεκατέσσερις περιπτώσεις ελέγχθηκαν για την αντιδραστικότητά τους έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Πέντε/14 περιπτώσεις (35,7%) αναγνώρισαν τον CMV ξεπερνώντας το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας. Ένα από τα 5 IGHV1-2*04 mAbs, το «αμετάλλακτο» P8761 εμφάνισε έντονη αντι-CMV δράση. Επίσης, μόνο 1/3 IGHV3-23*01 mAbs το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P11388 mAb χαρακτηρίστηκε θετικό ως προς τη δράση έναντι του ιού. Τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» mAbs P15740 (IGHV3-21*01) και P20463 (IGHV4-61*02) και το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) αναγνώρισαν αντιγόνα του ιού παρουσιάζοντας ασθενώς θετική, θετική και έντονα θετική αντι-CMV

δράση, αντίστοιχα (Εικόνα 24A). Δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το CMV μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων περιπτώσεων (Εικόνα 24B).

A



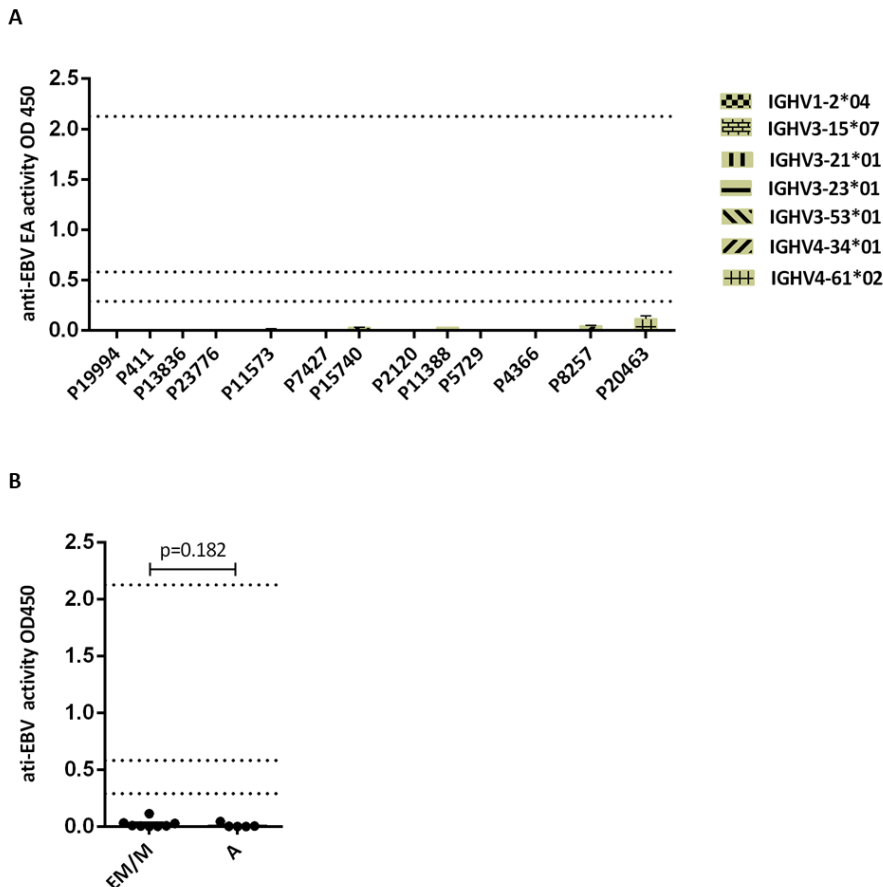
B



Εικόνα 24: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του CMV: A) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. B) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .398, στατιστικά μη σημαντικό.

2.10.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ Epstein-Barr

Από τα 13 mAbs που εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν τον ιό Epstein-Barr, κανένα δεν παρουσίασε αξιόλογη αντιδραστικότητα (Εικόνα 25A). Οι αμετάλλακτες και οι μεταλλαγμένες περιπτώσεις δεν αναγνώρισαν τον EBV και δεν σημείωσαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ισχύ σύνδεσης με τον ιό (Εικόνα 25B).



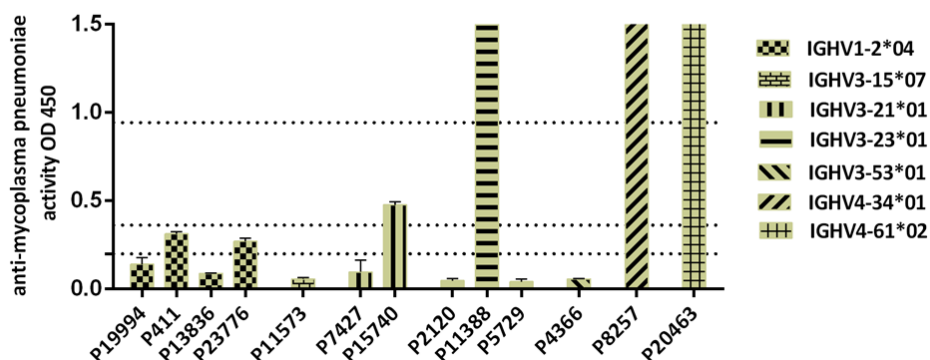
Εικόνα 25: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του EBV: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, Α: Αμετάλλακτα mAbs. $P = .182$, στατιστικά μη σημαντικό.

2.10.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑΣ

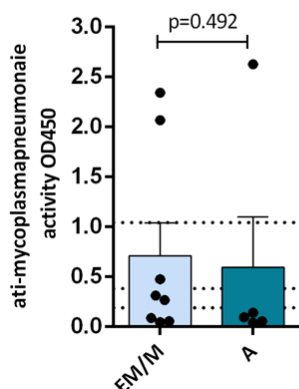
Δεκατρία mAbs εξετάστηκαν ως προς την αντιδραστικότητά τους έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας (*Mycoplasma pneumoniae*). Έξι/13 περιπτώσεις (46%) ξεπέρασαν το κατώφλι θετικότητας. Συγκεκριμένα, 2/4 IGHV1-2*04 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P23776 και P411 εμφάνισαν αντιδραστικότητα έναντι του βακτηρίου (ασθενώς θετικά). Επίσης, 1/3 IGHV3-23*01 mAbs και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και P15740 αντίστοιχα, αναγνώρισαν το μυκόπλασμα, με το πρώτο να είναι έντονα θετικό και το δεύτερο θετικό. Από τα υπόλοιπα mAbs, το «αμετάλλακτο» mAb P8257 (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο», P20463 (IGHV4-61*02) παρουσίασαν πολύ ισχυρή πρόσδεση (Εικόνα 26Α). Μεταξύ των αμετάλλακτων, και μεταλλαγμένων mAbs τα μεταλλαγμένα σημείωσαν ισχυρότερη αναγνώριση του

CMV όπως φαίνεται από την υψηλότερη μέση τιμή της OD. Οι διαφορές ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 26B).

A



B



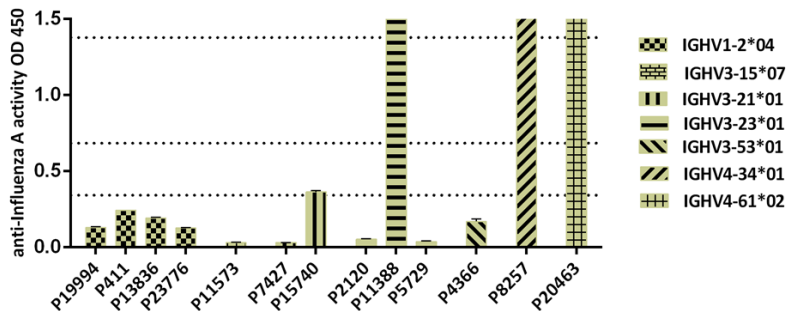
Εικόνα 26: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .492, στατιστικά μη σημαντικό.

2.10.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ Influenza A

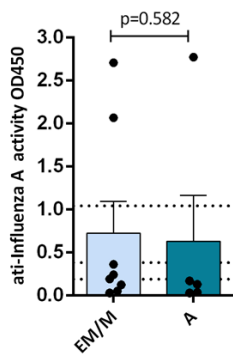
Η αντιδραστικότητα έναντι του ιού Influenza A εξετάστηκε σε 13 mAbs. Τέσσερα/13 mAbs (30,7%) ξεπέρασαν το ελάχιστο κατώφλι θετικότητας. Από τα 4 IGHV1-2*04 mAbs που εξετάστηκαν, κανένα δεν παρουσίασε αντιδραστικότητα που να ξεπεράσει το κατώφλι θετικότητας. Ένα/3 IGHV3-23*01 mAbs και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και P15740 αντίστοιχα, αναγνώρισαν τον ιό, με το πρώτο να είναι έντονα θετικό και το δεύτερο ασθενώς θετικό. Από τα υπόλοιπα mAbs που ελέγχθηκαν, το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) και το «ελάχιστο μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) ξεπέρασαν κατά πολύ τα όρια θετικότητας και κρίθηκαν ως

έντονα θετικά (Εικόνα 27A). Δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφορές ως προς την ισχύ σύνδεσης με το ιό μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων περιπτώσεων (Εικόνα 27B).

A



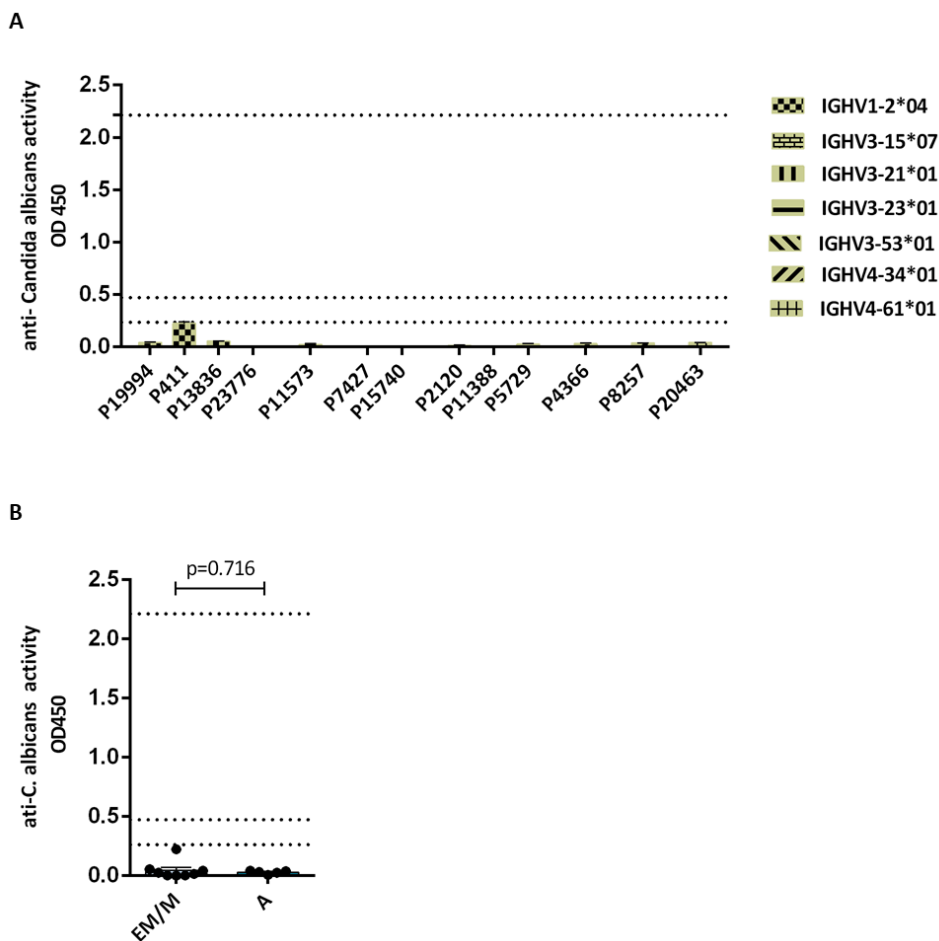
B



Εικόνα 27: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του ιού InfluenzaA: A) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. B) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .582, στατιστικά μη σημαντικό.

2.10.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Candida albicans*

Από τα 13 mAbs που εξετάστηκαν για την αντιδραστικότητά τους στο μύκητα *Candida albicans*, κανένα δεν εμφάνισε σημαντική πρόσδεση στο αντιγόνο (Εικόνα 28A). Οι αμετάλλακτες και οι μεταλλαγμένες περιπτώσεις δεν αναγνώρισαν τον *Candida albicans* και δεν σημείωσαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ισχύ σύνδεσης με το μύκητα (Εικόνα 28B).

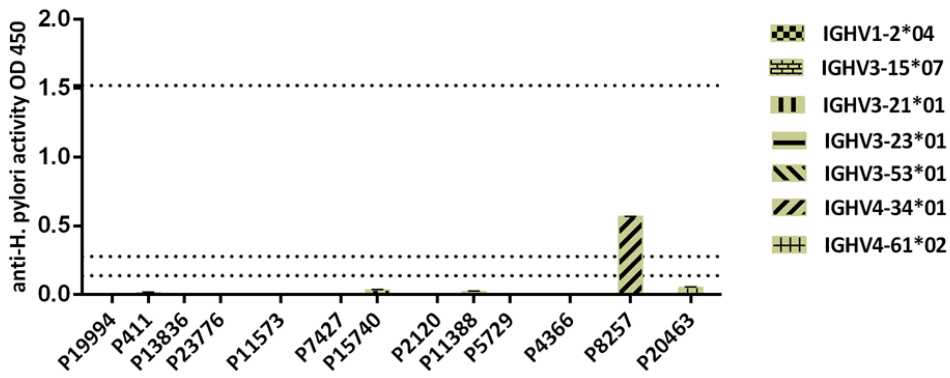


Εικόνα 28: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του μύκητα *C. albicans*: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. $P = .716$, στατιστικά μη σημαντικό.

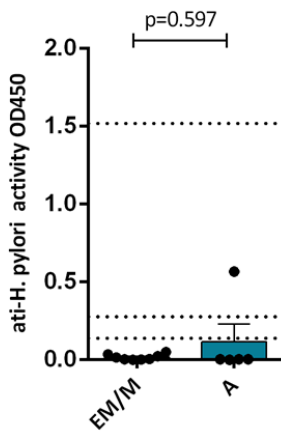
2.10.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ

Από τα 13 mAbs που εξετάστηκαν για την αναγνώριση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), μόνο το «αμετάλλακτο» P8257 (IGHV4-34*01) κρίθηκε ως θετικό (Εικόνα 29Α). Μεταξύ των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων mAbs, τα αμετάλλακτα σημείωσαν ισχυρότερη αναγνώριση του αντιγόνου όπως φαίνεται από την υψηλότερη μέση τιμή της OD. Οι διαφορές ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικόνες 29Β).

A



B



Εικόνα 29: Αντιδραστικότητα των αντισωμάτων έναντι του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού: Α) Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Β) Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν βάσει του φορτίου των μεταλλάξεων των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια θετικότητας: ασθενής θετικότητα, θετικότητα και έντονη θετικότητα. EM/M: Ελάχιστα μεταλλαγμένα και μεταλλαγμένα mAbs κατηγοριοποιημένα μαζί, A: Αμετάλλακτα mAbs. P= .597, στατιστικά μη σημαντικό.

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ELISA που πραγματοποιήθηκαν βρίσκονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 17 με χαρακτηρισμό της αντιδραστικότητας των mAbs ως εξής: (-) για τα αρνητικά, (+) για τα ασθενώς θετικά, (++) για τα θετικά και (+++) για τα έντονα θετικά.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα των δοκιμασιών ELISA για την αναγνώριση αντιγονικών στόχων των ΣΛΟΖ αντισωμάτων.

mAb	IGHV	IGHV	Actin	Myosin	Tg	Aβ	Fab'2	TNP	MDA	CMV	EBV	M. Pn.	C. Al.	H. Pyl.					
ταυτότητα	γονίδιο	νουκλεοτιδική ταυτότητα	dsDNA				CA					Inf. A.			ΠΟΛΥΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ				
P19994	1-2*04	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXI			
P8761	1-2*04	A	Δ/E	++	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	+++	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	Δ/E	ΝΑΙ
P411	1-2*04	EM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	OXI
P23776	1-2*04	EM	+++	++	-	++	+++	+++	+++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	ΝΑΙ
P13836	1-2*04	M	+	-	-	-	-	Δ/E	Δ/E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXI
P11573	3-15*07	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXI
P7427	3-21*01	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	OXI
P15740	3-21*01	EM	++	+++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	++	+	-	-	-	ΝΑΙ
P5729	3-23*01	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXI
P2120	3-23*01	EM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXI
P11388	3-23*01	EM	++	+++	++	-	+	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	-	-	-	ΝΑΙ
P4366	3-53*01	A	++	+	+	-	-	+	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	ΝΑΙ
P8257	4-34*01	A	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	++	-	ΝΑΙ
P20463	4-61*02	EM	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	-	++	-	+++	+++	-	-	-	ΝΑΙ

Οι κλίμακες κατάταξης της αντιδραστικότητας των mAbs παρουσιάζονται στους Πίνακες 13 και 14 της μεθοδολογίας.

Συντομογραφίες: A: Αμετάλλακτο αντίσωμα, EM: Ελάχιστα μεταλλαγμένο αντίσωμα, M: Μεταλλαγμένο αντίσωμα, Δ/E: Δεν εξετάστηκε, Tg: Θυρεοσφαιρίνη, Aβ: β-αμυλοειδές, CA: καρβονική ανυδράση, M. Pn.: *M. Pneumoniae*, Inf.A.: ιός Influenza A, C. A.: *C. Albicans*, H. Pyl: *H. Pylori*

Τα mAbs που αναγνώρισαν δύο ή περισσότερα (αυτό)αντιγόνα ορίστηκαν ως πολύ-αντιδραστικά. Συνολικά, 7 από τα 15 (46,7%) mAbs χαρακτηρίστηκαν ως πολύ-αντιδραστικά. Αναλυτικά, 2/5 IGHV1-2*04 mAbs ήταν πολύ-αντιδραστικά, το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P23776 και το «αμετάλλακτο» P8761 που αναγνώρισαν 8/15 και 2/2 αντιγόνα για τα οποία εξετάστηκαν αντίστοιχα. Επιπλέον, 1/3 IGHV3-23*01 mAbs και 1/2 IGHV3-21*01 mAbs, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» P11388 και το P15740 αντίστοιχα, χαρακτηρίστηκαν επίσης ως πολύ-αντιδραστικά αναγνωρίζοντας 11/15 αντιγόνα. Τα «αμετάλλακτα» mAbs P8257 (IGHV4-34*01) και P4366 (IGHV3-53*01) και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02) ήταν επίσης πολύ-αντιδραστικά αναγνωρίζοντας 11/15, 6/15 και 11/15 αντιγόνα, αντίστοιχα.

Το πρότυπο πολυ-δραστικότητας κάθε mAb ήταν διακριτό, ενώ παρατηρήθηκε ετερογένεια ακόμη και μεταξύ περιπτώσεων που εκφράζουν το ίδιο IGHV γονίδιο ή μεταξύ περιπτώσεων με παρόμοιο μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων IGHV. Ωστόσο, η αντιδραστικότητα και η πολύ-αντιδραστικότητα έναντι των μικροβιακών αντιγόνων παρουσίασε ορισμένους «περιορισμούς» ως προς το είδος των μικροβίων που αναγνωρίστηκαν: τα mAbs αντέδρασαν κυρίως με αντιγόνα τριών μικροβίων, συγκεκριμένα των ιών CMV και Influenza A και του βακτηρίου *M. pneumoniae*. Συγκεκριμένα, 4/7 πολύ-αντιδραστικά mAbs, τα P20463 (4-61*02), P15740 (3-21*01), P8257 (4-34*01) και P11388 (3-23*01) αναγνώρισαν και τα τρία αυτά μικρόβια, ενώ το P8257 αναγνώρισε επιπλέον το βακτήριο *H.pylori*. Το πολύ-αντιδραστικό mAb P23776 (IGHV1-2*04) αναγνώρισε μόνο αντιγόνα του *M.pneumoniae* και όχι άλλων παθογόνων, ενώ το πολύ-αντιδραστικό P4366 (IGHV3-53*01) δεν αντέδρασε έναντι κανενός παθογόνου.

Από τα μη πολύ-αντιδραστικά mAbs αναγνώριση μικροβίου και όχι αυτό-αντιγόνου παρουσίασε μόνο το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P411 (IGHV1-2*04) αναγνωρίζοντας ασθενώς αντιγόνα του *M. pneumoniae*.

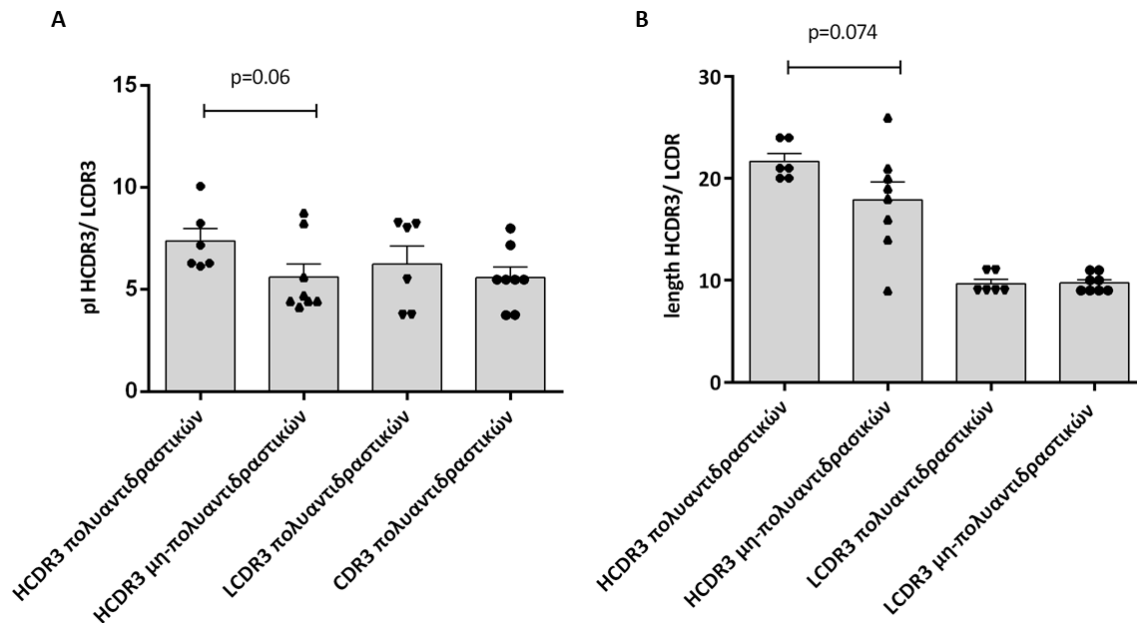
3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Αρκετά αυτόαντιδραστικά και πολυαντιδραστικά αντισώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλο μήκος CDR3 περιοχές της βαριάς αλυσίδας με αρκετά θετικά κατάλοιπα αμινοξέων^{68,69}.

Τα ΣΛΟΖ mAbs ομαδοποιήθηκαν σε πολύ-αντιδραστικά και μη πολυ-αντιδραστικά και συγκρίθηκαν οι τιμές του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) και του μήκους της περιοχής CDR3 της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας των mAbs. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) της CDR3

περιοχής της βαριάς αλυσίδας τείνουν να είναι υψηλότερες συγκριτικά με αυτές των μη πολυαντιδραστικών αντισωμάτων χωρίς ωστόσο η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 30Α). Επίσης το μήκος της CDR3 περιοχής της βαριάς αλυσίδας των πολυαντιδραστικών αντισωμάτων τείνει να είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα μη πολυαντιδραστικά (Εικόνα 30Β).

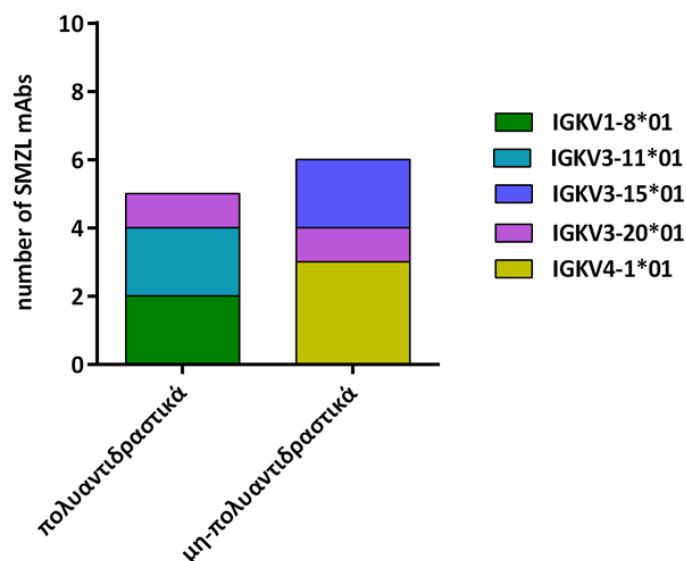
Δεν εντοπίστηκαν ουσιαστικές διαφορές στις αντίστοιχες τιμές pI και στο μήκος της CDR3 στην ελαφριά αλυσίδα των πολυαντιδραστικών και μη πολυαντιδραστικών mAbs (Εικόνα 30Α, Β).



Εικόνα 30: Συσχέτιση της πολύ-αντιδραστικότητας των mAbs και του Α) ισοηλεκτρικού σημείου και Β) του μήκους της περιοχής CDR3 των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων P= 0.06: στατιστικά μη σημαντικό, αλλά κοντά στο κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας (P=.05), P= 0.074: στατιστικά μη σημαντικό.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της πολύ-αντιδραστικότητας και της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας. Στην παρούσα ανάλυση, συμπεριλήφθηκαν mAbs που εκφράζουν ένα από τα εξής πέντε IGKV γονίδια που χρησιμοποιούνται από δύο ή περισσότερα mAbs (IGKV3-15*01, IGKV3-20*01, IGKV3-11*01, IGKV4-1*01, IGKV1-8*01).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων παρουσίασε ενδιαφέρον καθώς όλα τα mAbs που φέρουν ελαφριά αλυσίδα κωδικοποιημένα από τα IGKV1-8*01 και IGKV3-11*01 γονίδια ήταν πολύ-αντιδραστικά. Αντίθετα όλα τα mAbs που φέρουν ελαφριά αλυσίδα κωδικοποιημένα από τα IGKV4-1*01 και IGKV3-15*01 γονίδια ήταν μη-πολύ-αντιδραστικά. Ετερογένεια παρουσίασε μόνο το IGKV3-20*01 γονίδιο που εκφράζεται από ένα πολύ-αντιδραστικό και ένα μη πολύ-αντιδραστικό mAb (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Συσχέτιση πολύ-αντιδραστικότητας των mAbs και έκφραση συγκεκριμένων IGKV γονιδίων.

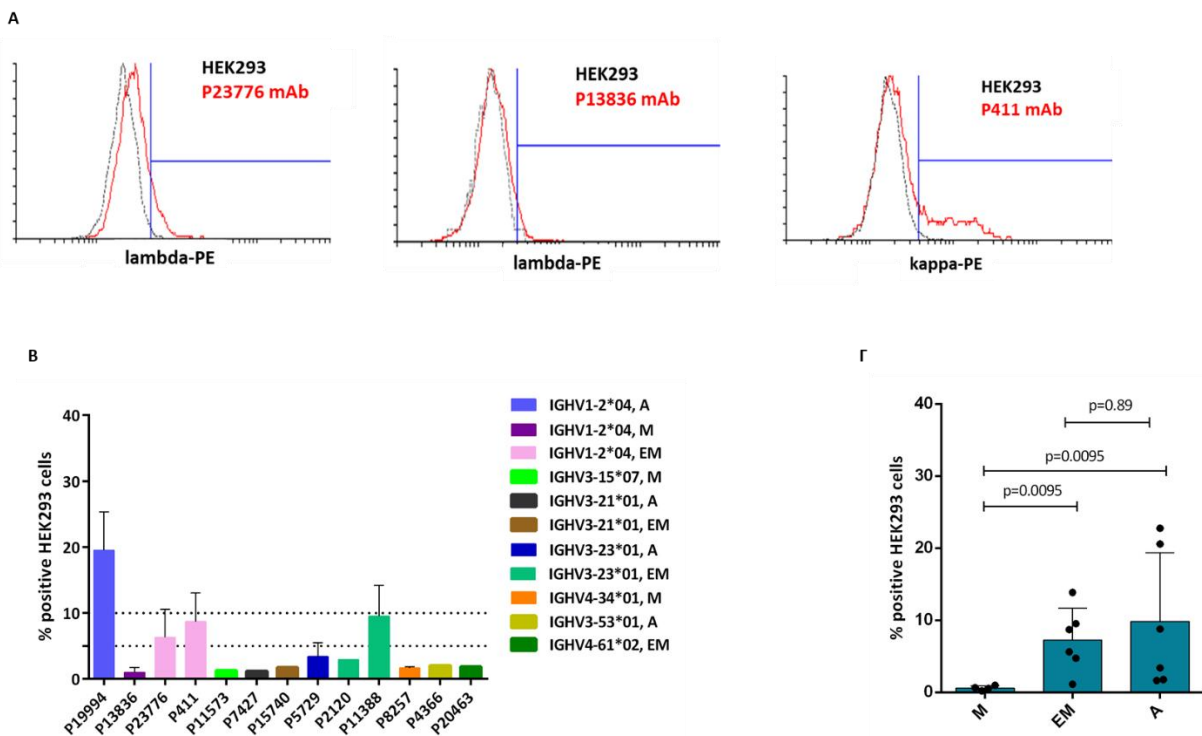
4. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΣΕ HEK ΚΑΙ HS-5 ΚΥΤΤΑΡΑ

Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως ΣΛΟΖ mAbs κωδικοποιούμενα από τοIGHV1-2*04 γονίδιο αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια κυττάρων από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σειράς HEK293⁶⁴. Με σκοπό την αναλυτικότερη διερεύνηση του προτύπου αντιγονικής αναγνώρισης και πολύ-αντιδραστικότητας, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε με κυτταρομετρία ροής η ικανότητα των ΣΛΟΖ mAbs να αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους στην επιφάνεια ζωντανών κυττάρων HEK293 και HS-5. Τα HEK293 είναι εμβρυϊκά, νεφρικά κύτταρα ανθρώπου με μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων και έχουν χρησιμοποιηθεί ως «πηγή» αυτοαντιγόνων και σε άλλες μελέτες πολύ-αντιδραστικότητας αντισωμάτων^{64,70}. Τα HS-5 είναι στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και επίσης δυνητική πηγή αυτοαντιγόνων για φυσιολογικά και παθολογικά B λεμφοκύτταρα^{71,72}.

Η αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια των HEK293 κυττάρων εξετάστηκε σε 14 mAbs: το μοναδικό που εμφάνισε σημαντική αναγνώριση και ξεπέρασε το κατώφλι του 10% ήταν το «αμετάλλακτα» mAb P19994 (IGHV1-2*04) (Εικόνα 32B). Επίσης, τα «ελάχιστα μεταλλαγμένα» mAbs P23776 και P411 (IGHV1-2*04) και P11388 (IGHV3-23*01) έδειξαν ήπια αναγνώριση που κυμάνθηκε μεταξύ 5% έως 10% των κυττάρων (Εικόνα 32A, B).

Όταν τα mAbs ομαδοποιήθηκαν με βάση το φορτίο των μεταλλάξεων, παρατηρήθηκε σημαντικά ισχυρότερη αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια των κυττάρων HEK293T στις

αμετάλλακτες περιπτώσεις συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες ($p=0.0095$) και στις ελάχιστα μεταλλαγμένες περιπτώσεις συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες ($p=0.0095$). Η διαφορά μεταξύ αμετάλλακτων και ελάχιστα μεταλλαγμένων περιπτώσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.89$) (Εικόνα 32Γ).

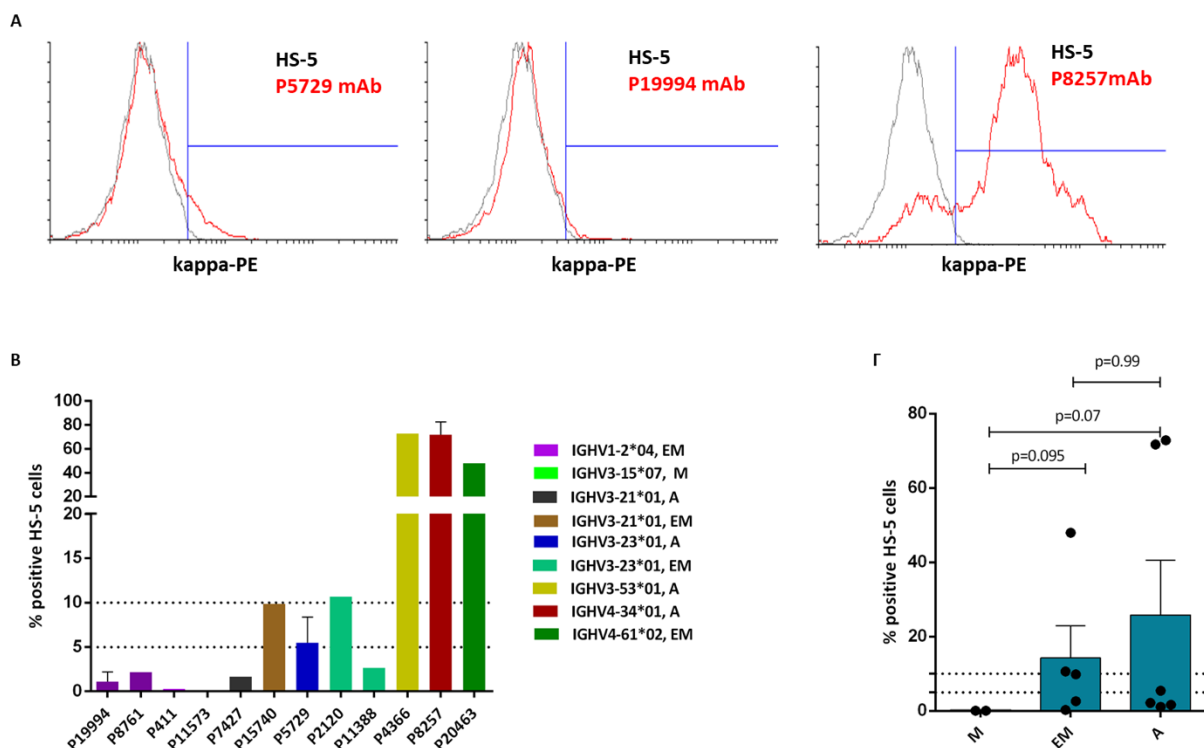


Εικόνα 32: Αναγνώριση επιτόπων στην επιφάνεια HEK293T κυττάρων από τα ΣΛΟΖ mAbs. Α) Χαρακτηριστικά ιστογράμματα από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής της σύνδεσης των mAbs P23776, P13836 και P411 στα HEK293T κύτταρα. Β) Ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής. Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Γ) Διαφορές στην αναγνώριση των HEK293T από τα mAbs βάσει του φορτίου μετάλλαξης των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια χαμηλής και υψηλής θετικότητας. Συντομογραφίες: A: Αμετάλλακτα mAbs, EM: Ελάχιστα μεταλλαγμένα mAbs, M: μεταλλαγμένα mAbs.

Η αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια των HS-5 κυττάρων εξετάστηκε σε 12 mAbs. Πολύ έντονη αναγνώριση, ξεπερνώντας πολύ το κατώφλι θετικότητας παρουσίασαν τα «αμετάλλακτα» mAbs P8257 (IGHV4-34*01) και P4366 (IGHV3-53*01) καθώς και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P20463 (IGHV4-61*02). Και τα 3 mAbs είχαν χαρακτηριστεί ως πολυ-αντιδραστικά στις δοκιμασίες ELISA. Τα «αμετάλλακτα» mAbs P5729 (IGHV3-23*01) και P15740 (IGHV3-21*01) και το «ελάχιστα μεταλλαγμένο» P2120 (IGHV3-23*01) αναγνώρισαν ασθενώς τα HS-5 κύτταρα (5% μέχρι 10% των συνολικών κυττάρων) (Εικόνα 33Α, Β).

Η ομαδοποίηση των mAbs με βάση το φορτίο των μεταλλάξεων, έδειξε ισχυρότερη αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια των κυττάρων HS-5 στις αμετάλλακτες περιπτώσεις

συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες ή τις ελάχιστα μεταλλαγμένες περιπτώσεις χωρίς ωστόσο οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 33Γ).



Εικόνα 33: Αναγνώριση επιτόπων στην επιφάνεια HS-5 κυττάρων από τα ΣΛΟΖ mAbs. Α) Χαρακτηριστικά ιστογράμματα από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής της σύνδεσης των mAbs P5729, P19994 και P8257 στα HEK293T κύτταρα. Β) Ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής. Κάθε μπάρα αντιστοιχεί σε ένα ΣΛΟΖ mAb. Γ) Διαφορές στην αναγνώριση των HS-5 από τα mAbs βάσει του φορτίου μετάλλαξης των IGHV γονιδίων. Με διακεκομμένες γραμμές ορίζονται τα κατώφλια χαμηλής και υψηλής θετικότητας. Συντομογραφίες: Α: Αμετάλλακτα mAbs, EM: Ελάχιστα μεταλλαγμένα mAbs, M: μεταλλαγμένα mAbs. P= .095, P= .07, P= .99, στατιστικά μη σημαντικά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΒκΥ κατέχει κρίσιμο ρόλο στην οντογένεση και την εξέλιξη νεοπλασιών από ώριμα Β λεμφοκύτταρα⁵⁸. Ειδικότερα, η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ΒκΥ και του μικροπεριβάλλοντος στη φυσική ιστορία του ΣΛΟΖ υποστηρίζεται από ευρήματα όπως (α) η σημαντική επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών με εντυπωσιακότερο εύρημα την επιλεκτική χρήση του αλληλομόρφου IGHV1-2*04 από το ~30% των περιπτώσεων, (β) η ύπαρξη ΣΥΜ στις περισσότερες περιπτώσεις και (γ) η παρουσία ενδοκλωνικής ετερογένειας σε ορισμένες περιπτώσεις που υποδεικνύει συνεχή αλληλεπίδραση με το(α) αντιγόνο(α)^{39,49,55,56,57,58}.

Η μελέτη της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ στο ΣΛΟΖ εμφανίζει τεχνικές δυσκολίες, καθώς δεν εκκρίνεται από τα ΣΛΟΖ κακοήθη κύτταρα. Επιπλέον, τα κακοήθη κύτταρα έχουν περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης *in vitro*. Για τη λειτουργική μελέτη της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης άλλων κακοηθειών των Β λεμφοκυττάρων, όπως η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν διάφορες μέθοδοι όπως η διέγερση των κακοήθων κυττάρων με μιτογόνα (PMA, phorbol myristate acetate), η τεχνολογία των ετεροϋβριδωμάτων και η δημιουργία κυτταρικών σειρών από μετασχηματισμό λευχαιμικών κυττάρων με τον ιό EBV^{73,74,75}. Ωστόσο, οι παραπάνω μέθοδοι συχνά αποδίδουν ανεπαρκή ποσότητα αντισωμάτων ή ασταθή mAbs με απώλεια λειτουργικότητας^{73,74}. Γι' αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων από ασθενείς με νεοπλάσματα των Β λεμφοκυττάρων στράφηκε στη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA^{73,74}. Έως σήμερα στις περισσότερες μελέτες τα ανασυνδυασμένα mAbs παράχθηκαν, χάριν ευκολίας στον τεχνικό χειρισμό, ως ανοσοσφαιρίνες ισotyπου IgG παρ' ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων η κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη ήταν ισotyπου IgM. Δεδομένου ότι πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι η σταθερή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα και τη συγγένεια προς το αντιγόνο^{76,77,78,79} η αναθεώρηση της μεθοδολογίας παραγωγής mAbs για μελέτες αυτού του τύπου είναι μείζονος σημασίας.

Στο ΣΛΟΖ, η μοναδική έως σήμερα μελέτη της αντιγονικής ειδικότητας του ΒκΥ αφορούσε σε μόλις 5 κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες που εκφράζουν το γονίδιο IGHV1-2*04 και έδειξε πολυαντιδραστικότητα και αυτοαντιδραστικότητα με αναγνώριση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών αντιγόνων και αντιγόνων της κυτταρικής μεμβράνης και του ανθρώπινου

ορού⁶⁴. Εντούτοις, οι κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες εκφράστηκαν ως ανασυνδυασμένα mAbs ισότυπου IgG οδηγώντας ενδεχομένως σε διαφορές ως προς τη συγγένεια/ειδικότητα των αντισωμάτων για το αντιγόνο σε σχέση με την κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη IgM που εκφράζεται στην επιφάνεια των κακοήθων κλωνικών κυττάρων. Επιπλέον, δεν υπάρχει καμία πληροφορία για τη φύση των αντιγόνων που αναγνωρίζονται από τις κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες που κωδικοποιούνται από άλλα IGHV γονίδια.

Στην παρούσα εργασία οι κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες 14 περιπτώσεων ΣΛΟΖ παράχθηκαν ως ανθρώπινα ανασυνδυασμένα mAbs του ισότυπου IgM, διατηρώντας τον ισότυπο που εκφράζουν τα κλωνικά κύτταρα. Δεδομένου ότι η προαναφερθείσα μοναδική έως σήμερα μελέτη του προτύπου αντιγονικής αναγνώρισης των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών στο ΣΛΟΖ ανέδειξε χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των φυσικών αυτοαντισωμάτων⁶⁴ στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε διεξοδικά η σύνδεση των ΣΛΟΖ mAbs με μεγάλο εύρος μορίων που είναι συνηθισμένοι στόχοι φυσικών και παθολογικών αυτοαντισωμάτων. Συγκεκριμένα, το πάνελ των αντιγόνων που εξετάστηκαν περιλάμβανε το δίκλωνο DNA (dsDNA, πυρηνικό αντιγόνο), αντιγόνα του κυτταροσκελετού (ακτίνη, μυοσίνη), οργανοειδικά αντιγόνα (θυρεοσφαιρίνη, πρωτεΐνη β-αμυλοειδούς) και τα αντιγόνα καρβονική ανυδράση, το τμήμα Fab'2 της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης, το απτένιο TNP και τον δείκτη οξείδωσης MDA. Επίσης, ελέγχθηκε η αναγνώριση αντιγόνων από τα εξής παθογόνα: κυτταρομεγαλοϊός, ιός Epstein-Barr, βακτήριο *M. pneumoniae*, ιός Influenza A, μύκητας *Candida albicans* και ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.

Μεγάλο ποσοστό των ΣΛΟΖ mAbs (69%) παρουσίασαν αντιδραστικότητα έναντι του δίκλωνου DNA-γεγονός που ίσως σχετίζεται με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων φαινομένων στη νόσο^{64,80,81,82}. Σε μικρότερο βαθμό αναγνωρίστηκαν τα κυτταροσκελετικά αντιγόνα του πάνελ της παρούσας εργασίας: 50% και 31% των ΣΛΟΖ mAbs αναγνώρισαν την ακτίνη και τη μυοσίνη, αντίστοιχα. Αυτοαντισώματα έναντι της ακτίνης και της μυοσίνης έχουν αναφερθεί σε αυτοάνοσες καταστάσεις π.χ. αυτοάνοση ηπατίτιδα και αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα^{83,84,85}. Τόσο το DNA όσο και τα κυτταροσκελετικά αντιγόνα είναι ενδοκυττάρια αντιγόνα που απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή τους με το BκΥ κατά την απόπτωση⁸⁶.

Επίσης σημαντικό ποσοστό των ΣΛΟΖ mAbs αναγνώρισαν τα οργανοειδικά αυτοαντιγόνα θυρεοσφαιρίνη και β-αμυλοειδές (31% και 38% αντίστοιχα) και το αντιγόνο καρβονική ανυδράση (50%). Αυτοαντισώματα έναντι της θυρεοσφαιρίνης συσχετίζονται με αυτοάνοσες θυροειδίτιδες⁸⁷, ενώ ο φυσιολογικός ρόλος του β-αμυλοειδούς δεν είναι πλήρως κατανοητός⁸⁸. Στη νόσο Alzheimer,

το β-αμυλοειδές συναντάται στις αμυλοειδικές πλάκες στους εγκεφάλους ασθενών. Αυτοαντισώματα με αντι-Αβ δράση εντοπίζονται φυσιολογικά στον οργανισμό, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις αντι-Αβ αντισωμάτων έχουν βρεθεί στους ασθενείς με νόσο Alzheimer^{89,90}. Τέλος, η καρβονική ανυδράση συμμετέχει στην οξεοβασική ισορροπία και την επακόλουθη ομοιοστατική ρύθμιση του pH του σώματος και είναι στόχος αυτοαντισωμάτων σε αυτοάνοσες καταστάσεις όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjögren⁹¹. Η αναγνώριση της θυρεοσφαιρίνης είχε δείχθει και στη μοναδική προϋπάρχουσα μελέτη του προτύπου αντιγονικής αναγνώρισης των ΣΛΟΖ mAbs. Συγκεκριμένα, οι Warsame et al είχαν δείξει αναγνώριση αυτού του αντιγόνου από τα περισσότερα IGHV1-2*04 ΣΛΟΖ mAbs που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη τους⁶⁴. Ωστόσο στην παρούσα εργασία μόνο 1 από τα 4 IGHV1-2*04 mAbs που εξετάστηκαν για τη σύνδεσή τους με την θυρεοσφαιρίνη την αναγνώρισαν, υποδεικνύοντας μεγάλη ετερογένεια ως προς την αντιγονική αναγνώριση ακόμη και μεταξύ αντισωμάτων που κωδικοποιούνται από τα ίδια IGHV γονίδια. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα οι διαφορές μεταξύ των δυο μελετών να οφείλονται, τουλάχιστον εν μέρει, στην χρήση mAbs διαφορετικών ισοτύπων.

Επιπλέον, η αυτοαντιδραστικότητα αλλά και η έντονη πολυαντιδραστικότητα επιβεβαιώθηκε από την αναγνώριση αντιγόνων στην επιφάνεια ζωντανών κυττάρων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, υποδεικνύοντας ότι τα ΣΛΟΖ κλωνικά κύτταρα διεγείρονται και από αντιγόνα που είναι συνεχώς διαθέσιμα για αλληλεπίδραση και όχι μόνο από αντιγόνα που γίνονται προσβάσιμα κατά την κυτταρική απόπτωση.

Η αναγνώριση ευρέος φάσματος αυτοαντιγόνων (αυτό-αντιδραστικότητα και πολύ αντιδραστικότητα) είναι χαρακτηριστικό των φυσικών αντισωμάτων. Επιπλέον, τα φυσικά αυτοαντισώματα εμφανίζουν αντιδραστικότητα αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων^{92,93} και αντιδραστικότητα έναντι απτενίων⁹⁴. Η ομοιότητα των λειτουργικών χαρακτηριστικών των ΣΛΟΖ αντισωμάτων με αυτά των φυσικών αντισωμάτων αναδείχθηκε και από την αναγνώριση του τμήματος Fab'2 της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (που αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης ιδιοτύπου-αντι-ιδιοτύπου) από το 50% των ΣΛΟΖ mAbs αλλά και από την σύνδεση του 38% των ΣΛΟΖ mAbs με το απτένιο TNP.

Αντίθετα, ελάχιστα ΣΛΟΖ mAbs αναγνώρισαν τον δείκτη οξειδωτικού στρες MDA που αναγνωρίζεται επίσης από φυσικά αυτοαντισώματα⁹⁵ και έχει συσχετιστεί με αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα^{93,94,96,97}. Η αναγνώριση αυτού

του αντιγόνου είναι πολύ συχνή σε άλλες Β λεμφοϋπερπλασίες, συγκεκριμένα στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία μεγάλο ποσοστό των αντισωμάτων με αμετάλλακτα IGHV γονίδια παρουσιάζουν αντι-MDA δράση^{98,99}. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν το εξειδικευμένο προφίλ αντιγονικής αναγνώρισης των ΣΛΟΖ mAbs που τα διαφοροποιεί από τα mAbs άλλων κακοηθειών των Β λεμφοκυττάρων.

Σημαντικό χαρακτηριστικό των φυσικών αντισωμάτων είναι η αναγνώριση μικροβίων. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε και η αντι-μικροβιακή δράση των ΣΛΟΖ mAbs και βρέθηκε ότι 50% των mAbs της παρούσας εργασίας αναγνώρισαν 1 ή περισσότερα μικροβιακά αντιγόνα. Συγκεκριμένα, από τα 6 μικρόβια που συμπεριλήφθηκαν στο πάνελ αναγνωρίστηκαν συστηματικά (από 4-6 ΣΛΟΖ mAbs) οι ιοί CMV και Influenza A και το βακτήριο *M. pneumoniae* ενώ το βακτήριο *H. pylori* αναγνωρίστηκε από 1 μόλις ΣΛΟΖ mAb. Η σύνδεση με συγκεκριμένα μόνο παθογόνα υποδεικνύει περιορισμούς ως προς το είδος των μικροβίων που μπορούν να αλληλεπιδρούν/έχουν αλληλεπιδράσει με τα ΣΛΟΖ κλωνικά κύτταρα και ίσως εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ΣΛΟΖ mAbs που παρουσίασαν αντι-μικροβιακή δράση αναγνωρίζοντας μικροβιακά αντιγόνα, εμφάνισαν ταυτόχρονα και εκτεταμένη πολυαντιδραστικότητα έναντι των αυτοαντιγόνων του πάνελ. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι 5/6 mAbs που αναγνώρισαν αντιγόνα των βακτηρίων *M. pneumoniae* και *H. pylori* παρουσίασαν παράλληλα και αντι-DNA δράση σε συμφωνία με ήδη υπάρχοντα δεδομένα που έχουν δείξει διασταυρούμενες αντιδράσεις των αντι-DNA αντισωμάτων με βακτηριακά αντιγόνα^{100,101,102}.

Η αναγνώριση μικροβιακών αντιγόνων από τα ΣΛΟΖ mAbs έχει πολύ ενδιαφέρουσες παθογενετικές προεκτάσεις. Αξιοσημείωτη είναι η συσχέτιση του ΣΛΟΖ με τον ιό HCV^{64,103}. Παράλληλα, μικρόβια όπως οι ιοί CMV και Influenza A και βακτήρια όπως το *M. pneumoniae* και το *H. pylori* εμπλέκονται σε αρκετές αυτοάνοσες παθολογικές καταστάσεις^{104,105,106} και αποτελούν επίσης συχνούς στόχους των φυσικών αυτοαντισωμάτων^{107,108,109,110}. Συγκεκριμένα, ο CMV έχει συσχετιστεί με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα¹¹¹, το συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο και το σύνδρομο Sjogren¹¹². Ακόμη, ο ιός CMV συμβάλλει στην παθογένεια του διαβήτη τύπου I και της αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας^{113,114}. Ο ιός Influenza A έχει συσχετιστεί επίσης με το διαβήτη τύπου I αλλά και με αυτοάνοσες νευρολογικές διαταραχές και την αθηροσκλήρυνση¹¹⁵. Το βακτήριο *M. pneumoniae* εμπλέκεται επίσης σε αυτοάνοσες καταστάσεις του περιφερικού νευρικού συστήματος και στην ρευματοειδή αρθρίτιδα^{116,117}. Επιπλέον, επιμένουσα λοίμωξη από ορισμένα παθογόνα συνδέεται με την ανάπτυξη νεοπλασιών με χαρακτηριστικά παραδείγματα την λοίμωξη από τον ιό EBV που

σχετίζεται με την ανάπτυξη λεμφώματος Burkitt¹¹⁸ ενώ η λοίμωξη από το *H. pylori* σχετίζεται με την παθογένεση του MALT λεμφώματος του στομάχου^{104,118,119}. Γενικότερα, παρατηρήθηκε πολυαντιδραστικότητα των ΣΛΟΖ αντισωμάτων καθώς σχεδόν στις μισές περιπτώσεις αναγνωρίστηκαν πάνω από 2 αντιγόνα του πάνελ. Ωστόσο το πρότυπο πολυαντιδραστικότητας κάθε mAb ήταν διακριτό και δεν βρέθηκε συσχέτιση της πολυαντιδραστικότητας με την έκφραση συγκεκριμένων IGHV γονιδίων ή με το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων IGHV, όπως έχει δειχθεί σε άλλες B λεμφοϋπερπλασίες^{120,121}.

Συνολικά, η πολυαντιδραστικότητα, η αυτοαντιδραστικότητα, η αναγνώριση μικροβιακών αντιγόνων, η αναγνώριση απτενίου, η ένδειξη αλληλεπίδρασης ιδιοτύπου-αντι-ιδιοτύπου συνθέτουν ένα ιδιαίτερο προφίλ αντιγονικής αναγνώρισης των ΣΛΟΖ mAbs που προσομοιάζει τα φυσικά αντισώματα¹⁰⁷. Τα πολυαντιδραστικά ΣΛΟΖ mAbs παρουσίασαν επίσης ιδιαίτερα βιοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά τα οποία όπως μεγάλο μήκος της CDR3 περιοχής της βαριάς αλυσίδας και υψηλές τιμές ισοηλεκτρικού σημείου (pI) της περιοχής CDR3 της βαριάς αλυσίδας, χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με πολυαντιδραστικότητα και αυτοαντιδραστικότητα^{68,69}. Στον άνθρωπο, αρκετά πολυαντιδραστικά αντισώματα προέρχονται από B λεμφοκύτταρα που έχουν ξεφύγει από τους μηχανισμούς κεντρικής ανοχής. Έχει δειχθεί ότι κατά τη διόρθωση του υποδοχέα, οι λάμβδα ελαφριές αλυσίδες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της αυτοαντιδραστικότητας των αντισωμάτων, σε σχέση με τις κάππα⁶⁹. Κατ' αντιστοιχία, συγκεκριμένα IGKV γονίδια μπορεί να συμβάλλουν στην πολυαντιδραστικότητα των mAbs.

Συμπερασματικά, η μελέτη των αντιγόνων που αναγνωρίζονται από τις κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες στο ΣΛΟΖ συμβάλει στην κατανόηση της παθογένεσης της νόσου και μπορεί να οδηγήσει στην ομαδοποίηση των ασθενών με βάση το πρότυπο αντιγονικής αναγνώρισης και στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα παρεμβαίνουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιγόνου και του κακοήθους κλώνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kindt TJ, Goldsby RAOB. Immunology.; 2007
2. Sela M., The Antigens., Copyright © 1974 Elsevier Inc. All rights reserved., ISBN: 0-12-226765-6
3. Zabriskie, J., Essential Clinical Immunology.; 2009.
4. Janeway CA, Travers P, Walport M SM. Immunobiology: The Immune System In Health And Disease.; 2001.
5. Smith, John. Encyclopaedia Britannica, 8th ed., s.v. "Internet." 20 vols. Chicago: Encyclopaedia Britannica, 2009.
6. Yamaguchi, N., Suzuki, Y., Mahbub, M. H., Takahashi, H., Hase, R., Ishimaru, Y., ... Tanabe, T. (2017). The different roles of innate immune receptors in inflammation and carcinogenesis between races. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0678-8>
7. Yang, L., Mali, P., Kim-Kiselak, C., & Church, G. (2016). NLR Proteins. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 1417). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3566-6>
8. Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science; 2002
10. Specter, S. (2007). Antibody synthesis. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, (1998), 1–6. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60246-6>
11. Hou, W., Xu, G., & Wang, H. (2011). Basic immunology and immune system disorders. *Treating Autoimmune Disease with Chinese Medicine*, (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06974-1.00001-4>
12. Zavdy, O., Shoenfeld, Y., & Amital, H. (2013). Natural Autoantibodies-Homeostasis, Autoimmunity, and Therapeutic Potential. *Autoantibodies: Third Edition (Third Edition)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00003-4>

13. Siloși, I., Siloși, C. A., Boldeanu, M. V., Cojocaru, M., Biciușcă, V., Avrămescu, C. S., ... Folcuți, R. M. (2016). The role of autoantibodies in health and disease. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57(2), 633–638.
14. A. Shimizu, N. Takahashi, Y. Yaoita, and T. Honjo, "Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain," *Cell*, vol. 28, no. 3, pp. 499–506, 1982.
15. Schroeder, H. W. J., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S41–S52.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046.Structure>
16. Tomlinson M. Ian, *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, 1998,
<https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0339>
17. M.-P. Lefranc, "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Genes," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 18, pp. 100–116, 2001.
18. S. Malcolm, P. Barton, C. Murphy, M. A. Ferguson-Smith, D. L. Bentley, and T. H. Rabbitts, "Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 16, pp. 4957–4961, Aug. 1982
19. MAK, T., & SAUNDERS, M. (2006). The Immunoglobulin Genes. *The Immune Response*, 179–208. <https://doi.org/10.1016/b978-012088451-3/50010-7>
20. Gellert, M. (2002). V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 101–132.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203>
21. Kracker, S., & Radbruch, A. (2004). Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 271(1), 149–159. <https://doi.org/10.1385/1-59259-796-3:149>
22. Manuscript, A. (2009). Hot Pepper Variety Profiles. Office, 8000–8000.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248.Mechanism>
23. Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2001). B c d p, 595–621.

24. . LeBien, T. W. (n.d.). 124 - B Cell Development. Fetal and Neonatal Physiology, 2-Volume Set (Fifth Edition). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00124-4>
25. Tucker W. LeBien, (2000)., Fates of human B-cell precursors., *Blood*, Volume96, Number 1. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.1.9>
26. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
27. Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B cells, antibodies, and more. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
28. Vale, A. M., Kearney, J. F., Nobrega, A., & Schroeder, H. W. (2015). Development and Function of B Cell Subsets. *Molecular Biology of B Cells: Second Edition (Second Edition)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397933-9.00007-2>
29. Niiro, H., & Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), 945–956. <https://doi.org/10.1038/nri955>
30. Pillai, S., Cariappa, A., & Moran, S. T. (2005). Marginal Zone B Cells. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 161–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728>
31. Melchers, F. (2013). B Cell Development: How to Become One of the Chosen Ones. *The Autoimmune Diseases: Fifth Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00009-5>
32. Shapiro-Shelef, M., & Calame, K. C. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 230–242. <https://doi.org/10.1038/nri1572>
33. Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., & Toellner, K. M. (2016). Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunological Reviews*, 270(1), 8–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12396>
34. Vale, A. M., Kearney, J. F., Nobrega, A., & Schroeder, H. W. (2015). Development and Function of B Cell Subsets. *Molecular Biology of B Cells: Second Edition (Second Edition)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397933-9.00007-2>
35. Quách, T. D., Rodríguez-Zhurbenko, N., Hopkins, T. J., Guo, X., Hernández, A. M., Li, W., & Rothstein, T. L. (2016). Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations,

Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1060–1069. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501843>

36. Baumgarth, N. (2017). A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *The Journal of Immunology*, 199(10), 3387–3394. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700943>

37. Rothstein, T. L., Griffin, D. O., Holodick, N. E., Quach, T. D., & Kaku, H. (2013). Human B-1 cells take the stage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1285(1), 97–114. <https://doi.org/10.1111/nyas.12137>

38. Piris, M. A., Onaindía, A., & Mollejo, M. (2017). Best Practice & Research Clinical Haematology Splenic marginal zone lymphoma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 30(1–2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2016.09.005>

39. Arcaini, L., Rossi, D., & Paulli, M. (2016). Splenic marginal zone lymphoma: From genetics to management. *Blood*, 127(17), 2072–2081. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-624312>

40. Du, M. Q. (2015). Pathogenesis of splenic marginal zone lymphoma. *Pathogenesis*, 2(4), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.pathog.2015.07.001>

41. Santos, T. S. dos, Tavares, R. S., & Farias, D. L. C. de. (2017). Splenic marginal zone lymphoma: a literature review of diagnostic and therapeutic challenges. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 39(2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.014>

42. Oscier, D., Owen, R., & Johnson, S. (2005). Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Reviews*, 19(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.03.002>

43. Wotherspoon, A., Sena Teixeira Mendes, L., Du, M.-Q., & Matutes, E. (2014). Splenic marginal zone lymphoma: a review of the clinical presentation, pathology, molecular biology, and management. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, 29. <https://doi.org/10.2147/blctt.s49373>

44. Thieblemont, C., Felman, P., Callet-Bauchu, E., Traverse-Glehen, A., Salles, G., Berger, F., & Coiffier, B. (2003). Splenic marginal-zone lymphoma: A distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncology*, 4(2), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)00981-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)00981-1)

45. Sih, B. T., Mudhafar, A., Alqasim, Z., & Ajil, A. H. (2017). Leukocytes , Lymphocytes and Smokers Compared To Non-Smoker. *Iraqi Journal of Hematology* |, 6, 1–5. <https://doi.org/10.4103/ijh.ijh>
46. Behdad, A., & Bailey, N. G. (2014). Diagnosis of splenic B-cell lymphomas in the bone marrow: A review of histopathologic, immunophenotypic, and genetic findings. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 138(10), 1295–1301. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0291-CC>
47. Rossi, D., Trifonov, V., Fangazio, M., Brusca, A., Rasi, S., Spina, V., ... Gaidano, G. (2012). The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: Activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *Journal of Experimental Medicine*, 209(9), 1537–1551. <https://doi.org/10.1084/jem.20120904>
48. Salido, M., Baró, C., Oscier, D., Stamatopoulos, K., Dierlamm, J., Matutes, E., ... Solé, F. (2010). Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: A multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*, 116(9), 1479–1488. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-267476>
49. Baliakas, P., Strefford, J. C., Bikos, V., Parry, M., Stamatopoulos, K., & Oscier, D. (2015). Splenic marginal-zone lymphoma: Ontogeny and genetics. *Leukemia and Lymphoma*, 56(2), 301–310. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.919636>
50. M. J. Kiel et al., “Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 9, pp. 1553–1565, Aug. 2012.
51. Parry, M., Rose-Zerilli, M. J. J., Ljungström, V., Gibson, J., Wang, J., Walewska, R., ... Strefford, J. C. (2015). Genetics and prognostication in splenic marginal zone lymphoma: Revelations from deep sequencing. *Clinical Cancer Research*, 21(18), 4174–4183. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2759>
52. V. Spina and D. Rossi, “Molecular pathogenesis of splenic and nodal marginal zone lymphoma,” *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 30, no. 1, pp. 5–12, 2017
53. D. Rossi et al., “Alteration of BIRC3 and multiple other NF-κB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma,” *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4930–4934, 2011.

54. Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G., & Lefranc, M. P. (2004). IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-Region amino acid properties. *Journal of Molecular Recognition*, 17(1), 17–32. <https://doi.org/10.1002/jmr.647>
55. Bikos, V., Karypidou, M., Stalika, E., Baliakas, P., Xochelli, A., Sutton, L. A., ... Stamatopoulos, K. (2016). An immunogenetic signature of ongoing antigen interactions in splenic marginal zone lymphoma expressing IGHV1-2*04 receptors. *Clinical Cancer Research*, 22(8), 2032–2040. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1170>
56. Bikos, V., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Davis, Z., Hockley, S., Traverse-Glehen, A., ... Stamatopoulos, K. (2012). Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: Ontogenetic implications. *Leukemia*, 26(7), 1638–1646. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.3>
57. Zibellini, S., Capello, D., Forconi, F., Marcatili, P., Rossi, D., Rattotti, S., ... Arcaini, L. (2010). Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica*, 95(10), 1792–1796. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.025437>
58. Bikos, V., Stalika, E., Baliakas, P., Darzentas, N., Davis, Z., Traverse-Glehen, A., ... Stamatopoulos, K. (2012). Selection of antigen receptors in splenic marginal-zone lymphoma: Further support from the analysis of the immunoglobulin light-chain gene repertoire. *Leukemia*, 26(12), 2567–2569. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.207>
59. Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X. J., ... Stamatopoulos, K. (2012). Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: A molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*, 119(19), 4467–4475. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393694>
60. Ababou, M., Mahtat, E. M., Jennane, S., Elmaaroufi, H., Mikdame, M., & Doghmi, K. (2019). Splenic marginal zone lymphoma associated with hepatitis B virus infection, remission after viral treatment, and splenectomy: A case report and review of the literature. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, (xxxx), 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2019.05.007>
61. Peveling-Oberhag, J., Arcaini, L., Hansmann, M. L., & Zeuzem, S. (2013). Hepatitis C-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas. Epidemiology, molecular signature and clinical management. *Journal of Hepatology*, 59(1), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.018>

62. Vallisa D et al. Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience. *J Clin Oncol*. 2005;23, 468–473.
63. Mele A et al. Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas: an Italian multicenter case-control study. *Blood*. 2003;102, 996–999.
64. Warsame, A. A., Aasheim, H. C., Nustad, K., Trøen, G., Tierens, A., Wang, V., ... Delabie, J. (2011). Splenic marginal zone lymphoma with VH1-02 gene rearrangement expresses poly- and self-reactive antibodies with similar reactivity. *Blood*, 118(12), 3331–3339.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341651>
65. Chu, C. C., CATERA, R., Zhang, L., Didier, S., Agagnina, B. M., Damle, R. N., ... Chiorazzi, N. (2010). Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: Implications for patient outcome and cell of origin. *Blood*, 115(19), 3907–3915. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-244251>
66. Fonte, E., Agathangelidis, A., Reverberi, D., Ntoufa, S., Scarfò, L., Ranghetti, P., ... Muzio, M. (2015). Toll-like receptor stimulation in splenic marginal zone lymphoma can modulate cell signaling, activation and proliferation. *Haematologica*, 100(11), 1460–1468.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2014.119933>
67. Detailed Functional Characterization of Splenic Marginal Zone Lymphoma: Uncovering Links between the Epigenetic and the Signaling Machinery Article, *Blood* 134(Supplement_1):1512-1512 · November 2019, DOI: 10.1182/blood-2019-12790
68. Meffre, E., Schaefer, A., Wardemann, H., Wilson, P., Davis, E., & Nussenzweig, M. C. (2004). Surrogate Light Chain Expressing Human Peripheral B Cells Produce Self-reactive Antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 145–150. <https://doi.org/10.1084/jem.20031550>
69. Wardemann, H., Hammersen, J., & Nussenzweig, M. C. (2004). Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 191–199.
<https://doi.org/10.1084/jem.20040818>
70. Reed, J. H., Jackson, J., Christ, D., & Goodnow, C. C. (2016). Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *Journal of Experimental Medicine*, 213(7), 1255–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20151978>

71. Wasnik, S., Kantipudi, S., Kirkland, M. A., & Pande, G. (2016). Enhanced Ex Vivo Expansion of Human Hematopoietic Progenitors on Native and Spin Coated Acellular Matrices Prepared from Bone Marrow Stromal Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7231567>
72. Simon-Gabriel, C. P., Foerster, K., Saleem, S., Bleckmann, D., Benkisser-Petersen, M., Thornton, N., ... Zirlik, K. (2018). Microenvironmental stromal cells abrogate NF- κ B inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 103(1), 136–147. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.165381>
73. James, K., & Bell, G. T. (1987). Human monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods*, 100(1–2), 5–40. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90170-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90170-0)
74. Siemer, D., Kurth, J., Lang, S., Lehnerdt, G., Stanelle, J., & Küppers, R. (2008). EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Molecular Immunology*, 45(11), 3133–3141. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.03.002>
75. Borche, L., Lim, A., Binet, J. L., & Dighiero, G. (1990). Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood*, 76(3), 562–569. <https://doi.org/10.1182/blood.v76.3.562.bloodjournal763562>
76. Minici C et al. Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8, 15746
77. M. Torres, R. May, M. D. Scharff, and A. Casadevall, “Variable-Region-Identical Antibodies Differing in Isotype Demonstrate Differences in Fine Specificity and Idiotype,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 4, pp. 2132 LP – 2142, Feb. 2005.
78. Feng, J. Q., Mozdzanowska, K. & Gerhard W. Complement component C1q enhances the biological activity of influenza virus hemagglutinin-specific antibodies depending on their fine antigen specificity and heavy-chain isotype. *J Virol*. 2002;76:1369–1378.
79. Cooper LJ et al. Role of heavy chain constant domains in antibody-antigen interaction. Apparent specificity differences among streptococcal IgG antibodies expressing identical variable domains. *J Immunol*. 1993;150:2231–2242.
80. Voinchet, H. et al. [Splenic marginal zone lymphoma and autoimmunity: report of six cases]. *La Rev. Med. interne* 31, 4–11 (2010).

81. Reveille, J. D. (2004). Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 13(5), 290–297. <https://doi.org/10.1191/0961203303lu1015oa>
82. Haynes, D.C., Gershwin, M.E., Robbins, D.L., Miller, J.J., 3rd & Cosca D. Autoantibody profiles in juvenile arthritis. *J Rheumatol.* 1986;13:358-363.
83. Shrivastav, M., Mittal, B., Aggarwal, A., & Misra, R. (2002). Autoantibodies against cytoskeletal proteins in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 21(6), 505–510. <https://doi.org/10.1007/s100670200124>
84. Sebode, M., Weiler-Normann, C., Liwinski, T., & Schramm, C. (2018). Autoantibodies in autoimmune liver disease-clinical and diagnostic relevance. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00609>
85. Pedreira S, Sugai E, Moreno ML et al. “Significance of smooth muscle/anti-actin autoantibodies in celiac disease”. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2005;35:83–93
86. Pisetsky, D.S. & Fairhurst AM. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity.* 2007;40:281-284
87. DHAM S, ANAND A, DHANANJAYAN G, SHETTY K. Microsomal and Thyroglobulin Antibodies in Thyroid Disorders. *Med J Armed Forces India.* 2017;51(4):247-250. doi:10.1016/s0377-1237(17)30984-x
88. Chen GF, Xu TH, Yan Y, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(9):1205-1235. doi:10.1038/aps.2017.28
89. Wu, J., & Li, L. (2016). Autoantibodies in Alzheimer’s disease: Potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *Journal of Biomedical Research*, 30(5), 361–372. <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20150131>
90. Murphy MP, Iii HL. Alzheimer’s Disease and the Beta-Amyloid Peptide. *J Alzheimer’s Dis.* 2010;19(1):1-17. doi:10.3233/JAD-2010-1221.Alzheimer
91. Itoh Y, Reichlin M. Antibodies to Carbonic Anhydrase in Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.* 1992;35(1):73-82. doi:10.1002/art.1780350112

92. Schwartz-Albiez R, Monteiro RC, Rodriguez M, Binder CJ, Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *ClinExpImmunol*. 2009;158(SUPPL. 1):43-50. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04026.x
93. Zhao-Hua Zhou, Athanasios G. Tzioufas and ALN. Properties and Function of Polyreactive Antibodies and Polyreactive Antigen-Binding B Cells. *J Autoimmun*. 2007;29(4):219–228
94. Parker Medicine, C. W. (1981). Hapten immunology and allergic reactions in humans. *Arthritis & Rheumatism*, 24(8), 1024–1036. <https://doi.org/10.1002/art.1780240808>
95. Papac-Milicevic, N., Busch, C. J. L., & Binder, C. J. (2016). Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. *Advances in Immunology*, 131, 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.02.001>
96. Hardt, U., Larsson, A., Gunnarsson, I., Clancy, R. M., Petri, M., Buyon, J. P., ...Grönwall, C. (2018). Autoimmune reactivity to malondialdehyde adducts in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity and nephritis. *Arthritis Research and Therapy*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1530-2>
97. Grönwall, C., Amara, K., Hardt, U., Krishnamurthy, A., Steen, J., Engström, M., ... Silverman, G. J. (2017). Autoreactivity to malondialdehyde-modifications in rheumatoid arthritis is linked to disease activity and synovial pathogenesis. *Journal of Autoimmunity*, 84, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.06.004>
98. Que, X., Widhopf, G. F., Amir, S., Hartvigsen, K., Hansen, L. F., Woelkers, D., ... Witztum, J. L. (2013). IGHV1-69-Encoded Antibodies Expressed in Chronic Lymphocytic Leukemia React with Malondialdehyde-Acetaldehyde Adduct, an Immunodominant Oxidation-Specific Epitope. *PLoS ONE*, 8(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065203>
99. Gounari, M., Ntoufa, S., Apollonio, B., Papakonstantinou, N., Ponzoni, M., Chu, C. C., ... Ghia, P. (2015). Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood*, 125(23), 3580–3587. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603217>
100. Sumazaki, R. et al. Monoclonal antibody against bacterial lipopolysaccharide crossreacts with DNA-histone. *Clin Exp Immunol*. 1986;66:103-110.

101. Grayzel, A., Solomon, A., Aranow, C. & Diamond B. Antibodies elicited by pneumococcal antigens bear an anti-DNA--associated idiotype. *J Clin Invest.* 1991;87:842-846.
102. Izui, S., Kobayakawa, T., Zryd, M.J., Louis, J. & Lambert PH. Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice; II. Correlation between anti-DNA induction and polyclonal antibody formation by various polyclonal B lymphocyte activators. *J Immunol.* 1977;119:2157-2162.
103. Hermine, O., Lefrère, F., Bronowicki, J. P., Mariette, X., Jondeau, K., Eclache-Saudreau, V., ... Troussard, X. (2002). Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, 347(2), 89–94.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa013376>
104. Hasni, S. A., Ippolito, A., & Illei, G. G. (2011). *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Oral Diseases*, 17(7), 621–627. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01796.x>
105. Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J., Correa, N. E., & Montoya-Ortíz, G. (2013). AUTOIMMUNITY From Bench to Bedside. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*.
106. Sherbet, G. (2009). Bacterial Infections and the Pathogenesis of Autoimmune Conditions. *British Journal of Medical Practitioners*, 2(1), 6–13.
- 107., N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N., & Hernández, A. M. (2017). Defining natural antibodies. *Frontiers in Immunology*, 8(JUL), 2–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00872>
108. Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown, M. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *NIH Public Access. Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
109. Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R. C., Rodriguez, M., Binder, C. J., & Shoenfeld, Y. (2009). Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 158(SUPPL. 1), 43–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04026.x>
110. Voinchet, H., Etienne, G., Ghiringelli, C. B., Pellegrin, J. L., Viallard, J. F., Parrens, M., & Longy-Boursier, M. (2010). Lymphomes spléniques de la zone marginale et auto-immunité : à propos de six cas. *Revue de Medecine Interne*, 31(1), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.05.003>

111. Mehraein, Y., Lennerz, C., Ehlhardt, S., Kemberger, K., Ojak, A., & Zang, K. D. (2004). Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Modern Pathology*, 17(7), 781–789. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800119>
112. Burns, J. (1983). Persistent Cytomegalovirus infection-The etiology of Sjogren's Syndrome. *Medical Hypotheses*, 10(4), 451–460. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(83\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(83)90011-7)
113. Aarnisalo, J., Veijola, R., Vainionpää, R., Simell, O., Knip, M., & Ilonen, J. (2008). Cytomegalovirus infection in early infancy: Risk of induction and progression of autoimmunity associated with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 51(5), 769–772. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-0945-8>
114. Rossmann, S. N., Ph, D., Mahoney, D. H., & Morad, A. B. (2001). Infantile Cytomegalovirus-Associated Autoimmune Hemolytic Anemia, 23(5).
115. Toplak, N., & Avčin, T. (2009). Influenza and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173, 619–626. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04759.x>
116. Waites, K. B., Balish, M. F., & Atkinson, T. P. (2008). New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiology*, 3(6), 635–648. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.6.635>
117. Atkinson, T. P., Balish, M. F., & Waites, K. B. (2008). Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 956–973. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x>
118. Craig, V. J., Arnold, I., Gerke, C., Huynh, M. Q., Wündisch, T., Neubauer, A., ... Müller, A. (2010). Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood*, 115(3), 581–591. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-228015>
119. Smyk, D. S., Koutsoumpas, A. L., Mytilinaiou, M. G., Rigopoulou, E. I., Sakkas, L. I., & Bogdanos, D. P. (2014). *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: Cause or bystander. *World Journal of Gastroenterology*, 20(3), 613–629. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i3.613>

120. CATERA, R., SILVERMAN, G. J., HATZI, K., SEILER, T., DIDIER, S., ZHANG, L., CHIORAZZI, N. (2008). Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Molecular Medicine*, 14(11–12), 665–674. <https://doi.org/10.2119/2008-00102.CATERA>

121. HERVE M ET AL. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest*. 2005;115, 1636–1643.