



Πτυχιακή εργασία

Τίτλος

«Ανάλυση ανοσογενετικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας για το χαρακτηρισμό του φαινομένου της κλωνικής εξέλιξης σε ασθενείς με κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων»

Εκπόνηση : Γαλανόπουλος Αχιλλέας Παναγιώτης του Αθανασίου
Α.Μ. 01253

Τριμελής Επιτροπή
Χατζηδημητρίου Αναστασία
Γιακουντής Αντώνιος
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Λάρισα Σεπτέμβριος 2020

«...τίποτα στη Βιολογία δεν έχει νόημα... παρά υπό το φως της Εξέλιξης ...»

Theodosius Dobzhansky

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας για την ολοκλήρωση των προπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων και η διεξαγωγή τους έλαβε χώρα στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (IN.E.B.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογίας Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α.) στη Θεσσαλονίκη, υπό τη διεύθυνση του κ. **Σταματόπουλου Κωνσταντίνου** στον οποίο οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω, επίσης, στην κα **Χατζηδημητρίου Αναστασία**, ερευνήτρια και επικεφαλή της ομάδας Ανοσογενετικής μελέτης του IN.E.B. για τη θερμή υποδοχή, τη συνεχή υποστήριξη και βοήθεια, στοιχεία που συνέβαλαν στη διαμόρφωση μιας πολύτιμης συνεργασίας καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής κκ **Γιακουντή Αντώνιο** και **Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο** για την συνεχή τους υποστήριξη, όπως και σε **όλους τους καθηγητές** της σχολής για όλα όσα μου πρόσφεραν τα χρόνια των σπουδών μου.

Ακόμη, ευχαριστώ ειλικρινά τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή κ. **Αγαθαγγελίδη Ανδρέα** καθώς και τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. **Πεχλιβάνη Νικόλαο**, τόσο για την ενεργή συμβολή τους στην εκπαίδευσή μου για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και την εκπόνηση του βιοπληροφορικού εργαλείου αντίστοιχα, όσο και για την «Ιώβεια» υπομονή τους, καθώς οι συμβουλές τους υπήρξαν καθοριστικές για τη διαμόρφωση του κειμένου.

Θερμές ευχαριστίες θα πρέπει να αποδώσω και στις υποψήφιες Διδάκτορες **Γαλιγαλίδου Χρυσή**, **Βλαχονικόλα Ελισσάβετ**, **Γεμενετζή Κατερίνα**, **Ζαραγόζα Λάουρα**, **Σοφού Ηλέκτρα**, στον υποψήφιο διδάκτορα **Γκέκα Γιάννη** καθώς και σε **ΟΛΑ τα μέλη του εργαστηρίου** για την βοήθεια, στήριξη και ομαλή συνεργασία.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου και στους γονείς μου **Ζαφειρή** και **Θανάση**, που με την αμέριστη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την υπομονή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου, συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση των στόχων μου αλλά και για το σημαντικότερο, το οποίο δεν διδάσκεται στα θρανία αλλά γαλουχείται...

...Το να με κάνουν **ΑΝΘΡΩΠΟ**.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	7
1.α Εισαγωγή και βασικές έννοιες	7
1.β Κύτταρα και Όργανα του Ανοσοποιητικού Συστήματος	7
1.γ Έμφυτη Ανοσία.....	9
1.δ Προσαρμοστική Ανοσία.....	9
Τ λεμφοκύτταρα	10
1.ε Ρόλος των Β λεμφοκυττάρων	10
2. Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	12
2.α Δομική περιγραφή και λειτουργικότητα	12
2.β Γενετική οργάνωση γονιδίων των ανοσοσφαιρινών	14
2.γ Αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών	15
3. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	17
3.α Αντιγονοανεξάρτητη φάση διαφοροποίησης	17
3.β Αντιγονοεξαρτώμενη φάση διαφοροποίησης	18
4. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	21
4.α Γενικά.....	21
4.β Πρόγνωση, κλινικοί και βιολογικοί δείκτες.....	21
Κλίμακα Rai.....	22
Κλίμακα Binet	22
Βιολογικοί δείκτες και αξιολόγηση πρόγνωσης.....	22
Ο φθορίζων <i>in situ</i> υβριδισμός (<i>fluorescence in situ hybridization, FISH</i> ³⁹).....	22
Οι δείκτες CD38 και ZAP70.....	23
Γενετικοί παράγοντες.....	23
Το μεταλλακτικό φορτίο του αναδιαταγμένου IGHV.....	23
Ρεπερτόριο και Στερεοτυπία του BκΥ.....	24
5. ΚΛΩΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ	25
5.α Γενετική ετερογένεια σε επίπεδο κλώνου και εξέλιξη	25
5.β Ενδοκλωνική Ετερογένεια στα γονίδια της μεταβλητής περιοχής της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης	26

5.γ Θεραπεία και διαχείριση κλωνικής εξέλιξης.....	27
5.δ Ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση σε υποκλωνικό επίπεδο.	27
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	28
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	29
Ομάδα μελέτης.....	29
Υλικά και Μέθοδοι Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων	29
Απομόνωση RNA.....	30
Σύνθεση cDNA.....	30
Ενίσχυση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης	31
Απομόνωση DNA από Gel (Gel Extraction).....	32
Ποσοτικοποίηση DNA των προϊόντων PCR.....	33
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς.....	33
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Προετοιμασία Βιβλιοθηκών.....	33
Ποσοτικός/ποιοτικός έλεγχος βιβλιοθηκών.....	35
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – δημιουργία ισομοριακού μίγματος.....	36
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Real Time PCR.....	36
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Τελική προετοιμασία και αλληλούχηση σε MiSeq (Illumina).....	36
Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Ανάλυση δεδομένων.....	37
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΟΥ ΕΡΓΑΛΕΙΟΥ	38
ΓΕΝΙΚΑ.....	38
Καρτέλα “Data Analysis”	40
Καρτέλα “Loaded Data”	43
Καρτέλα “Clonotypes”	44
Καρτέλα “Related to Dominant”	45
Καρτέλα “Visualization”	47
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
Ασθενής 1 (Δείγματα 1P-10P)	54
Ασθενής 2 (Δείγματα 2P-7P)	56
Ασθενής 3 (Δείγματα 3P-8P)	59
Ασθενής 4 (4P-9P).....	62
Ασθενής 5 (Δείγματα 5P-6P)	64
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

Περίληψη

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι χρόνια κακοήθης νεοπλασία ώριμων Β λεμφοκυττάρων. Βασικό χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η παρουσία μείζονος κακοήθους Β κυτταρικού κλώνου μοναδικής αντιγονικής ειδικότητας, τα κύτταρα του οποίου αντικατοπτρίζουν το 90% των κυττάρων του αίματος. Παρ' όλο που η παθογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη του Β κυτταρικού υποδοχέα (ΒκΥ) συσχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη της ασθένειας μέσω της αντιγονικής αλληλεπίδρασης. Η αξιολόγηση του ρεπερτορίου της ΧΛΛ περιγράφει επιλεκτικότητα στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV αποτελώντας ένδειξη για ύπαρξη αντιγονικής επιλογής. Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ εκφράζουν πανομοιότυπους ή αρκετά όμοιους ΒκΥ και κατατάσσονται σε υποσύνολα βάσει στερεοτυπίας του ΒκΥ, παράγοντας που υποδεικνύει την αναγνώριση κοινών αντιγόνων. Μελέτες κλωνικής αρχιτεκτονικής σε περιπτώσεις στερεοτύπων κλωνοτυπικών υποσυνόλων επισήμαναν την ύπαρξη ισχυρής ενδοκλωνικής ετερογένειας σε επίπεδο ανοσοσφαιρίνης. Υποστηρίζεται ότι η αντιγονική επιλογή «καθοδηγεί» εξελικτικά τον νεοπλασματικό κλώνο πλαισιώνοντας θετική επιλογή για συγκεκριμένα πρότυπα σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ). Επίσης, η θεραπεία θα μπορούσε να αποτελεί παράγοντα εξωτερικής «τεχνητής επιλογής» που προωθεί εξελικτικά συγκεκριμένα πρότυπα ΣΥΜ. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η ανάλυση της κλωνικής αρχιτεκτονικής και της ενδοκλωνικής ετερογένειας τόσο πριν όσο και μετά τη θεραπεία.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η ανάλυση ανοσογενετικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας για το χαρακτηρισμό του φαινομένου της κλωνικής εξέλιξης σε 5 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα για κάθε ασθενή πριν και μετά την εφαρμογή θεραπείας αντίστοιχα. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν συνοπτικά αφορούν αρχική κατεργασία των δειγμάτων (απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων, εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA), ενίσχυση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ, την κατασκευή βιβλιοθηκών, και τη διαδικασία αλληλούχησης με τεχνικές νέας γενιάς. Τα ανοσογενετικά δεδομένα μεγάλης κλίμακας χαρακτηρίστηκαν με τη διαδουκτιακή πλατφόρμα του IMGT και αναλύθηκαν ως προς κλωνική αρχιτεκτονική μέσω νέου βιοπληροφορικού εργαλείου “clonalRevolution” που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της μελέτης.

Το βασικό συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι κύριος κλωνότυπος παραμένει ίδιος και στα δύο χρονικά στιγμότυπα υποδηλώνοντας ότι η θεραπεία δεν επηρέασε την κλωνική αρχιτεκτονική σε σημαντικό βαθμό. Οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι που ανιχνεύθηκαν παρουσίασαν εξαιρετικά χαμηλότερες συχνότητες σε σχέση με τον κύριο κλωνότυπο, ενώ στην πλειοψηφία των περιπτώσεων φαίνεται σχετική μείωση της ενδοκλωνικής ετερογένειας μετά τη θεραπεία. Η ενδοκλωνική ετερογένεια σε κάθε δείγμα φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με το σχετικό μέγεθος του κύριου κλωνότυπου.

Τέλος, υπογραμμίζεται η σημαντικότητα των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς σε συνδυασμό με ειδικά βιοπληροφορικά εργαλεία προσφέροντας τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της κλωνικής αρχιτεκτονικής με μεγάλη εγκυρότητα, ευαισθησία και ακρίβεια.

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a chronic malignancy of mature B cells. The main characteristic of this disease is the presence of a major malignant B cell clone of unique antigenic specificity, representing approximately the 90% of peripheral blood cells. Although pathogenesis is not clear yet, B cell receptor (BcR) immunoglobulin (IG) is intensively associated with the disease progress through the antigenic interaction. The analysis of CLL repertoire indicates that specific IGHV genes are expressed in a large scale reflecting the antigenic selection for those genes. In addition, many CLL patients have (quasi)identical BcR IGs. As a result, they are classified in stereotyped subsets which could be correlated with the recognition of common antigens.

Studies of clonal architecture in stereotyped subset cases reveal the existence of important intraclonal diversification in immunogenetic level. It seems that malignant clone's progress is guided by antigenic selection in evolutionary level, as specific somatic hypermutation (SHM) "driver" patterns framing a positive selection. Furthermore, therapy is a factor of selective pressure that may promote specific patterns of SHM in clonal evolution. Hence, the analysis of clonal architecture and intraclonal diversification in different time points, before and after therapy is considered necessary.

The purpose of this thesis was the analysis of large scale immunogenetic data for the characterization of clonal evolution phenomenon in 5 patients with CLL. Sampling took place above 2 different time points, diagnosis and relapse for every patient. The process steps concern isolation of single nuclear cells, RNA extraction, cDNA synthesis, amplification of BcR IGH rearrangements with multiplex PCR, library preparation and NGS sequencing with Illumina's MiSeq platform. The large scale immunogenetic data were characterized with the online platform of IMGT. Last but not least, identification and visualization of intraclonal diversification took place with the novel tool "clonalRevolution".

The main message arised was that the the major clonotype is same in both time points for every patient, suggesting that therapy didn't affect the clonal architecture significantly. The related clonotypes that were detected had extremely low frequencies in comparison with the major clonotype. Intraclonal Diversification was associated with the relative size of major clonotype in every sample, and in most cases seemed to be decreased.

Finally, it is of great importance to underline next generation sequencing technologies in combination with bioinformatic tools giving the opportunity of clonal architecture characterization with great validity, sensitivity and precision.

1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.α Εισαγωγή και βασικές έννοιες

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί το συστημικό αμυντικό μηχανισμό του ανθρώπινου οργανισμού και περιλαμβάνει κυτταρικούς τύπους και χημικά μόρια, τα οποία συνεργάζονται στο πλαίσιο μηχανισμών με γενική ή εξειδικευμένη δράση. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αντιμετώπιση περιβαλλοντικών παραγόντων και παθογόνων μικροοργανισμών που διαταράσσουν την ομοιόσταση του οργανισμού με προεκτάσεις για την επιβίωσή του. Η αποτελεσματικότητά του έγκειται στη δυνατότητα αναγνώρισης ενός τεράστιου εύρους παθογόνων και στην ενεργοποίηση άνοσων απαντήσεων με σκοπό την εξάλειψή τους. Η ικανότητα που έχει ο οργανισμός να αναγνωρίζει οποιαδήποτε ξένη προς αυτόν ουσία και να αντιδρά αποτελεσματικά εναντίον της καλείται ανοσία¹.

Κάθε χημική ένωση και μοριακή δομή που μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση άνοσης απάντησης καλείται αντιγόνο. Η χημική φύση των αντιγόνων είναι κυρίως πρωτεϊνική, μπορούν όμως να είναι πολυσακχαρίτες και σε λιγότερες περιπτώσεις λιπίδια ή νουκλεϊκά οξέα. Σε ειδικές περιπτώσεις, συστατικά του οργανισμού μπορεί να προκαλέσουν την ενεργοποίηση άνοσης απάντησης και για το λόγο αυτό καλούνται αυτο-αντιγόνα. Τα αντιγόνα, λοιπόν, διακρίνονται σε «ξένα» που αφορούν παράγοντες οι οποίοι εισβάλλουν από το εξωτερικό περιβάλλον και σε «εαυτά» που αφορούν δομές ή ουσίες του ίδιου του οργανισμού. Η αποφυγή εκδήλωσης άνοσων απαντήσεων εναντίον στοιχείων του οργανισμού ελέγχεται από ειδικούς μηχανισμούς¹.

Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά των παθογόνων, δύο από τα πιο σημαντικά είναι η ανοσογονικότητα και η αντιγονικότητα, τα οποία αν και σχετίζονται είναι διακριτά. Η ανοσογονικότητα αφορά την ικανότητα ενός μορίου να επάγει την ενεργοποίηση άνοσης απάντησης, ενώ η αντιγονικότητα αφορά την ικανότητα ενός μορίου να αναγνωρίζεται μέσω πρόσδεσης από τα τελικά προϊόντα της άνοσης απάντησης. Όταν ένα μόριο έχει ανοσογονικότητα έχει σίγουρα και αντιγονικότητα, ενώ το αντίθετο δεν συμβαίνει πάντα. Για παράδειγμα, τα απτένια διαθέτουν αντιγονικότητα, αλλά δεν μπορούν από μόνα τους να επάγουν μια άνοση απάντηση. Η αντιγονικότητα εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος, η χημική σύνθεση, η ετερογένεια και το πόσο «ξένη» είναι μια ουσία για τον οργανισμό¹.

1.β Κύτταρα και Όργανα του Ανοσοποιητικού Συστήματος

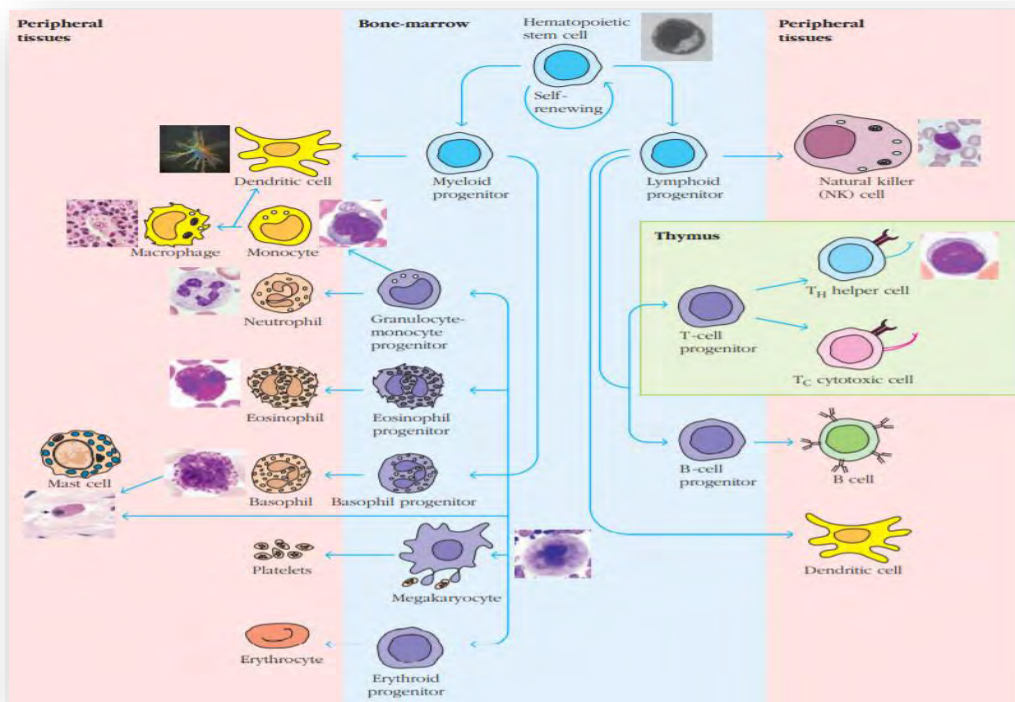
Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι οργανωμένο σε διάφορα επίπεδα περιλαμβάνοντας όργανα και κυτταρικούς πληθυσμούς, τα οποία δρουν σε πλήρη συντονισμό. Τα πρωτογενή όργανα είναι ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας όπου παρέχεται το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ωρίμανση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα. Τα δευτερογενή όργανα είναι κατάλληλες ανατομικές περιοχές για την αλληλεπίδραση μεταξύ στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος και αντιγόνων. Τέτοια όργανα είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, οι αμυγδαλές και ο λεμφικός ιστός κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα¹.

Στην άνοση απάντηση συμμετέχουν κύτταρα που ονομάζονται λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα, τα οποία εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και της λέμφου. Ο κυτταρικός πρόγονος όλων των κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (pluripotential hemopoietic stem cells, PHSCs). Πρόκειται για βλαστοκύτταρα με ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης, ενώ παράλληλα έχουν τη δυνατότητα

διαφοροποίησης σε αρκετούς τύπους κυττάρων. Από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα προκύπτουν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (multipotential progenitors, MPPs), τα οποία έχουν χάσει τη δυνατότητα της αυτοανανέωσης. Το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης αφορά σε δύο βασικούς πληθυσμούς περιορισμένης εξελικτικής εμβέλειας. Πρόκειται για τους κυτταρικούς τύπους του κοινού μυελοειδούς προγόνου (common myeloid progenitor, CMP), από τον οποίο προκύπτουν όλα τα κύτταρα της μυελικής σειράς, και του κοινού λεμφοειδούς προγόνου (common lymphoid progenitor, CLP), ο οποίος διαφοροποιείται σε όλα τα κύτταρα της λεμφικής σειράς^{1,2}.

Από τον κοινό μυελοειδή πρόγονο προκύπτουν τα μονοκύτταρα (ή μακροφάγα) και τα κοκκιοκύτταρα (βασεόφιλα, ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα). Τα μακροφάγα όπως και τα ουδετερόφιλα δρουν ως φαγοκύτταρα στα πλαίσια γενικευμένων διαδικασιών άμυνας του οργανισμού και έχουν πολύ σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η αντιμετώπιση μικροβιακών λοιμώξεων^{1,2}.

Από τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο προκύπτουν τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK) όπως και τα λεμφοκύτταρα που διακρίνονται σε Β και Τ, με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις εξειδικευμένες άνοσες απαντήσεις. Η διαδικασία της διαφοροποίησης και η μετάβαση σε επιμέρους στάδια επηρεάζονται από τη δράση μεταγραφικών παραγόντων και την έκφραση ειδικών γονιδίων (lineage determining genes), καθώς και από ειδικούς αναπτυξιακούς παράγοντες και χημικά σήματα επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τις κυτοκίνες^{1,2} (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κύτταρα του Ανοσοποιητικού Συστήματος που προκύπτουν κατά την αιματοποίηση. Πηγή : Kuby, Immunology, 7th edition, W H Freeman & Co)

Υπάρχουν δύο κατηγορίες άνοσης απάντησης, η έμφυτη και η προσαρμοστική. Η έμφυτη άνοση σχετίζεται με γενικευμένη δράση ενάντια σε παθογόνα και βασίζεται κυρίως στα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα που έχουν φαγοκυτταρική δράση. Η προσαρμοστική άνοση σχετίζεται με εξειδικευμένη δράση ενάντια σε συγκεκριμένα αντιγόνα και αφορά κυρίως στη δράση των Β και Τ λεμφοκυττάρων¹.

1.γ Έμφυτη Ανοσία

Η έμφυτη ανοσία φαίνεται να προϋπήρχε εξελικτικά της προσαρμοστικής. Έχει γενικευμένη δράση, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας και είναι απαραίτητη για τον περιορισμό της εισόδου και εξάπλωσης των παθογόνων στον οργανισμό όσο συντίθενται και ενεργοποιούνται πιο εξειδικευμένα και αποτελεσματικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Στους μηχανισμούς που εμποδίζουν την είσοδο μικροοργανισμών συμμετέχει το δέρμα με την ιδιαίτερη ανατομική του σύσταση και τις αντι-μικροβιακές ουσίες που παράγονται από τους ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Σημαντική είναι και η δράση των βλεννογόνων αδένων, οι οποίοι επενδύουν κοιλότητες του οργανισμού και παγιδεύουν μικρόβια. Επιπλέον, υπάρχουν μη παθογόνοι μικροοργανισμοί που συντελούν στην άμυνα του οργανισμού, καθώς ανταγωνίζονται παθογόνα μικρόβια ως προς θρεπτικά συστατικά και το χώρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *Escherichia coli* που συμμετέχει στην φυσιολογική μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος^{1,2}.

Στους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται μετά την είσοδο των παθογόνων στον οργανισμό περιλαμβάνονται η φαγοκυττάρωση, η φλεγμονώδης αντίδραση, ο πυρετός και η δράση διαφόρων αντι-μικροβιακών ουσιών του πλάσματος. Κομβικό ρόλο στο πλαίσιο της έμφυτης άνοσης απάντησης έχουν τα φαγοκύτταρα, τα οποία φέρουν ειδικούς υποδοχείς που ονομάζονται PRRs (Pattern Recognition Receptors). Χαρακτηριστικό παράδειγμα PRR είναι οι TLRs (Toll-like receptors). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αναγνωρίζουν συντηρημένες μοριακές δομές στα παθογόνα που ονομάζονται PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) και πρόκειται για δομικά πρότυπα, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που συμμετέχουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Η πρόσδεση των PAMPs στους PRRs των φαγοκυττάρων οδηγεί στην φαγοκυττάρωση των παθογόνων και σε μια σειρά αντιδράσεων που χαρακτηρίζονται ως φλεγμονή¹⁻³.

1.δ Προσαρμοστική Ανοσία

Η προσαρμοστική ανοσία σχετίζεται με ειδική και πιο αποτελεσματική δράση σε σχέση με την έμφυτη ανοσία. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της προσαρμοστικής ανοσίας είναι η ικανότητα εξειδίκευσης με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε παθογόνου. Η εξειδίκευση επιτυγχάνεται μέσω της δράσης συγκεκριμένων τύπων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των Τ και Β λεμφοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα είναι εμπύρνα μικρά κύτταρα με σφαιρικό σχήμα. Κάθε φυσιολογικό λεμφοκύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του έναν ειδικό υποδοχέα που είναι επιφορτισμένος με την αναγνώριση και πρόσδεση του αντιγόνου, πυροδοτώντας ένα σύνολο σηματοδοτικών μονοπατιών στο εσωτερικό του κυττάρου που θα οδηγήσει τελικά στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό του. Το συγκεκριμένο μεμβρανικό μόριο στην περίπτωση των Τ λεμφοκυττάρων ονομάζεται Τ κυτταρικός υποδοχέας (ΤΚΥ), ενώ στα Β λεμφοκύτταρα ονομάζεται Β κυτταρικός υποδοχέας (ΒΚΥ). Βασικό δομικό και λειτουργικό τμήμα του Β κυτταρικού υποδοχέα αποτελεί το μόριο της ανοσοσφαιρίνης¹.

Κάθε προσαρμοστική άνοση απάντηση διακρίνεται σε επιμέρους στάδια που αφορούν στην αναγνώριση, ενεργοποίηση και εκτελεστική δράση εναντίον του παθογόνου. Αρχικά, το λεμφοκύτταρο αναγνωρίζει και προσδένει το αντιγόνο μέσω του αντιγονικού υποδοχέα. Αποτέλεσμα της πρόσδεσης είναι η ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό του. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ένας κλώνος κυττάρων με πανομοιότυπο υποδοχέα ειδικό για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Περαιτέρω διαφοροποίηση θα οδηγήσει στην παραγωγή εξειδικευμένων κυττάρων, τα οποία αξιοποιούνται κατά την εκτελεστική φάση για την εξάλειψη του συγκεκριμένου παθογόνου.

Ο μηχανισμός της προσαρμοστικής ανοσίας χαρακτηρίζεται από κάποιους συγκεκριμένους παράγοντες που την διαχωρίζουν από την έμφυτη ανοσία. Πιο συγκεκριμένα, η προσαρμοστική ανοσία έχει τα εξής ιδιαίτερα χαρακτηριστικά :

- **Εξειδίκευση**, καθώς οδηγεί στην παραγωγή κατάλληλων προϊόντων προκειμένου να υπάρξει ειδική απάντηση για κάθε διακριτό αντιγόνο.
- **Ετερογένεια**, καθώς απαιτείται συνεργασία ανάμεσα σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς και μηχανισμούς προκειμένου να αντιμετωπιστεί κάθε παθογόνο.

- **Ποικιλομορφία**, που αφορά στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει μεγάλη ποικιλία αντιγόνων.
- **Αυτορρύθμιση**, που αφορά στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να επανέρχεται σε κατάσταση ηρεμίας, μετά την αποτελεσματική αντιμετώπιση κάθε «απειλής».
- **Μνήμη**, καθώς η έκθεση σε κάθε συγκεκριμένο παθογόνο οδηγεί στην παραγωγή λεμφοκυττάρων μνήμης προκειμένου να υπάρξει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απάντηση σε μια πιθανή, μελλοντική έκθεση του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο.
- **Ανοχή**, που αφορά την ικανότητα του οργανισμού να διακρίνει «ξένα» και «εαυτά» αντιγόνα, αποτρέποντας την ενεργοποίηση άνοσων απαντήσεων ενάντια σε κύτταρα και ιστούς του ίδιου του οργανισμού^{1,2}.

T λεμφοκύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν μια από τις δύο βασικές κατηγορίες λεμφοκυττάρων. Παράγονται στον μυελό των οστών, ενώ διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στον θύμο αδένα. Η αναγνώριση αντιγόνου από τα T λεμφοκύτταρα πραγματοποιείται από τον T κυτταρικό υποδοχέα (TκΥ) που εκφράζεται στην επιφάνειά τους. Ο TκΥ αλληλεπιδρά με το αντιγόνο όταν αυτό είναι συνδεδεμένο σε μεμβρανικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα, που καλούνται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Επιπρόσθετα, ο TκΥ συνδέεται με την επιφανειακή πρωτεΐνη CD3, σχηματίζοντας ένα μεμβρανικό σύμπλοκο που έχει ως ρόλο τη μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου^{1,4}.

Τα T λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δύο πληθυσμούς ανάλογα με την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD4 και CD8. Οι δύο συγκεκριμένοι δείκτες είναι συν-υποδοχείς που καθορίζουν τη δράση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με αντιγόνα που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II, ονομάζονται βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (T_H) και λειτουργούν κυρίως επικουρικά στο πλαίσιο της άνοσης απάντησης μέσω της έκκρισης σημάτων που σχετίζονται με την προώθηση της διαφοροποίησης των B λεμφοκυττάρων. Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με αντιγόνα που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I και λειτουργούν ως κυτταροτοξικά κύτταρα^{1,4}.

Η προσαρμοστική ανοσία διαχωρίζεται σε κυτταρική και χημική ανοσία. Η κυτταρική ανοσία σχετίζεται με τη δράση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία αναγνωρίζουν καρκινικά κύτταρα, κύτταρα μεταμοσχευμένου ιστού ή κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιικό παθογόνο. Η χημική ανοσία αφορά στη δράση των B λεμφοκυττάρων, που οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων και στην απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία της λέμφου, με σκοπό την πρόσδεση και εξάλειψη αντιγόνων^{1,4}.

1.ε Ρόλος των B λεμφοκυττάρων

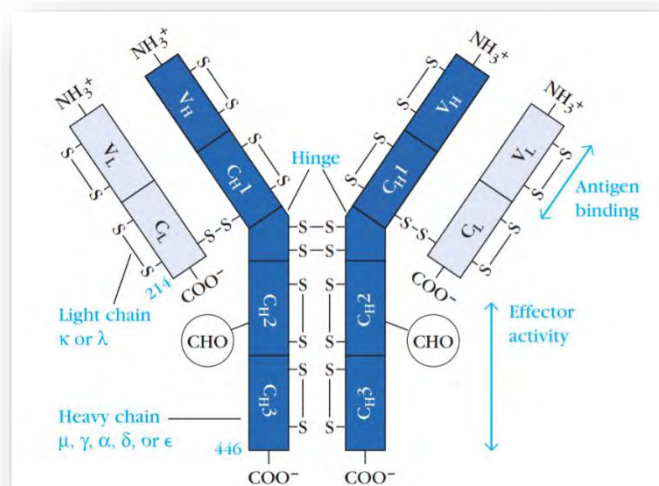
Τα B λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στις αντιδράσεις προσαρμοστικής ανοσίας μέσω της δράσης του BκΥ. Τα B λεμφοκύτταρα καλούνται παρθένα για το χρονικό διάστημα που προηγείται της επαφής με αντιγόνο. Κάθε παρθένο B λεμφοκύτταρο που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία, βρίσκεται σε αδρανή κυτταρική φάση G₀ και διαθέτει έναν BκΥ που δεν είναι ακόμα εξειδικευμένος εναντίον συγκεκριμένου αντιγόνου. Η πρόσδεση του αντιγόνου από τον BκΥ θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου το οποίο περνά στην φάση G₁ και στον πολλαπλασιασμό του προκειμένου να δημιουργηθεί ένας κλώνος κυττάρων που θα εκφράζουν επιφανειακά μόρια ανοσοσφαιρίνης με την ίδια αντιγονική ειδικότητα. Επιπλέον, η σύνδεση του BκΥ με αντιγόνο οδηγεί τελικά στη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων προς δραστικά κύτταρα, δηλαδή B λεμφοκύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα^{4,5}.

Τα B λεμφοκύτταρα μνήμης έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, εκφράζουν στην επιφάνειά τους BκΥ και είναι σε θέση να εκφράσουν ταχύτατα μεγάλες ποσότητες επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης του BκΥ σε περίπτωση μελλοντικής αλληλεπίδρασης με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Τέλος, τα πλασματοκύτταρα δεν

εκφράζουν μόρια ΒκΥ στην επιφάνειά τους, αποτελούν τελικά προϊόντα διαφοροποίησης και δε διαιρούνται περαιτέρω. Παράγουν και εκκρίνουν μεγάλους αριθμούς αντισωμάτων σε εκκρινόμενη μορφή, καθώς συνθέτουν περισσότερα από 2000 αντισώματα ανά δευτερόλεπτο. Μετά την πρόσδεση των εκκρινόμενων αντισωμάτων στο αντιγόνο, το τελευταίο εξαλείφεται μέσω μηχανισμών όπως η οψωνοποίηση που οδηγεί στην αποτελεσματική φαγοκυττάρωση, η ουδετεροποίηση παθογόνου, η λύση του παθογόνου και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος¹.

2. Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

Η αναγνώριση αντιγόνου αποτελεί τη βασική λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων και επιτελείται από το ΒκΥ. Ο ΒκΥ είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από: (α) την μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη (mIg) και (β) το ετεροδιμερές Igα/Igβ που αφορά στην αλληλεπίδραση με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια. Η πρόσδεση αντιγόνου από τον ΒκΥ πυροδοτεί την ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου, τον πολλαπλασιασμό του καθώς και τη διαφοροποίησή του προς πιο εξειδικευμένους τύπους κυττάρων (effector cells), όπως τα πλασματοκύτταρα και τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Η ανοσοσφαιρίνη παρατηρείται και σε εκκρινόμενη μορφή (sIg) που παράγεται από τελικώς διαφοροποιημένα Β λεμφοκύτταρα (πλασματοκύτταρα)¹.



Εικόνα 2. Β κυτταρικός Υποδοχέας. Πηγή : Kuby, Immunology, 7th edition, W H Freeman & Co)

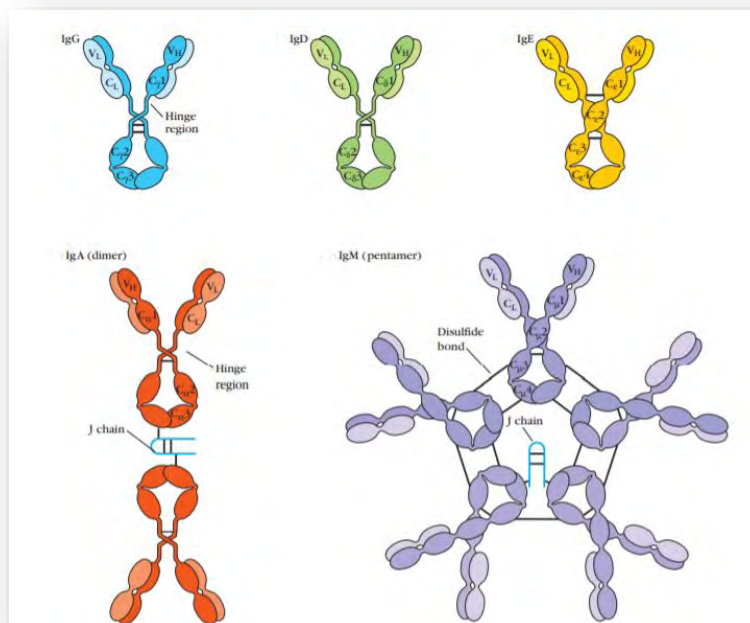
2.α Δομική περιγραφή και λειτουργικότητα

Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από μια κοινή δομή τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες. Οι δύο αλυσίδες έχουν μοριακό βάρος περίπου 22 kDa και ονομάζονται ελαφριές αλυσίδες (light chains, L), ενώ οι άλλες δύο έχουν μοριακό βάρος περίπου 55 kDa, και καλούνται βαριές αλυσίδες (heavy chains, H). Κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού και μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Παρόμοιοι μη ομοιοπολικοί δεσμοί και δισουλφιδικές γέφυρες συνδέουν μεταξύ τους τις πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες και τις πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (Εικόνα 2). Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από διακριτές περιοχές που χαρακτηρίζονται από διαφορετική λειτουργικότητα. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή προς το αμινοτελικό άκρο του μορίου είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του αντιγονικού μορίου, ενώ η περιοχή προς το καρβοξυτελικό άκρο σχετίζεται με την ενεργοποίηση εκτελεστικών μηχανισμών μέσω της μεταφοράς ειδικών σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου^{1,6}.

Τα πρώτα περίπου 110 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο των αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο και για αυτό το λόγο εμφανίζουν το μεγαλύτερο βαθμό μεταβλητότητας. Η συγκεκριμένη περιοχή καλείται μεταβλητή περιοχή (V), είτε αφορά την ελαφριά αλυσίδα (V_L), είτε τη βαριά αλυσίδα (V_H). Η μελέτη της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης έδειξε ότι υπάρχουν υποπεριοχές με διαφορετικό επίπεδο μεταβλητότητας. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν περιοχές με ιδιαίτερα υψηλό βαθμό μεταβλητότητας, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions) και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το αντιγόνο. Για το λόγο αυτό καλούνται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs). Υπάρχουν τρεις περιοχές CDR (CDR1, CDR2 και CDR3) με τη CDR3 να εμφανίζει τη μέγιστη μεταβλητότητα και να σχετίζεται πιο άμεσα με την αντιγονική ειδικότητα της ανοσοσφαιρίνης. Οι περιοχές που βρίσκονται μεταξύ των CDRs είναι πιο συντηρημένες, ονομάζονται περιοχές πλαισίου (framework regions, FRs) και είναι τέσσερις, οι FR1, FR2, FR3 και FR4. Εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης και είναι κυρίως υπεύθυνες για τη σωστή αναδίπλωση του μορίου της ανοσοσφαιρίνης στο χώρο^{1,7}.

Μετά τις μεταβλητές περιοχές (προς το καρβοξυτελικό άκρο) βρίσκονται περιοχές σχετικά σταθερών αλληλουχιών (constant, C), οι C_H για τις βαριές αλυσίδες και C_L για τις ελαφριές. Οι συγκεκριμένες περιοχές έχουν εκτελεστική δράση που σχετίζεται με την οψονοποίηση, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα.

Με βάση την αμινοξική αλληλουχία της σταθερής περιοχής της βαριάς αλυσίδας, οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε διαφορετικές τάξεις ή ιστύπους (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA)^{1,7} (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Οι 5 διαφορετικές τάξεις ανοσοσφαιρινών. Πηγή : Kuby, Immunology, 7th edition, W H Freeman & Co)

Ο ιστύπος σχετίζεται με την εκτελεστική λειτουργία του μορίου:

- Οι ανοσοσφαιρίνες IgG είναι μονομερή, βρίσκονται άφθονες στον ορό και διακρίνονται σε τέσσερις υποτάξεις (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Σχετίζονται άμεσα με τον μηχανισμό της οψονοποίησης, την προστασία του εμβρύου καθώς και με αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται παράγοντες του συμπληρώματος.
- Η ανοσοσφαιρίνη IgM είναι οι πρώτες που παράγονται στα νεογνά. Συναντώνται ως μονομερή όταν εκφράζονται στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου και ως πενταμερή στην εκκρινόμενη εκδοχή τους, όπου οι διαφορετικές αλυσίδες συνδέονται με μια αλυσίδα J. Η αλυσίδα J είναι ένα

μικρό πολυπεπτιδικό μόριο που εκφράζεται σε Β λεμφοκύτταρα επιτρέποντας την πολυμερή διαμόρφωση των ανοσοσφαιρινών. Οι ανοσοσφαιρίνες IgM εμπλέκονται στην πρωτογενή απάντηση εναντίον του αντιγόνου, είναι πολύ αποτελεσματικές στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και χαρακτηρίζονται από υψηλό σθένος όσον αφορά στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος καθώς στην εκκρινόμενη μορφή τους διαθέτουν δέκα θέσεις σύνδεσης με αντιγόνο.

- Οι ανοσοσφαιρίνες IgA συναντώνται κυρίως ως μονομερή, αλλά υπάρχουν και σε διμερή ή τριμερή διαμόρφωση (με τη συμμετοχή της αλυσίδας J). Αποτελεί κυρίαρχη μορφή σε εκκρίσεις (γάλα, σάλιο κ.ά.) και στους βλεννογόνους αδένες.
- Οι ανοσοσφαιρίνες IgE βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στον ορό και σχετίζονται με την αντίδραση άμεσης υπερευαισθησίας.
- Οι ανοσοσφαιρίνες IgD είναι οι τυπικές μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες των Β λεμφοκυττάρων που δεν έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη διαφοροποίησή τους¹.

Όσον αφορά στην ελαφριά αλυσίδα υπάρχουν δύο διαφορετικοί ισότυποι, οι κ και λ. Στον άνθρωπο το 60% των ανοσοσφαιρινών εκφράζουν ελαφριές αλυσίδες ισότυπου κ και το 40% ελαφριές αλυσίδες ισότυπου λ¹.

Σχετικά με την στερεοδιαμόρφωση του μορίου της ανοσοσφαιρίνης, η πρωτοταγής δομή αφορά στις μεταβλητές και σταθερές περιοχές των βαριών και ελαφριών αλυσίδων σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Η δευτεροταγής δομή, περιγράφει την αναδίπλωση κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας γύρω από τον εαυτό της σε μια σειρά αντιπαράλληλων β-φύλλων με εναλλασσόμενα υδρόφοβα και υδρόφιλα αμινοξέα. Έτσι διαμορφώνεται ένα «σάντουιτς» 2 πτυχωτών β-φύλλων, καθένα από τα οποία περιέχει αντιπαράλληλους β-κλώνους με αμινοξέα που συνδέονται σε θηλιές διαφόρων μεγεθών. Οι αλυσίδες στη συνέχεια αναδιπλώνονται διαμορφώνοντας συμπαγείς δομές που αφορούν στην τριτοταγή δομή του μορίου. Οι σφαιρικές επικράτειες αλληλεπιδρούν στην τεταρτοταγή δομή δημιουργώντας λειτουργικές ανοσοσφαιρινικές επικράτειες ικανές να συνδέονται με αντιγόνα και να πυροδοτούν βιοχημικά μονοπάτια σήματος προκειμένου να αντιμετωπιστεί η απειλή¹.

2.6 Γενετική οργάνωση γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

Στον άνθρωπο οι γενετικοί τόποι των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών οργανώνονται σε ομάδες γονιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Ο σχηματισμός της κωδικοποιητικής περιοχής της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης απαιτεί την αναδιάταξη ενός γονιδίου από κάθε ομάδα με την αφαίρεση του ενδιάμεσου τμήματος DNA¹.

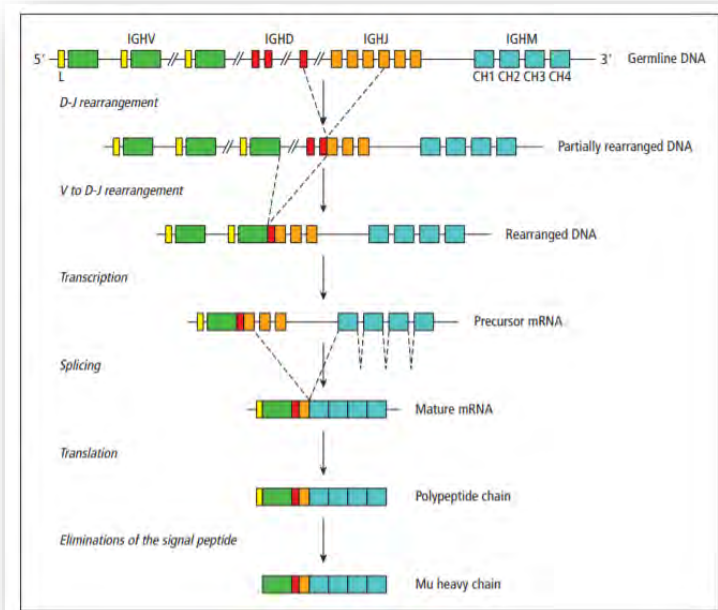
Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 σε μια περιοχή μήκους 1250 kb και περιλαμβάνει τις ομάδες γονιδίων V (variable, μεταβλητά), D (diversity, ποικιλότητας) J (junctional, συνδετικά) που κωδικοποιούν τη μεταβλητή περιοχή της αλυσίδας και την ομάδα γονιδίων C (constant, σταθερά). Συνολικά, έχουν χαρακτηριστεί 44 λειτουργικά γονίδια IGHV που κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (IGHV1-IGHV7), 23 λειτουργικά γονίδια IGHD που κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (IGHV1-IGHV7), 6 λειτουργικά γονίδια IGHJ και 11 λειτουργικά γονίδια IGHC^{1,8}.

Οι γενετικοί τόποι των ελαφριών αλυσίδων (IGK και IGL) οργανώνονται σε τρεις υποομάδες γονιδίων: γονίδια V, J και C. Ο γενετικός τόπος της κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 σε μια γονιδιωματική περιοχή μήκους 1820 kb, όπου έχουν ταυτοποιηθεί 31-35 λειτουργικά γονίδια IGKV, τα οποία ταξινομούνται σε 7 υποομάδες (IGKV1-IGKV7), 5 λειτουργικά γονίδια IGKJ και 1 λειτουργικό γονίδιο IGKC. Ο γενετικός τόπος της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 και περιλαμβάνει μια γονιδιωματική περιοχή με μήκος 1050 kb. Υπάρχουν 29-33 λειτουργικά γονίδια IGLV ανά απλότυπο, τα οποία διακρίνονται σε 11 υποομάδες (IGLV1-IGLV11). Επίσης, υπάρχουν 4-5 λειτουργικά γονίδια IGLJ και 4-5 λειτουργικά γονίδια IGLC καθώς οργανώνονται σε ζεύγη. Επιπλέον, σε

όλους τους γενετικούς τόπους των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών εντοπίζονται περιοχές με ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι περιοχές L (leader). Οι συγκεκριμένες περιοχές βρίσκονται ανοδικά των γονιδίων V και σχετίζονται με την μετακίνηση των μεταγράφων της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας προς το ενδοπλασματικό δίκτυο για τη διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης^{1,9,10}

2.γ Αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

Η αναδιάταξη του DNA, η οποία όπως αναφέρθηκε είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της κωδικοποιητικής αλληλουχίας της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας, είναι μια σημαντική διαδικασία που πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών^{1,11,12} (Εικόνα 4).



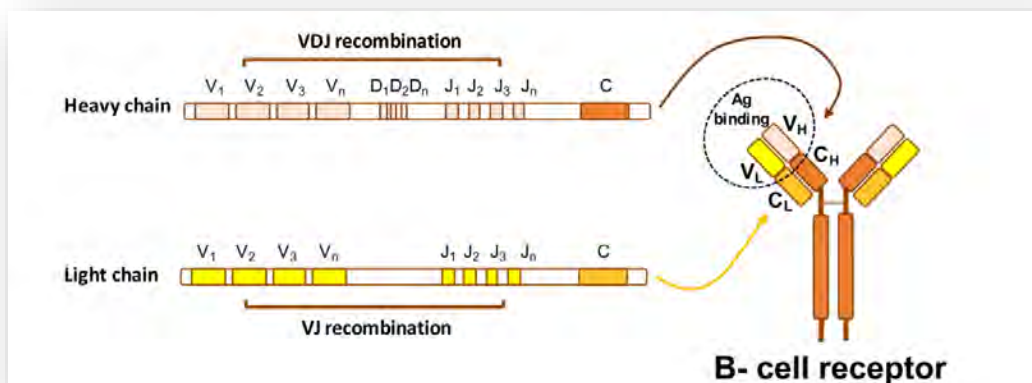
Εικόνα 4. V-D-J Ανασυνδυασμός Πηγή : Ghia P, Rosenquist R, Davi F, Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia, Wolters Kluwer Health Italy Ltd, 2009

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, οι οποίες ονομάζονται RSSs (Recombination Signal Sequences) και εντοπίζονται στο 3' άκρο των γονιδίων V, στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων D καθώς και στο 5' άκρο των γονιδίων J. Από δομική άποψη, οι αλληλουχίες RSS περιέχουν ένα παλίνδρομο συντηρημένο νουκλεοτιδικό επταμερές, ένα συντηρημένο νουκλεοτιδικό εννιαμερές πλούσιο σε AT και μια εμβόλιμη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η εμβόλιμη αλληλουχία μπορεί να αποτελείται είτε από 12, είτε από 23 νουκλεοτίδια σχηματίζοντας έτσι μία ή δύο στροφές της έλικας του DNA. Οι αλληλουχίες RSS έχουν σηματοδοτικό ρόλο για το μηχανισμό της αναδιάταξης, ενώ καθορίζουν και τον προσανατολισμό της διαδικασίας που αφορά αυστηρά στην κατεύθυνση από το επταμερές προς το εννιαμερές. Με άλλα λόγια, η αναδιάταξη συμβαίνει μόνο μεταξύ γονιδίων που φέρουν αλληλουχία RSS μιας στροφής και γονιδίων που φέρουν αλληλουχία RSS δύο στροφών. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται «κανόνας της στροφής» και εμποδίζει τον ανασυνδυασμό μεταξύ γονιδίων από την ίδια ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, στο γενετικό τόπο της κ ελαφριάς αλυσίδας παρατηρούνται RSS με εμβόλιμη αλληλουχία από 23 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των γονιδίων V και RSS με 12 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο των γονιδίων J. Στον γενετικό τόπο της λ ελαφριάς αλυσίδας, εντοπίζονται RSS με εμβόλιμη αλληλουχία 12 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των γονιδίων V και RSS με εμβόλιμη αλληλουχία 23 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο των γονιδίων J. Στην περίπτωση του γενετικού τόπου της βαριάς αλυσίδας εντοπίζονται RSS με

εμβόλιμη αλληλουχία με 23 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των γονιδίων V και στο 5' άκρο των γονιδίων J, ενώ οι RSS στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων D διαθέτουν εμβόλιμες αλληλουχίες 12 νουκλεοτιδίων^{1,11,12}.

Η διαδικασία της αναδιάταξης καταλύεται ενζυμικά από δύο ένζυμα με δράση ρεκομπινάσης που συνεργάζονται και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *RAG-1* και *RAG-2* (recombination activating genes). Οι πρωτεΐνες *RAG-1* και *RAG-2* αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες RSS των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, προσδένονται σε αυτές και τις φέρνουν σε επαφή μέσω του σχηματισμού μιας δομής φουρκέτας. Έπειτα, πραγματοποιείται αποκοπή της μιας αλυσίδας DNA στα σημεία σύνδεσης των RSS και των κωδικών αλληλουχιών μέσω της δράσης ρεκομπινάσης. Ακολουθεί θραύση στη μονή έλικα του DNA και πραγματοποιείται μια αντίδραση κατά την οποία η ελεύθερη ομάδα 3'-OH που έχει προκύψει διασπά με ενζυμική βοήθεια από τις ρεκομπινάσες τον φωσφοδιεστερικό δεσμό της αντιπαράλληλης αλυσίδας. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μιας δομής φουρκέτας που τελικά οδηγεί στη θραύση της διπλής έλικας. Ακολουθεί η δράση ενδονουκλεάσης, η οποία κόβει τη δομή φουρκέτας σε τυχαίο σημείο δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο παλίνδρομα (palindromic, P) νουκλεοτίδια. Στο άκρο της εκτομής μπορεί να πραγματοποιηθεί προσθήκη τυχαίων (non-template, N) νουκλεοτιδίων από το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)^{1,11,12}.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την κινητοποίηση πρόσθετων πρωτεϊνών όπως οι λιγάσες Ku70 και Ku80 και κινάσες που οδηγούν στην επιδιόρθωση και συρραφή των τμημάτων DNA. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει η αναδιαταγμένη αλληλουχία της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Στη συνέχεια, η αναδιαταγμένη αλληλουχία μεταγράφεται σε mRNA και το μόριο υφίσταται συρραφή κατά την οποία αφαιρούνται τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε ιντρόνια και εντοπίζονται μεταξύ της μεταβλητής και της σταθερής περιοχής. Μετά από αυτό το στάδιο, το μόριο mRNA μεταφράζεται οδηγώντας στην παραγωγή της αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης^{1,11,12} (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Δομή Ανοσοσφαιρίνης σαν αποτέλεσμα ανασυνδυασμού. Πηγή : E. ten Hacken, Gounari M, Ghia P, Burger J A The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia, Leukemia, 2019

3. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα Β λεμφοκύτταρα αποτελούν κομβικό κομμάτι της προσαρμοστικής ανοσίας. Ο μηχανισμός της διαφοροποίησής τους στοχεύει στην τροφοδοσία του οργανισμού με εξειδικευμένα κύτταρα, τα πλασματοκύτταρα και τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Οι συγκεκριμένοι τύποι Β λεμφοκυττάρων έχουν την ικανότητα αποτελεσματικής αντιμετώπισης του αντιγόνου που πυροδότησε την άνοση απάντηση. Επιπλέον, λόγω της μεγάλης διάρκειας ζωής τους, τα κύτταρα αυτά εξασφαλίζουν την έγκαιρη απάντηση στο ίδιο αντιγόνο στην περίπτωση μελλοντικής έκθεσης¹.

3.α Αντιγονοανεξάρτητη φάση διαφοροποίησης

Η παραγωγή και ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων ξεκινά στο μυελό των οστών. Κομβικό ρόλο σε αυτό το στάδιο έχει το δίκτυο στρωματικών κυττάρων που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού και προωθούν τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων μέσω κατάλληλων χημικών σημάτων. Κάθε ημέρα ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει $1-2 \times 10^7$ διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών, όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό (περίπου 10%) πρόκειται να εξέλθουν από αυτόν. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχουν αυστηρά στάδια ελέγχου της ομαλής λειτουργίας των Β λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να οδηγούνται σε απόπτωση. Ενδεικτικά, η αποτυχία είτε της διαδικασίας αναδιάταξης των γονιδίων V, D, J είτε του ελέγχου για αυτο-ανοχή οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο¹.

Στο αναπτυξιακό στάδιο του κοινού λεμφοειδούς προγόνου δεν παρατηρείται αναδιάταξη στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών. Στην επόμενη φάση διαφοροποίησης προς πρώιμο προ-προ Β λεμφοκύτταρο, εκκινά η συγκεκριμένη διαδικασία σε πρώτη φάση αφορά στη δημιουργία μιας λειτουργικής αναδιάταξης των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας. Αρχικά, πραγματοποιείται αναδιάταξη μεταξύ ενός γονιδίου IGHD με ένα γονίδιο IGHI με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλόκου IGHD-IGHI. Στη συνέχεια, κατά τη διαφοροποίηση προς όψιμο προ-προ Β λεμφοκύτταρο πραγματοποιείται η αναδιάταξη μεταξύ ενός γονιδίου IGHV και του ήδη σχηματισμένου συμπλόκου IGHD-IGHI¹.

Αν στο επίπεδο του προ-προ Β λεμφοκυττάρου η αναδιάταξη των γονιδίων V-D-J δεν είναι λειτουργική, το λεμφοκύτταρο υφίσταται απόπτωση και φαγοκυττάρωση. Στην περίπτωση που η αναδιάταξη είναι λειτουργική, η διαφοροποίηση του Β λεμφοκυττάρου συνεχίζεται και αυτό περνά στο στάδιο του μεγάλου προ Β λεμφοκυττάρου. Σε αυτό το στάδιο, το ένζυμο TdT απενεργοποιείται και η αναδιάταξη της βαριάς αλυσίδας μεταγράφεται και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί πραγματοποιείται η μετάφραση της βαριάς αλυσίδας με ισότυπο μ και η σύνδεσή της με την υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (SLC, surrogate light chain)¹⁷ και τους συνυποδοχείς Ig α και Ig β . Το σύμπλοκο που σχηματίζεται ονομάζεται προ-BκΥ και εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Σε δομικό επίπεδο, η υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα SLC αποτελείται από δυο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες, τις $\lambda 5$ και VpreB οι οποίες διαμορφώνουν ένα μόριο δομικά ομόλογο της ελαφριάς αλυσίδας. Συγκεκριμένα, η $\lambda 5$ αντικαθιστά τη σταθερή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας και η Vpre B τη μεταβλητή. Η έκφραση λειτουργικού προ-BκΥ είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση του κυττάρου, καθώς σχετίζεται με την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-xL. Όσα Β λεμφοκύτταρα είτε αποτυγχάνουν να εκφράσουν το συγκεκριμένο υποδοχέα είτε αυτός δεν είναι λειτουργικός υφίστανται απόπτωση λόγω έλλειψης της πρωτεΐνης bcl-xL. Τα κύτταρα που θα περάσουν και αυτή τη φάση διαφοροποίησης μετατρέπονται σε μικρά προ Β λεμφοκύτταρα. Σε αυτό το στάδιο, ξεκινά η αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού πραγματοποιείται αρχικά στο γενετικό τόπο της κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK), και μόνο στην περίπτωση αποτυχίας και στα 2 αλληλόμορφα η διαδικασία ανασυνδυασμού ενεργοποιείται στον γενετικό τόπο της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL). Η παραγωγή μιας λειτουργικής αναδιάταξης ελαφριάς

αλυσίδας οδηγεί στην αντικατάσταση της υποκατάστατης ελαφριάς αλυσίδας από την κανονική. Με αυτό τον τρόπο η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα του Β λεμφοκυττάρου σχηματίζουν μονομερείς ανοσοσφαιρίνες IgM που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη^{1,13-17}

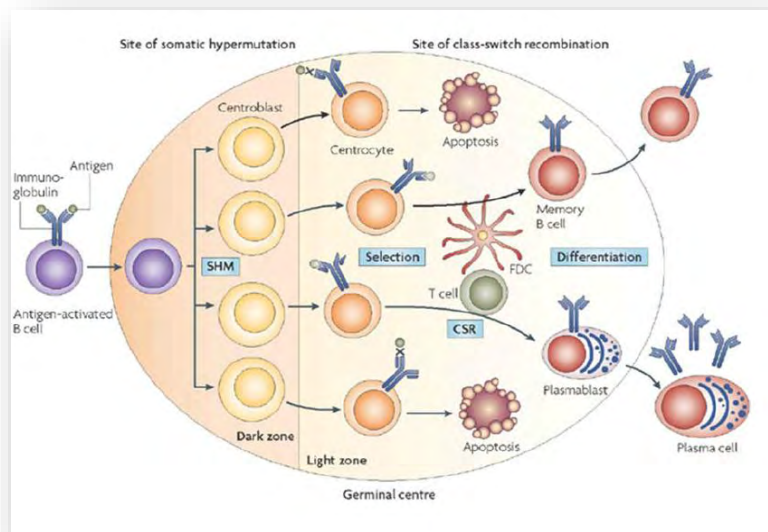
Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία καλούνται παρθένα Β λεμφοκύτταρα (naïve B cells) και υφίστανται έλεγχο για αυτο-ανοχή από ειδικούς μηχανισμούς πριν αφήσουν τον μυελό των οστών. Όσα κύτταρα περάσουν το συγκεκριμένο στάδιο ελέγχου ονομάζονται ώριμα παρθένα Β λεμφοκύτταρα¹⁸ και αφήνουν το μυελό των οστών περνώντας στην κυκλοφορία του αίματος ώστε να προσεγγίσουν τα δευτερογενή λεμφικά όργανα¹.

3.6 Αντιγονοεξαρτώμενη φάση διαφοροποίησης

Στο συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης τα Β λεμφοκύτταρα βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και περνούν από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπου παρέχεται το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την αλληλεπίδρασή τους με αντιγόνα. Τα αντιγόνα διαχωρίζονται σε θυμοεξαρτώμενα (Thymus Dependent, TD) και θυμοανεξάρτητα (Thymus independent) ανάλογα με την εξάρτησή τους από το περιβάλλον του θύμου. Συγκεκριμένα, τα θυμοανεξάρτητα αντιγόνα αφορούν κυρίως λιποπολυσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες βακτηρίων και μπορούν να ενεργοποιήσουν τα Β λεμφοκύτταρα χωρίς την μεσολάβηση των Τ λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, τα θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς τη μεσολάβηση των Τ λεμφοκυττάρων και επομένως σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται η ύπαρξη λειτουργικού θύμου αδένος¹.

Στις περιπτώσεις θυμοεξαρτώμενων αντιγόνων, η αλληλεπίδρασή τους με τα Β λεμφοκύτταρα πραγματοποιείται στο μικροπεριβάλλον των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, το οποίο «παγιδεύει» αντιγόνα, προωθώντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους με τα λεμφοκύτταρα. Συγκεκριμένα, παθογόνα που έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος περνούν μέσω του μεσοκυττάρου υγρού στα λεμφαγγεία, από όπου μέσω της λέμφου μεταφέρονται στους λεμφαδένες. Στον περιφερειακό λεμφαδένα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων. Οι ειδικές δομές που αφορούν στους παραπάνω μηχανισμούς είναι ο μυελός, ο φλοιός και ο παραφλοιός. Ο φλοιός είναι πλούσιος σε Β λεμφοκύτταρα, ο παραφλοιός είναι πλούσιος σε Τ λεμφοκύτταρα και ο μυελός περιέχει και τους δυο τύπους λεμφοκυττάρων σε μεγάλο βαθμό. Στον φλοιό παρατηρούνται δομές που ονομάζονται θυλάκια και σχετίζονται άμεσα με την διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων¹.

Η παρουσίαση τμήματος αντιγόνου στην επιφάνεια ενός αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου στο περιβάλλον του παραφλοιού οδηγεί στην ενεργοποίηση των γειτονικών Τ λεμφοκυττάρων. Το ενεργοποιημένο Τ λεμφοκύτταρο πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται περαιτέρω, και τελικά μεταναστεύει προς τις περιοχές που βρίσκονται στο όριο μεταξύ του παραφλοιού και των θυλακίων του φλοιού. Από την άλλη πλευρά, όταν ένα Β λεμφοκύτταρο αντιδράσει με ένα αντιγόνο στο περιβάλλον του φλοιού, ενεργοποιείται και πολλαπλασιάζεται ενώ μεταναστεύει προς τις περιοχές που γειτονεύουν με τον παραφλοιό. Σε εκείνες τις περιοχές, τα δυο ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κι επικοινωνούν μέσω κυτοκινών. Σε εφτά με δέκα μέρες μετά την ανοσοποίηση, τα δευτερογενή θυλάκια διαμορφώνονται σε ειδικές δομές που ονομάζονται βλαστικά κέντρα¹⁹ και είναι καθοριστικής σημασίας για την περαιτέρω διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων¹.



Εικόνα 6. Το μικροπεριβάλλον των βλαστικών κέντρων. Πηγή : Ulf K, Riccardo D F, Organization of the germinal center, Nature Reviews Immunology, 2008

Τα βλαστικά κέντρα χαρακτηρίζονται από πολικότητα που οδηγεί στη διάκριση δύο περιοχών, τη σκοτεινή και τη φωτεινή ζώνη. Τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα που διαφοροποιούνται στο βλαστικό κέντρο εντοπίζονται αρχικά στη σκοτεινή ζώνη. Σε αυτό το στάδιο καλούνται κεντροβλάστες, δεν εκφράζουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνη και διαιρούνται με ταχύ ρυθμό. Πρόκειται για μεγάλα κύτταρα, με εκτεταμένο κυτταρόπλασμα και διάχυτη χρωματίνη και υπόκεινται στη δράση της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ)²⁰ μιας διαδικασίας που είναι σημαντική για την αντιγονική ειδικότητα του υποδοχέα.

Κατά τη διαδικασία της ΣΥΜ, εισάγεται μεγάλος αριθμός σωματικών μεταλλάξεων κατά μήκος της μεταβλητής περιοχής της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Στις συγκεκριμένες περιοχές παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένος ρυθμός μεταλλαξιγένεσης (10^6 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές του DNA). Πρόκειται κατά κύριο λόγο για σημειακές μεταλλάξεις, που εντοπίζονται κυρίως στις υπερμεταβλητές περιοχές (CDR). Έτσι, ενώ οι περισσότερες μεταλλάξεις σε περιοχές πλαισίου (FR) είναι σιωπηρές, οι μεταλλάξεις στις τρεις περιοχές CDR οδηγούν συνήθως σε αντικατάσταση αμινοξέος. Η διαδικασία της ΣΥΜ καταλύεται ενζυμικά από την πρωτεΐνη AID (activation induced cytidine deaminase). Επιτελείται σε δύο στάδια, όπου το πρώτο αφορά στη δράση της AID, ενώ το δεύτερο σχετίζεται με τη δράση μηχανισμών επιδιόρθωσης που είναι επιρρεπείς σε λάθη. Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η πρόκληση μεγάλης ποικιλομορφίας στις αμινοξικές αλληλουχίες των αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία B λεμφοκυττάρων με BκΥ διαφορετικής ειδικότητας, κάποιιοι από τους οποίους θα συνδέονται στο αντιγόνο με μεγαλύτερη συγγένεια. Η συγγένεια με το αντιγόνο εξαρτάται κυρίως από την περιοχή CDR3, η οποία περιλαμβάνει την περιοχή αναδιάταξης των γονιδίων V, D και J εμφανίζοντας έτσι τη μεγαλύτερη ποικιλότητα σε επίπεδο αλληλουχίας^{1,2,20}.

Όταν οι κεντροβλάστες σταματήσουν να διαιρούνται περνούν στη φωτεινή ζώνη, όπου καλούνται πλέον κεντροκύτταρα και επανεκφράζουν μόρια ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνειά τους. Η φωτεινή ζώνη περιέχει πολλά δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular dendritic cells, FDCs) και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Τα κεντροκύτταρα στη φωτεινή ζώνη αλληλοεπιδρούν με σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος (ανοσοσυμπλέγματα) στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο διαφοροποίησης, που αφορά στην επιλογή συγγένειας, επιβιώνουν τα B λεμφοκύτταρα που καταφέρνουν να αποδεσμεύσουν αντιγόνο από τα ανοσοσυμπλέγματα χάρη στην ειδική τους πρόσδεση, η οποία αντικατοπτρίζει την υψηλή τους συγγένεια για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Ακολούθως τα

συγκεκριμένα κύτταρα δέχονται σήματα επιβίωσης από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα της φωτεινής ζώνης και διαφοροποιούνται σε Β λεμφοκύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα^{1,19}.

Μια άλλη διαδικασία που πραγματοποιείται στα βλαστικά κέντρα με κομβική σημασία για τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων είναι η μετατροφή ισotyπου. Η συγκεκριμένη διαδικασία αφορά στην αλλαγή της σταθερής περιοχής και ρυθμίζεται από κυτοκίνες. Έτσι, ένα κύτταρο που αρχικά είναι ισotyπου IgM, μπορεί να αποκτήσει ισotyπο IgG, IgD, IgE ή και IgA καθένας από τους οποίους συνδέεται με διαφορετικές εκτελεστικές λειτουργίες. Με αυτό τον τρόπο αυξάνονται περαιτέρω τα επίπεδα ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών, καθώς η ειδική αναγνώριση ενός αντιγόνου μπορεί να συνδυαστεί με διαφορετικές εκτελεστικές δράσεις^{1,21} (Εικόνα 6).

4. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

4.α Γενικά

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι χρόνια κακοήθης νεοπλασία ώριμων Β λεμφοκυττάρων. Τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD19, CD23 και CD5 καθώς και χαμηλά επίπεδα CD20, CD22, CD79b και ανοσοσφαιρίνης²²⁻²⁵. Καθώς εξελίσσεται η ασθένεια τα λευχαιμικά κύτταρα συσσωρεύονται στον μυελό των οστών, στο αίμα και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα λευχαιμικά κύτταρα διαθέτουν μικρότερο κυτταρόπλασμα και πιο συμπυκνωμένη χρωματίνη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, ενώ έχουν στρογγυλό πυρήνα και συνολικό μικρότερο μέγεθος. Σε επιδημιολογικό επίπεδο, η ΧΛΛ είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό κόσμο. Η μέση ηλικία των ασθενών στη διάγνωση είναι 71 έτη, ενώ η αναλογία μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι 2:1²⁶

Κάποια από τα πιο συχνά κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι η λεμφοκυττάρωση, η λεμφαδενοπάθεια και η σπληνομεγαλία. Λόγω του αυξανόμενου αριθμού των παραγόμενων λευκοκυττάρων, ο μυελός των οστών σταδιακά απορρυθμίζεται με αποτέλεσμα να παράγονται λιγότερα ερυθρά αιμοσφαίρια που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Αυτό το φαινόμενο προκαλεί συμπτώματα που περιλαμβάνουν κόπωση, απώλεια βάρους και αναιμία. Επίσης, η παραγωγή αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΧΛΛ βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με υγιείς δότες και αρκετές φορές οδηγεί σε αιμορραγία. Επιπρόσθετα, η ΧΛΛ συνδέεται με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και μείωση του αριθμού των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων, κάνοντας τους ασθενείς πιο επιρρεπείς σε μολύνσεις^{27,28,29}.

Η νόσος στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι σχετικά ήπια, καθώς η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (84,2%) εμφανίζουν χρόνο επιβίωσης που ξεπερνά τα 5 χρόνια. Σε άλλες περιπτώσεις η νόσος είναι πολύ επιθετική και οι ασθενείς έχουν άμεση ανάγκη θεραπείας. Αυτή η ετερογένεια της νόσου ως προς το φαινότυπο, τη συμπτωματολογία και την κλινική πορεία πιθανόν να αντανακλά την ετερογένεια της νόσου στο βιολογικό επίπεδο. Επομένως, η ταξινόμηση των ασθενών βάσει κλινικών και βιολογικών δεικτών μπορεί να αποδειχθεί ουσιαστική για την αποτελεσματική διαχείριση και αντιμετώπιση της νόσου^{26,30}.

Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται σε ασθενείς με ΧΛΛ περιλαμβάνουν παραδοσιακά χημειοθεραπεία και χημειοανοσοθεραπεία, ενώ τα τελευταία χρόνια χορηγούνται στους ασθενείς μόρια αναστολέων που στοχεύουν μόρια κινασών (BTK, AKT και PI3K) σε κομβικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό του Bκγ³¹.

4.β Πρόγνωση, κλινικοί και βιολογικοί δείκτες

Η αξιολόγηση κλινικών και βιολογικών δεικτών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ουσιαστική πρόγνωση της νόσου και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Δύο από τα πιο ευρέως διαδεδομένα συστήματα ταξινόμησης των ασθενών με ΧΛΛ όσον αφορά στη σταδιοποίηση και την πρόγνωση της νόσου είναι οι κλίμακες Rai και Binet. Τα συγκεκριμένα συστήματα ταξινόμησης βασίζονται σε φυσικές εξετάσεις και απλές εργαστηριακές δοκιμασίες παράλληλα με την εξέταση της συνολικής μάζας του όγκου (Total Tumor Mass, TTM)^{27-29,31-33}.

Κλίμακα Rai

Σύμφωνα με την κλίμακα Rai, ασθενείς που παρουσιάζουν μόνο λεμφοκυττάρωση έχουν χαμηλό ρίσκο επικινδυνότητας και ανήκουν στο επίπεδο 0 με το μέσο χρόνο επιβίωσης να είναι περίπου 11,7 χρόνια. Ασθενείς με λεμφοκυττάρωση και διογκωμένους λεμφαδένες έχουν μέσο ρίσκο επικινδυνότητας και ταξινομούνται στο επίπεδο 1 με μέσο χρόνο επιβίωσης περίπου 8,3 χρόνια. Ασθενείς με λεμφοκυττάρωση, διογκωμένους αδένες και σπληνομεγαλία ή/και ηπατομεγαλία έχουν μέσο ρίσκο επικινδυνότητας και ταξινομούνται στο επίπεδο 2 με μέσο χρόνο επιβίωσης περίπου 5,8 χρόνια. Σε ασθενείς με υψηλό ρίσκο επικινδυνότητας εμφανίζεται αναιμία (hemoglobin, Hb < 110 g/L) παράλληλα με λεμφοκυττάρωση, διόγκωση λεμφαδένων και σπληνομεγαλία και/ή ηπατομεγαλία. Τέτοιες περιπτώσεις ταξινομούνται στο επίπεδο 3 και εμφανίζουν μέσο χρόνο επιβίωσης 1,7 χρόνια. Τέλος, ασθενείς με υψηλό ρίσκο επικινδυνότητας χαρακτηρίζονται και όσοι ταξινομούνται στο επίπεδο 4, όπου παρατηρείται λεμφοκυττάρωση, διόγκωση λεμφαδένων, σπληνομεγαλία ή/και ηπατομεγαλία, αναιμία (hemoglobin, Hb < 110 g/L) και θρομβοπενία (αιμοπετάλια < 100×10^9)^{27-29,31-33}.

Κλίμακα Binet

Η κλίμακα Binet σχετίζεται με την εκτίμηση του αριθμού των ανατομικών περιοχών του λεμφικού συστήματος που εμπλέκονται στην παθολογία της ΧΛΛ. Πιο συγκεκριμένα, στο επίπεδο A παρατηρείται ποσότητα Hb ίση ή μεγαλύτερη από 100 g/L (10 g/dL) και αριθμός αιμοπεταλίων ίσος ή μεγαλύτερος από $100 \times 10^9/L$ και εμπλοκή λιγότερων από 3 λεμφικών περιοχών. Στο επίπεδο B παρατηρείται ποσότητα Hb ίση ή μεγαλύτερη από 10 g/L ή, αριθμός αιμοπεταλίων ίσος ή μεγαλύτερος από $100 \times 10^9/L$ και οργανομεγαλία σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το επίπεδο A. Σε αυτό το επίπεδο εμπλέκονται 3 ή και περισσότερες λεμφικές περιοχές. Στο επίπεδο C ταξινομούνται οι ασθενείς που έχουν ποσότητα Hb μικρότερη από 10 g/L και/ή αριθμό αιμοπεταλίων μικρότερο από $100 \times 10^9/L$, ανεξάρτητα από την οργανομεγαλία^{27-29,31-33}.

Βιολογικοί δείκτες και αξιολόγηση πρόγνωσης

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια διακρίνουν 3 τύπους παραγόντων που σχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου. Υπάρχουν παράγοντες που δεν αφορούν άμεσα στη νόσο αλλά στον ασθενή. Πρόκειται για την ηλικία, το φύλο, τα επίπεδα σωματικής άσκησης και τον τρόπο ζωής. Ένας άλλος τύπος παραγόντων αφορά οργανικές ανωμαλίες που σχετίζονται με συμπτώματα αναιμίας και θρομβοπενίας. Η εξέταση του μυελού κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να χαρακτηριστούν τα επίπεδα κυτταροπενίας και αναιμίας. Ο τρίτος τύπος παραγόντων αφορά άμεσα στα χαρακτηριστικά της νεοπλασίας. Πρόκειται για τα επίπεδα αύξησης του μεγέθους του όγκου, το μεταλλακτικό φορτίο της ΣΥΜ, τους δείκτες CD38 και ZAP-70, γενετικές ανωμαλίες που εντοπίζονται μέσω φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού και μεταλλάξεις γονιδίων που αφορούν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος. Στον συγκεκριμένο τύπο παραγόντων ανήκουν και δείκτες του αίματος (serum markers) όπως ο CD23, η κινάση της θυμιδίνης και η β μικροσφαιρίνη. Στη συνέχεια αναπτύσσονται οι πιο αξιόπιστοι βιοδείκτες που εξετάζονται σε ασθενείς με ΧΛΛ^{31, 34-38}.

Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (fluorescence in situ hybridization, FISH³⁹)

Χρησιμοποιείται προκειμένου να εντοπιστούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου και όχι με τη διάγνωση, καθώς οι συγκεκριμένες ανωμαλίες εντοπίζονται και σε άλλες κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13 [del(13q)] είναι ένας από τους πιο κοινούς δείκτες καθώς αφορά περισσότερους από το 50% των ασθενών με ΧΛΛ και σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Η τρισωμία στο χρωμόσωμα 12 (12+) σχετίζεται με ενδιάμεση πρόγνωση και αφορά στο 16% των ασθενών^{40,41}. Η έλλειψη στο χρωμόσωμα 11 [del(11q)] συνδέεται με κακή πρόγνωση και εντοπίζεται στο 18% των ασθενών. Τέλος, η έλλειψη στο χρωμόσωμα 17 [del(17p)] οδηγεί στην απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση και σχετίζεται με ιδιαίτερα κακή πρόγνωση⁴¹.

Οι δείκτες CD38 και ZAP70

Ο δείκτης CD38 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μπορεί να έχει ενζυμικό ρόλο είτε να δρα ως υποδοχέας. Η αυξημένη έκφρασή του στη ΧΛΛ σχετίζεται με την επιθετική μορφή της νόσου. Ο δείκτης ZAP-70 εκφράζεται στα λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα και έχει δομική ομολογία με την κινάση Syk. Δεν παρατηρείται φωσφορυλιωμένη σε βασικά κατάλοιπα που χαρακτηρίζουν την ενεργότητά της, επομένως υποστηρίζεται ότι ο ρόλος της αφορά κυρίως στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του ΒκΥ ως προσαρμογέας. Η υπερέκφρασή της σχετίζεται με την επιθετική μορφή της νόσου^{35,36,42}.

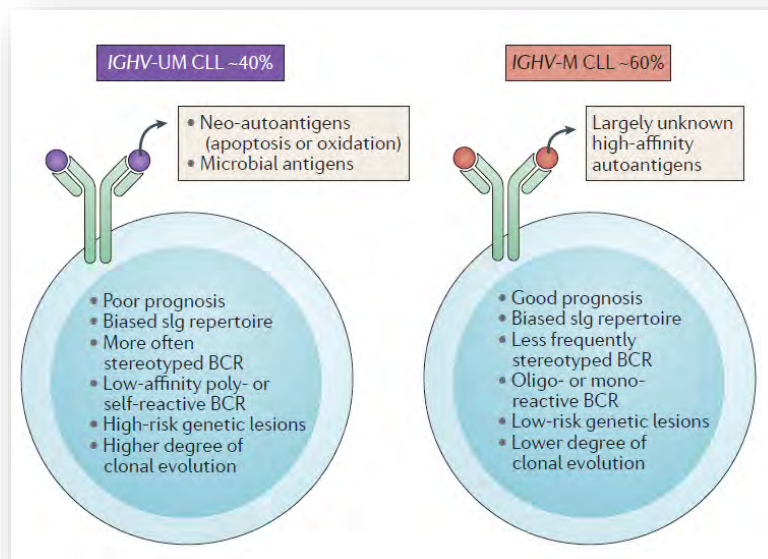
Γενετικοί παράγοντες

Η πρόσφατη εφαρμογή τεχνολογιών αλληλούχησης σε δεδομένα μεγάλης κλίμακας οδήγησε στην ανάδειξη και απομνημόνευση του μεγάλου βαθμού ετερογένειας στο γενετικό υπόβαθρο της ΧΛΛ με αρκετές γονιδιακές μεταλλάξεις να έχουν σημαντικό κλινικό αντίκτυπο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*^{26,43} που σχετίζονται με μείωση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης TP53, επηρεάζοντας διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση με τελικό αποτέλεσμα να εντείνεται η διαδικασία της καρκινογένεσης. Επιπλέον, μια σειρά μελετών οδήγησε στην αναγνώριση μεταλλάξεων «οδηγών» (driver mutations) σε μια σχετικά περιορισμένη σειρά γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου. Ενδεικτικά, τέτοια γονίδια είναι τα *SF3B1* και *XPO1* που αφορούν στην κατεργασία του mRNA, το γονίδιο *CHD2* που σχετίζεται με την κατεργασία της χρωματίνης, το γονίδιο *NOTCH1* που αφορά στη σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt, το γονίδιο *MYD88* που σχετίζεται με μονοπάτια της φλεγμονής και τα γονίδια *EGR2* και *BRAF* που αφορούν στη μεταγραφή και σηματοδότηση των Β λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, τα γονίδια *SF3B1*, *NOTCH1* και το προαναφερόμενο *TP53* έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και στην επιλογή θεραπείας. Στις περισσότερες περιπτώσεις αφορούν σε μεταλλακτικά γεγονότα σε υποκλωνικό επίπεδο, μετά την ανάπτυξη της ΧΛΛ. Επομένως, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της κλωνικής εξέλιξης, δίνοντας ενδεχομένως επιλεκτικό πλεονέκτημα σε συγκεκριμένους υποκλώνους ΧΛΛ⁴⁴.

Το μεταλλακτικό φορτίο του αναδιαταγμένου IGHV

Με βάση μια μεγάλη σειρά μελετών, το μεταλλακτικό φορτίο της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης είναι από τους πιο ακριβείς και σταθερούς μοριακούς δείκτες για την πρόγνωση της ΧΛΛ. Τα πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου δείκτη είναι: (α) ο μεγάλος δείκτης ακρίβειας, καθώς έχει επιβεβαιωθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε μια πολύ μεγάλη σειρά ανεξάρτητων μελετών, (β) η σταθερότητά του, καθώς δεν μεταβάλλεται κατά την πορεία της νόσου και άρα δεν απαιτεί επανεξέταση. Με βάση τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, προτείνεται πλέον η εξέτασή του σε όλους τους ασθενείς με ΧΛΛ και στη γενική κλινική πράξη και στις κλινικές δοκιμές. Η μεγάλη προγνωστική αξία του μεταλλακτικού φορτίου της ΣΥΜ οδήγησε στην εκτενή μελέτη της ΧΛΛ σε ανοσογενετικό επίπεδο. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση λαμβάνονται υπόψη μόνο οι σωματικές μεταλλάξεις του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV από την περιοχή FR1 έως και την FR3. Η περιοχή CDR3 δε περιλαμβάνεται στη συγκεκριμένη ανάλυση λόγω του υψηλού βαθμού ετερογένειας που καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την αναγνώριση των μεταλλάξεων.

Πιο συγκεκριμένα, ο δείκτης αυτός οδήγησε στη διάκριση των ασθενών με ΧΛΛ σε 2 ομάδες με διαφορετική πρόγνωση. Οι ασθενείς που εμφανίζουν διαφορές >2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline reference IGHV gene) καλούνται ως μεταλλαγμένοι (M-ΧΛΛ). Η συγκεκριμένη υποομάδα παρουσιάζει καλή πρόγνωση με το μέσο διάστημα επιβίωσης των ασθενών να είναι 293 μήνες. Σε περιπτώσεις που εμφανίζονται διαφορές ≤2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται στην αμετάλλακτη ΧΛΛ (A-ΧΛΛ). Περίπου το 60% των ασθενών ανήκουν στη M-ΧΛΛ και το 40% στην A-ΧΛΛ. Η πρόγνωση των ασθενών με A-ΧΛΛ είναι πολύ χειρότερη από από εκείνους της M-ΧΛΛ με το μέσο χρονικό διάστημα επιβίωσης των ασθενών είναι περίπου 95 μήνες. Στην περίπτωση των ασθενών M-ΧΛΛ το μέσο διάστημα επιβίωσης είναι 293 μήνες⁴⁵⁻⁵⁸ (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Οι δύο υποομάδες που προκύπτουν από ανάλυση Του μεταλλακτικού φορτίου αναδιαταγμένου IGHV. Πηγή : Julia F, Ricardo D F, The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia, Macmillan Publishers Limited, 2016

Ρεπερτόριο και Στερεοτυπία του ΒκΥ

Η συνολική αξιολόγηση του ρεπερτορίου της ΧΛΛ σε σχέση με φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα έδειξε σημαντικές διαφορές⁴⁷. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε ανοσογενετικό επίπεδο έδειξαν ότι η ΧΛΛ εμφανίζει επιλεκτικότητα στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV. Ενδεικτικά, τα γονίδια που επικρατούν στο ρεπερτόριο της ΧΛΛ είναι τα IGHV1-69, IGHV4-34, IGHV3-7 και IGHV3-23. Πρόκειται για επιλεκτικότητα που διακρίνει τη νόσο από τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα και αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη για την ύπαρξη αντιγονικής επιλογής στο στάδιο των πρόδρομων κυττάρων ΧΛΛ^{47,48-56}.

Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ εκφράζουν πανομοιότυπους ή αρκετά όμοιους ΒκΥ. Πιο ειδικά, το 30% περίπου των ασθενών ΧΛΛ κατατάσσονται σε υποσύνολα με βάση τη στερεοτυπία του ΒκΥ. Η συγκεκριμένη ομοιότητα υποδεικνύει την αναγνώριση κοινών αντιγόνων ή δομικά όμοιων επιτόπων από τους ΒκΥ κάθε στερεότυπου υποσυνόλου⁵⁹⁻⁶⁷. Έχουν προταθεί διάφορα κριτήρια για την ενσωμάτωση ασθενών σε στερεότυπα υποσύνολα. Κάποια από τα πιο σημαντικά είναι να υπάρχει ομοιότητα στο μήκος και την αμινοξική σύσταση της περιοχής VH CDR3 καθώς και φυλογενετική σύνδεση των γονιδίων IGHV. Πιο συγκεκριμένα, οι υποδοχείς των ασθενών σε ένα στερεότυπο υποσύνολο κρίνεται ότι πρέπει να είναι το λιγότερο 50% ταυτόσημοι (identity) ως προς την αμινοξική αλληλουχία της VH CDR3. Ακόμη, πρέπει να παρουσιάζουν το λιγότερο 70% ομοιότητα (similarity) ως προς την αμινοξική τους σύνθεση, σε ότι αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων^{68,69}.

Μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν 19 μεγάλα στερεότυπα υποσύνολα που αφορούν στο 12% του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ. Σε κάθε υποσύνολο οι ασθενείς παρουσιάζουν κοινό βιολογικό προφίλ που αφορά παράγοντες όπως γενετικές ανωμαλίες, επιγενετικές τροποποιήσεις και διακυτταρική επικοινωνία. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ομοιογένεια των ασθενών που ανήκουν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο στο κλινικό επίπεδο. Για παράδειγμα, οι ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #2 (IGHV3-21/IGLV3-21) εμφανίζουν άσχημη κλινική πορεία, παρόλο που αφορά κυρίως «μεταλλαγμένους» ασθενείς (M-ΧΛΛ). Πρόκειται για γεγονός που δείχνει ότι η αξιολόγηση της στερεοτυπίας του ΒκΥ μπορεί να βελτιώσει τα μοριακά συστήματα κατάταξης των ασθενών με ΧΛΛ^{68,69}.

5. ΚΛΩΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Μελέτες δείχνουν ότι οι καρκινικοί όγκοι διακατέχονται από μεγάλη γενετική ετερογένεια. Η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον, η συνεχιζόμενη αντιγονική διέγερση και η πρόκληση μεταλλάξεων συντελούν στη διαμόρφωση υποκλωνικών υποπληθυσμών, οι οποίοι προωθούν εξελικτικά τον καρκίνο^{70,71}.

5.α Γενετική ετερογένεια σε επίπεδο κλώνου και εξέλιξη

Η διαχρονική εξέλιξη ενός κλώνου νεοπλασματικών κυττάρων είναι μια δυναμική διαδικασία που αφορά στη συνεχιζόμενη απόκτηση γενετικών τροποποιήσεων/βλαβών. Τέτοιες τροποποιήσεις προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες σε κάποια από τα νεοπλασματικά κύτταρα και κατά επέκταση νέες ικανότητες προσαρμογής σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, εξυπηρετώντας την ενδοκλωνική έκπτυξη και επέκταση. Έτσι, διαμορφώνεται ένα πλαίσιο ενδοκλωνικής γενετικής ποικιλότητας που αφορά κυρίως σε μεταλλάξεις που συνδέονται με θετική ή αρνητική επιλογή. Η γενετική ποικιλομορφία που προκύπτει δίνει έναυσμα για την εφαρμογή φυσικής επιλογής με βάση την προσαρμοστική ικανότητα των νεοπλασματικών υποκλώνων που έχουν προκύψει. Επομένως, η δαρβινική θεωρία προσαρμόζεται στο πλαίσιο ενός νεοπλασματικού κλώνου όπου παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ κυττάρων ή κυτταρικών υποκλώνων με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο για χώρο και θρεπτικά συστατικά⁷⁰.

Η αρχική κλωνική αύξηση αφορά σε λειτουργικά κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται άμεσα το μικροπεριβάλλον, το οποίο αναδιαμορφώνεται οδηγώντας σε μια σειρά φαινομένων που περιγράφονται ως γενικά χαρακτηριστικά του καρκίνου (Hallmarks of cancer). Για παράδειγμα όσο αυξάνεται ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων υπάρχουν μεγαλύτερες ανάγκες για τροφοδότηση με οξυγόνο, που οδηγούν στο φαινόμενο της νεοαγγειογένεσης. Σταδιακά ο κλώνος εξελίσσεται και μετατρέπεται σε μάζα κυττάρων που έχουν χάσει την αρχική (φυσιολογική) λειτουργικότητά τους⁷¹.

Η επιλογή σε επίπεδο νεοπλασματικού κλώνου συνήθως σχετίζεται με σωματικές μεταλλάξεις σε κύτταρα συγκεκριμένου ιστού και μικροπεριβάλλοντος, όπου αναπτύσσονται και προσαρμόζονται. Στη συνέχεια, καθώς αυξάνεται το μέγεθος του νεοπλασματικού κλώνου εμφανίζεται ενδοκλωνική γενετική ετερογένεια, η οποία ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ειδών καρκίνου. Όπως και σε άλλες περιπτώσεις, υπάρχουν τρία διαφορετικά είδη μεταλλάξεων με βάση την σημασία τους στην επιλογή: (α) οι μεταλλάξεις «οδηγοί» (driver mutations)⁷² που προσδίδουν ιδιότητες προσαρμογής και αφορούν θετική επιλογή, (β) «ουδέτερες» μεταλλάξεις, καθώς η ύπαρξή τους δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα του νεοπλασματικού υποκλώνου ούτε θετικά ούτε αρνητικά και τέλος, (γ) μεταλλάξεις που σχετίζονται με αρνητική επιλογή. Η εξέλιξη του νεοπλασματικού κλώνου σχετίζεται κυρίως με την επιλογή κυττάρων και υποκλώνων που φέρουν μεταλλάξεις «οδηγούς», οι οποίες σχετίζονται με την πορεία και πρόοδο της νόσου. Όσο αυξάνεται η πίεση επιλογής μέσω της γενετικής ετερογένειας, αυξάνονται και οι πιθανότητες για την εμφάνιση μεταλλάξεων «οδηγών». Με αυτό τον τρόπο, η γενετική ετερογένεια σχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου και είναι δείκτης που συνδέεται με κακή πρόγνωση^{71,73,74}.

Έρευνες σχετικά με τις μεταλλάξεις στο πλαίσιο της γενετικής ετερογένειας του καρκίνου περιγράφουν δύο βασικούς τύπους μεταλλάξεων «οδηγών»: μεταλλάξεις που αφορούν στο σύνολο των νεοπλασματικών κυττάρων, οι οποίες παρατηρούνται νωρίς κατά την εμφάνιση του όγκου, και μεταλλάξεις που εμφανίζονται μεταγενέστερα και, επομένως, σχετίζονται με συγκεκριμένο υποκλώνο. Στη ΧΛΛ, οι σχετικές μελέτες οδήγησαν στην αναγνώριση κάποιων βλαβών σε κλωνικό επίπεδο, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *MYD88*, η τρισωμία του χρωμοσώματος 12 και έλλειψη στο χρωμόσωμα 13.

Από την άλλη πλευρά, οι πιο συχνές μεταλλάξεις σε επίπεδο υποκλώνου εντοπίζονται στα γονίδια *SF3B1*, *ATM*, *NOTCH1* και *TP53*. Τα συγκεκριμένα υποκλωνικά μεταλλακτικά πρότυπα διαμορφώνουν και αντίστοιχα φαινοτυπικά προφίλ που σχετίζονται με αυξημένο πλεονέκτημα επικράτησης έναντι των υπολοίπων νεοπλασματικών υποκλώνων. Γενικότερα, η συσσώρευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων «οδηγών»⁷⁴ σε υποκλωνικό (αρχικά) επίπεδο προσδίδει μεγάλη εξελικτική δυνατότητα στα νεοπλασματικά κύτταρα και είναι αρνητικός παράγοντας για την κλινική πορεία και την επιβίωση των ασθενών⁷².

5.β Ενδοκλωνική Ετερογένεια στα γονίδια της μεταβλητής περιοχής της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης

Η μελέτη της ενδοκλωνικής ποικιλότητας σε επίπεδο κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης αντικατοπτρίζει αρκετές πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό της αλληλεπίδρασης μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και αντιγόνων από το νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον. Πρόσφατες μελέτες της ενδοκλωνικής ετερογένειας αφορούσαν κυρίως σε υποσύνολα ασθενών με στερεότυπους ΒκΥ, λόγω ισχυρών ενδείξεων για τον ρόλο της αντιγονικής διέγερσης στην παθογένεση της νόσου στις περιπτώσεις αυτές⁷⁵. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς με ΧΛΛ φαίνεται να μην εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ενδοκλωνικής ετερογένειας στη μεταβλητή περιοχή των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών. Αντίθετα, οι περιπτώσεις που εξέφραζαν στερεότυπες κλωνοτυπικές αναδιατάξεις, όπως αυτές των στερεότυπων υποσυνόλων #2 (IGHV3-21/IGLV3-21) και #4 (IGHV4-34/IGKV2-30)^{76,78} εμφάνισαν ισχυρά πρότυπα ενδοκλωνικής ετερογένειας⁸¹.

Σε τέτοιες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν ετερογενείς υποκλώνοι με ελαφρώς διαφοροποιημένους ΒκΥ και κατ' επέκταση διαφορετική δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο. Με άλλα λόγια, η συνεχιζόμενη αλληλεπίδραση των νεοπλασματικών κυττάρων με αυτογόνο φαίνεται να «καθοδηγεί» εξελικτικά τον νεοπλασματικό κλώνο μέσω της εισαγωγής σωματικών μεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης. Επομένως, η αντιγονική διέγερση φαίνεται να παίζει ρόλο όχι μόνο στη διαδικασία της λευχαιμικής εξαλλαγής αλλά και στην εξελικτική πορεία του νεοπλασματικού κλώνου. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση του προτύπου της ΣΥΜ σε επίπεδο υποκλωνικών πληθυσμών οδήγησε στον εντοπισμό 2 ειδών μεταλλάξεων: (α) τις μη επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις (unconfirmed mutations, UCM), οι οποίες παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένο υποκλώνο του ασθενούς και (β) τις επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις (confirmed mutations, CM), οι οποίες παρατηρήθηκαν σε περισσότερους από έναν υποκλώνους^{77,78}.

Οι σημαντικότερες μελέτες μεγάλης κλίμακας την τελευταία δεκαετία πραγματοποιούνται στοχεύοντας περιπτώσεις ΧΛΛ που εμφανίζουν ισχυρά πρότυπα ενδοκλωνικής ετερογένειας (στερεότυπο υποσύνολο #4, IGHV4-34/IGKV2-30)^{76,78,79}. Προκύπτουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα που αφορούν χαρακτηριστικά πρότυπα ΣΥΜ. Ισχυροποιείται σε τέτοιες περιπτώσεις το εξελικτικό μοντέλο της νόσου όπου η αντιγονική αλληλεπίδραση μπορεί να διαμορφώνει την ενδοκλωνική ετερογένεια και να ασκεί θετική ή αρνητική πίεση. Οι προαναφερόμενες έρευνες στα πλαίσια της ενδοκλωνικής ετερογένειας αποκαλύπτουν συγκεκριμένα σημεία της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης που παραμένουν σταθερά καθώς και άλλα όπου παρατηρείται έντονη διαφοροποίηση (Intraclonal Diversification “hot spots”)⁸⁰. Παράδειγμα συντηρημένου καταλοίπου αποκαλύπτει έρευνα ενδοκλωνικής ετερογένειας που πραγματοποιήθηκε σε 326 ασθενείς⁷⁸.

Πιο συγκεκριμένα, η τυροσίνη στο κωδικόνιο 7 της περιοχής FR1 του γονιδίου IGHV4-34, η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με αντιγονικό επίτοπο, ήταν συντηρημένη στους 322 από τους 326 ασθενείς. Αρκετά ενδιαφέρον είναι επίσης ότι οι μεταλλάξεις που παρίστανται σε περιοχές έντονης ετερογένειας μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων ΧΛΛ περιορίζονται σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Το συγκεκριμένο φαινόμενο αποτυπώνει τη λειτουργική σημασία τέτοιων περιοχών που αποτυπώνεται στην κωδικοποίηση συγκεκριμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων αμινοξέων στο πλαίσιο της

συγγένειας πρόσδεσης ανοσοσφαιρίνης-αντιγόνου. Επιπρόσθετα, μελέτες της κλωνικής αρχιτεκτονικής σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα οδήγησαν στον εντοπισμό χαρακτηριστικών μη επιβεβαιωμένων μεταλλάξεων (unconfirmed mutations, UCM) σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα του ίδιου δείγματος ή ακόμη και σε διαφορετικά δείγματα. Προκύπτει λοιπόν ότι ασκείται θετική επιλογή για συγκεκριμένα μεταλλακτικά πρότυπα στο επίπεδο της ενδοκλωνικής ετερογένειας. Εμφανίζονται συγκεκριμένα μεταλλακτικά προφίλ που χαρακτηρίζουν υποκλώνους στα πλαίσια των οποίων φαίνεται να ασκείται εξελικτική επιλογή κατά την αλληλεπίδραση με αντιγόνο. Ανάλυση τέτοιων μεταλλάξεων μπορεί να απεικονίσει σχέσεις μεταξύ των υποκλώνων⁸¹, χαρακτηρίζοντας την εξελικτική τους πορεία όπως και την καταγωγή τους από προγονικά κύτταρα^{78,80}.

5.γ Θεραπεία και διαχείριση κλωνικής εξέλιξης

Υπάρχουν δυο βασικοί παράγοντες που οδηγούν στη θετική επιλογή ενός κλώνου νεοπλασματικών κυττάρων: (α) ο ανταγωνισμός των νεοπλασματικών κυττάρων ως προς το χώρο και τα θρεπτικά συστατικά, και (β) η ανταπόκριση στη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, η θεραπεία μπορεί να οδηγήσει στην εξάλειψη ενός νεοπλασματικού κλώνου και παράλληλα να «διαβρώσει» το νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον δυσκολεύοντας την επανεμφάνιση της νόσου. Όμως, δεδομένης της ύπαρξης διαφορετικών νεοπλασματικών υποκλώνων, η εφαρμογή θεραπείας μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στους υποκλώνους αυτούς επιφέροντας μια εξελικτική πίεση που μπορεί να οδηγήσει στην επέκταση πιο ανθεκτικών νεοπλασματικών υποπληθυσμών. Η υποτροπή σε προχωρημένη ασθένεια έπειτα χημειοθεραπείας σε αρκετές περιπτώσεις οφείλεται σε γενετικά πρότυπα που προϋπήρχαν της θεραπείας. Μελέτες που έχουν γίνει ως προς τη γενετική ετερογένεια σε υποκλωνικό επίπεδο, καταλήγουν ότι όσο περισσότερα γεγονότα θεραπείας έχουν πραγματοποιηθεί σε έναν ασθενή, τόσο υψηλότερο είναι το φορτίο υποκλωνικών μεταλλάξεων που διαθέτει⁷².

Προκύπτει ότι η αυξανόμενη συχνότητα τέτοιων μεταλλάξεων αφορά υποπληθυσμούς που επιβίωσαν από τη θεραπεία. Η χημειοθεραπεία λοιπόν είναι ένα γεγονός εξωτερικής επιλογής που ουσιαστικά δύναται να απομονώνει ανθεκτικούς επιθετικούς πληθυσμούς οι οποίοι μπορούν εν δυνάμει να διαμορφώσουν νέους πιο επικίνδυνους κλώνους. Με άλλα λόγια, η εφαρμογή θεραπείας μπορεί να αλλάξει τη δυναμική του νεοπλασματικού κλώνου μέσω μιας ισχυρής «τεχνητής επιλογής»^{70,83} με τελικό αποτέλεσμα την επικράτηση νεοπλασματικών υποκλώνων που χάρη σε ειδικά πρότυπα ΣΥΜ έχουν προσαρμοστικό πλεονέκτημα και ανθεκτικότητα⁸⁴. Τέτοια πρότυπα ΣΥΜ αφορούν αμινοξικά κατάλοιπα με φυσικοχημικές ιδιότητες που εξασφαλίζουν θετική επιλογή κατά την «καθοδηγούμενη» από αντιγόνο εξέλιξη⁸⁰. Έτσι η θεραπεία μπορεί να επιδρά καθοριστικά στην διαμόρφωση της ενδοκλωνικής ετερογένειας σε ανοσογενετικό επίπεδο. Επομένως, η λεπτομερής μελέτη των μεταλλακτικών προτύπων της ΣΥΜ σε επίπεδο νεοπλασματικών υποκλώνων πριν και μετά τη θεραπεία κρίνεται κομβική για την κατανόηση της κλινικής πορείας της νόσου⁸².

5.δ Ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση σε υποκλωνικό επίπεδο.

Συνολικά, οι μελέτες της ενδοκλωνικής ετερογένειας του κλωνοτυπικού ΒκΥ σε ασθενείς με ΧΛΛ αποκάλυψαν σημαντικές πληροφορίες για την κλωνική εξέλιξη και πορεία της νόσου. Επιπρόσθετα, η μελέτη του συγκεκριμένου φαινομένου έχει μεγάλη σημασία στο κλινικό επίπεδο, με σαφείς επιπτώσεις για την επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Για το σκοπό αυτό, απαιτείται η διεξαγωγή περισσότερων μελετών σε ανοσογενετικό επίπεδο και ο σχεδιασμός νέων βιοπληροφορικών εργαλείων που θα στοχεύουν: (α) στο χαρακτηρισμό του κύριου νεοπλασματικού κλωνότυπου και των σχετιζόμενων με αυτόν μικρότερων κλωνότυπων και (β) στην παρακολούθηση της δυναμικής του νεοπλασματικού κλώνου σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα αντικατοπτρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εξελικτική πορεία της νόσου.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης είναι η ανάλυση ανοσογενετικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας για το χαρακτηρισμό του φαινομένου της κλωνικής εξέλιξης σε 5 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ).

Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία 2 δειγμάτων από κάθε ασθενή, πριν και μετά την εφαρμογή θεραπείας. Συνοπτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε αφορούσε στην αρχική κατεργασία των δειγμάτων (απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων, εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA) την ενίσχυση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ, την κατασκευή βιβλιοθηκών, και τη διαδικασία αλληλούχησης με τεχνικές νέας γενιάς (next generation sequencing, NGS). Στη συνέχεια, τα ανοσογενετικά δεδομένα μεγάλης κλίμακας χαρακτηρίστηκαν με τη διαδικτυακή πλατφόρμα του IMGT. Τέλος, αναπτύχθηκε βιοπληροφορικό εργαλείο με σκοπό την ανάλυση της κλωνικής αρχιτεκτονικής σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση των δεδομένων οδήγησε στον εντοπισμό του κύριου λευχαιμικού κλώνου καθώς και των κλωνοτύπων που είναι σχετιζόμενοι προς αυτόν σε κάθε δείγμα του ίδιου ασθενούς. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων του ίδιου ασθενή με σκοπό την αποτύπωση της εξελικτικής πορείας του λευχαιμικού κλώνου σε ανοσογενετικό επίπεδο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ομάδα μελέτης

Η ομάδα μελέτης αφορά 5 ασθενείς που διαγνώστηκαν με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε χημειο – ανοσοθεραπεία FCR. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία 2 δειγμάτων από κάθε ασθενή. Το πρώτο δείγμα κάθε ζεύγους δειγμάτων αφορά χρονικό στιγμιότυπο της διάγνωσης, ενώ το δεύτερο δείγμα χρονικό στιγμιότυπο μετά τη θεραπεία κατά την υποτροπή. Βασικά κλινικά χαρακτηριστικά των 5 ασθενών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ασθενής	Ηλικία	Φύλο	Μεταλλακτικό Φορτίο ΣΥΜ	Στερεότυπο Υποσύνολο
1	57	Θηλυκό	A - ΧΛΛ	#1
2	44	Αρσενικό	M - ΧΛΛ	#4
3	66	Αρσενικό	A - ΧΛΛ	#6
4	64	Αρσενικό	A - ΧΛΛ	-
5	59	Αρσενικό	A - ΧΛΛ	-

Πίνακας 1. Βασικά επιδημιολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας μελέτης.

Υλικά και Μέθοδοι

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από τα δείγματα αίματος των ασθενών με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας. Πιο συγκεκριμένα, 20 ml αίματος αναμιγνύονται με 15 ml RPMI (θρεπτικό μέσο). Στη συνέχεια το μίγμα αίματος και RPMI χύνεται αργά και υπό γωνία σε φιαλίδιο που περιέχει 15 ml φυκόλης. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε ταχύτητα 2300 rpm. Πάνω από τη στιβάδα της φυκόλης σχηματίζεται ένας χαρακτηριστικός δακτύλιος που αντιστοιχεί στα μονοπύρηνά κύτταρα του δείγματος. Τα συγκεκριμένα κύτταρα απομονώνονται προσεκτικά και μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο όπου προστίθεται εκ νέου RPMI με σκοπό την αραίωση του δείγματος.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 8 λεπτά σε ταχύτητα 2100 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα, ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml RPMI. Στο συγκεκριμένο σημείο πραγματοποιείται και πάλι φυγοκέντρηση για 8 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθως, απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα, το

ίζημα επαναδιαλύεται σε περίπου 2 ml RPMI και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

Απομόνωση RNA

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με τη χρήση φαινόλης-χλωροφορμίου. Η ανάμιξη των 2 συγκεκριμένων διαμορφώνεται ένα διφασικό μίγμα με το RNA να εντοπίζεται στην (άνω) υδάτινη φάση, το DNA στην ενδιάμεση φάση και τις πρωτεΐνες στην (κάτω) οργανική φάση.

Αρχικά, τα σωληνάρια errendorf που περιέχουν το ίζημα των μονοπύρηνων κυττάρων μεταφέρθηκαν στον πάγο και προστέθηκε 1 ml Trisol, το οποίο περιέχει φαινόλη. Στο στάδιο αυτό προκλήθηκε λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε ανάδευση των δειγμάτων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε θερμοκρασία 4 °C και ταχύτητα 15000 rcf. Έπειτα πραγματοποιήθηκε λήψη της (άνω) υδάτινης φάσης που περιέχει το RNA και μεταφορά της σε νέο σωληνάριο errendorf. Προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης και ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.

Στο επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο διάρκειας 15 λεπτών σε θερμοκρασία 4 °C και ταχύτητα 15000 rcf. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον πάγο και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα. Προστέθηκαν 850 μl διαλύματος EtOH περιεκτικότητας 70% και ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησε επανάληψη του συγκεκριμένου σταδίου του πρωτοκόλλου. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια errendorf τοποθετήθηκαν στο ψυγείο με ανοιχτά καπάκια για 1 ώρα με σκοπό την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης. Τέλος, προστέθηκαν 20 μl νερού σε κάθε δείγμα και ακολούθησε ανάδευση. Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Σύνθεση cDNA

Αρχικά, υπολογίστηκε ο όγκος από κάθε δείγμα RNA που αντιστοιχεί σε 1 μg και προστέθηκε απιονισμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 11,4 μl. Ετοιμάστηκαν σωληνάρια PCR (χωρητικότητας 0,2 ml) όπου προστέθηκε το δείγμα RNA και το νερό. Συνολικά, ετοιμάστηκαν τα κατάλληλα σωληνάρια για τα 10 δείγματα των ασθενών και 1 σωληνάριο αρνητικού μάρτυρα που είχε 11,4 μl απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε Master Mix για το βήμα αποδιάταξης.

Αντιδραστήρια	1 αντίδραση	11 αντιδράσεις
dNTPs 10mM stock	1μl	11 μl
Τυχαίοι εκκινητές 20μg	0.1μl	1,1 μl

Πίνακας 2. Master Mix για αποδιάταξη.

Συνολικά το Master Mix για την αποδιάταξη είχε όγκο 12,1 μl. Από το Master Mix προστέθηκαν 1,1 μl σε κάθε ένα εκ των 11 δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex και τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή όπου επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 65°C και μεταφέρθηκαν άμεσα στον πάγο για 10 λεπτά με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού δευτεροταγών δομών. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το Master Mix για τη σύνθεση cDNA.

Αντιδραστήρια	1 αντίδραση	11 αντιδράσεις
5x FSB	4μl	44μl
DTT (0,1 M)	2μl	22μl
RNAse out (40U/μl)	1μl	11μl
Superscript II (200 U/μl)	0.5μl	5,5μl

Πίνακας 3. Master Mix για σύνθεση cDNA.

Το Master Mix για τη σύνθεση cDNA είχε όγκο 82,5 μl και όπως φαίνεται πιο πάνω περιείχε: (α) 5x FSB, που εξασφαλίζει τις ιοντικές συνθήκες που απαιτεί η αντίδραση, (β) DTT, το οποίο διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και αποδιατάσει τη δευτερογενή δομή του RNA βοηθώντας έτσι στην ομαλή διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, (γ) RNAse out, που είναι αναστολέας ενζύμων με δράση RNase που μπορεί να αποτελούν απειλή για αποδόμηση του RNA. Τα 82,5 μl του Master Mix μοιράστηκαν 7,5 μl σε κάθε σωληνάριο. Έπειτα, προστέθηκαν 12,5 μl απιονισμένο νερό σε κάθε σωληνάριο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl. Τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής όπου εφαρμόστηκε το εξής πρόγραμμα.

Θερμοκρασία	Χρόνος
25 °C	10 λεπτά
42 °C	50 λεπτά
70 °C	15 λεπτά
18 °C	∞

Πίνακας 4. Στάδια της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Το παραγόμενο cDNA αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Ενίσχυση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Λόγω του μεγάλου αριθμού διαφορετικών γονιδίων IGHV, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για κάθε μία από τις υποομάδες γονιδίων IGHV1-IGHV7 (subgroup-specific primers), οι οποίοι προσδένονται σε μία περιοχή ανοδικά του γονιδίου IGHV, η οποία ονομάζεται αλληλουχία «οδηγός» (Leader Sequence).

Παρομοίως, χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικοί εκκινητές, καθένας από τους οποίους είναι ειδικός για ένα γονίδιο IGHJ. Χρησιμοποιήθηκαν 10 σωληνάρια για τα 10 διαφορετικά δείγματα, 1 για θετικό όπως και 1 για αρνητικό μάρτυρα. Για την μεταφορά των απαιτούμενων αντιδραστηρίων στα σωληνάρια δημιουργήθηκε ειδικό Master Mix. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50 μl. Από κάθε δείγμα cDNA χρησιμοποιήθηκαν 2 μl, επομένως ο όγκος του Master Mix για κάθε αντίδραση ήταν 48 μl. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στο Master Mix για την αντίδραση PCR ήταν οι ακόλουθες :

Αντιδραστήρια	Όγκος για μια αντίδραση (48μl)	Συνολικός Όγκος για 12 αντιδράσεις
10x PCR Buffer (-Mg) (Invitrogen)	5 μl	60 μl
50mM MgSO ₄ (Invitrogen)	2 μl	24 μl
10 mM dNTP Mix	1 μl	12 μl
10μM Forward primer or primer mixes	1 μl	12 μl
10μM Reverse primer or primer mixes	1 μl	12 μl
Platinum Taq High fidelity enzyme (100 rxns, 5 U/μL)	0.2 μl	2,4μl
Water used for PCR	37,8 μl	453,6 μl
Total Volume	48 μl	576 μl

Πίνακας 5. Ποσότητες αντιδραστηρίων για Master Mix της PCR.

Τα σωληνάρια PCR τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις συνθήκες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	2 λεπτά
35 PCR κύκλοι	94°C	15 λεπτά
	59°C	30 δευτερόλεπτα
	68°C	45 δευτερόλεπτα
Διατήρηση σταθερά	4°C	∞

Πίνακας 6. Συνθήκες θερμοκρασίας στα διαφορετικά στάδια της Multiplex PCR.

Αρχικά η θερμοκρασία ορίστηκε στους 94 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η αρχική αποδιάταξη των μορίων cDNA. Ακολούθησε μια διαδικασία 35 κύκλων με εναλλαγές 3 θερμοκρασιών. Στους 94 °C πραγματοποιείται αποδιάταξη του DNA με το διαχωρισμό των 2 κλώνων. Στους 59 °C πραγματοποιείται ο υβριδισμός των εκκινητών στα μονόκλινα τμήματα DNA και στους 68 °C πραγματοποιείται η επιμήκυνση των τμημάτων DNA που συντίθενται από την πολυμεράση. Όταν ολοκληρωθούν οι 35 κύκλοι αντίδρασης η θερμοκρασία ορίζεται στους 4 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 3% και αξιολογήθηκε η κλωνικότητά τους. Τα δείγματα κρίθηκαν μονοκλωνικά και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης περιεκτικότητας 3% με σκοπό την απομόνωσή τους.

Απομόνωση DNA από Gel (Gel Extraction)

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης περιεκτικότητας 3% οδήγησε στο διαχωρισμό του επιθυμητού προϊόντος, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν τα τμήματα DNA που αντιστοιχούσαν στη βαριά αλυσίδα της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης, από τα μη ειδικά προϊόντα που στην προκειμένη περίπτωση είναι αλληλουχίες από τις

ανοσοσφαιρίνες φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Έπειτα, η ζώνη που αντιστοιχούσε στο προϊόν ενδιαφέροντος αποκόπηκε με νυστέρι από την πηκτή και μεταφέρθηκε σε σωληνάριο erpendorf.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο για απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης της εταιρίας Qiagen. Αρχικά σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 600μl QG Buffer, το οποίο βοηθά στη διάλυση του κομματιού της πηκτής και πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στους 50 °C, και έπειτα προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200μl ισοπροπανόλης. Ακολούθησε ανάδευση με vortex. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ειδικές στήλες που δεσμεύουν το DNA και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε ταχύτητα 11000 rpm. Απορρίφθηκε το διάλυμα και προστέθηκε ξανά QC Buffer και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε ταχύτητα 11000 rpm. Έπειτα, απορρίφθηκε το διάλυμα και ξεκίνησε η διαδικασία έκπλυσης της στήλης με την προσθήκη PE Buffer. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 750 μl PE Buffer. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις διάρκειας 2 λεπτών σε ταχύτητα 11000 rpm μετά από τις οποίες απορρίφθηκε το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και ακολούθησε η διαδικασία έκλυσης του DNA μέσω της προσθήκης Elution Buffer στη στήλη. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 30 μl Elution Buffer. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε ταχύτητα 11000 rpm. Τέλος, σωληνάριο με το DNA των δειγμάτων αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

Ποσοτικοποίηση DNA των προϊόντων PCR

Τα απομονωμένα προϊόντα PCR ποσοτικοποιήθηκαν σε φωτόμετρο Qubit. Η φωτομέτρηση στο συγκεκριμένο μηχάνημα βασίζεται στην ανίχνευση χρωστικής που δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και χαρακτηρίζει την συγκέντρωση του DNA στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε Master Mix που περιείχε ειδικό Buffer που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και της χρωστικής (Qubit™ Buffer). Χρησιμοποιήθηκαν και 2 δείγματα ελέγχου γνωστών συγκεντρώσεων που βοηθούν στη διαμόρφωση πρότυπης καμπύλης και επομένως στη βαθμονόμηση του μηχανήματος. Το Master Mix περιείχε συνολικά ποσότητα 199 * n μl Qubit™ Buffer και n μl χρωστική Reagent, όπου n ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ενδιαφέροντος και των δειγμάτων ελέγχου.

Χρησιμοποιήθηκαν 12 σωληνάριο ειδικά για τη συσκευή Qubit. Σε κάθε σωληνάριο των δειγμάτων ενδιαφέροντος προστέθηκε 1 μl δείγματος και 199 μl από το Master Mix, ενώ στα 2 επιπλέον σωληνάριο προστέθηκαν 190 μl από το Master Mix και 10 μl από τα 2 δείγματα ελέγχου (Standards 1 και 2). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση για τα 2 δείγματα ελέγχου με σκοπό τη βαθμονόμηση του μηχανήματος και ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς

Το συγκεκριμένο στάδιο περιλαμβάνει την προετοιμασία των δειγμάτων DNA (προϊόντων PCR) για τη διαδικασία αλληλούχησης νέας γενιάς. Οι τεχνολογίες αλληλούχησης συνεχίζουν να αναπτύσσονται ραγδαία μέσα από την τεχνολογική και υπολογιστική ανάπτυξη προσφέροντας εξελιγμένες δυνατότητες. Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα NGS της εταιρίας Illumina.

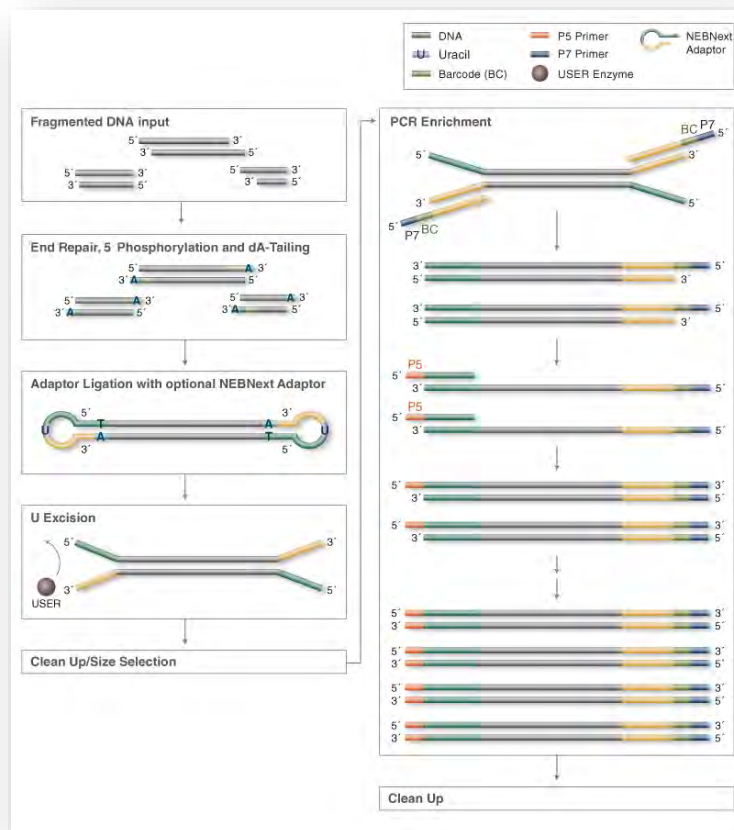
Κατά τη διαδικασία αλληλούχησης νέας γενιάς δίνεται η δυνατότητα για τη μαζική αλληλούχηση πολλαπλών δειγμάτων σε μεγάλο βάθος. Η μεθοδολογία αφορά 4 βασικά βήματα:

- Κατασκευή βιβλιοθηκών DNA
- Επισήμανση των βιβλιοθηκών κάθε δείγματος
- Αλληλούχηση βιβλιοθηκών
- Βιοπληροφορική υπολογιστική ανάλυση

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Προετοιμασία Βιβλιοθηκών

Η κατασκευή των βιβλιοθηκών αφορά στη διαδικασία επιδιόρθωσης άκρων (End Repair) στα καθαρισμένα προϊόντα PCR ώστε τα μόρια DNA να καταστεί δυνατή η αλληλούχηση τους. Η επιδιόρθωση

άκρων σχετίζεται με φωσφορυλίωση στο 5' άκρο (5'-P) και προσθήκη νουκλεοτιδίων A στο 3' άκρο τους (3'-dA Tailing). Με αυτό τον τρόπο τα άκρα καθίστανται κατάλληλα ώστε να συνδεθούν με ειδικούς προσαρμογείς (adaptors) που εξασφαλίζουν τη σύνδεσή τους σε ειδική flowcell όπου λαμβάνει χώρα ο κλωνικός πολλαπλασιασμός. Αφού πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των μορίων προσαρμογέα και γίνει ο καθαρισμός τους πραγματοποιείται η σύνδεση μορίων-δεικτών (indexes). Πρόκειται για αλληλουχίες που είναι ειδικές για κάθε δείγμα έτσι ώστε να το χαρακτηρίσουν με μοναδικό τρόπο και να εξασφαλίσουν τη δυνατότητα παράλληλης αλληλούχησης πολλαπλών δειγμάτων.



Εικόνα 8. Προετοιμασία βιβλιοθηκών για Illumina NGS.

Αρχικά, προετοιμάστηκαν νέα σωληνάρια PCR όπου προστέθηκαν 50 μl DNA και 10 μl από το End Prep Mix, το οποίο περιλαμβάνει NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix (3 μl) και Ultra II End Prep Reaction Buffer (7 μl). Πραγματοποιήθηκε ανάδευση των δειγμάτων και μεταφορά τους σε θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι. Το πρόγραμμα αφορούσε στην επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 20°C, 30 λεπτά στους 65 °C και τέλος διατήρησή τους στους 4°C. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η προετοιμασία των άκρων με σκοπό τη σύνδεσή τους με μόρια προσαρμογέα (adaptor).

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η πρόσδεση του προσαρμογέα. Παρασκευάστηκαν και προστέθηκαν στα σωληνάρια των δειγμάτων 33,5 μl Adaptor Ligation Mix που περιλάμβανε NEBNext Ultra II Ligation Master Mix (30 μl), NEBNext Ligation Enhancer (1 μl) και NEBNext Adaptor for Illumina (2,5 μl), διάλυμα που περιλαμβάνει τα μόρια του προσαρμογέα. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων στους 20 °C για 15 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή χωρίς θερμαινόμενο καπάκι. Σε αυτό το στάδιο, προστέθηκαν ολιγονουκλεοτίδια στα προετοιμασμένα άκρα των τμημάτων DNA, τα οποία διαμορφώνουν σε κάθε άκρο μια χαρακτηριστική μορφή φουρκέτας που ενώνει τους 2 κλώνους του DNA. Στο κέντρο κάθε φουρκέτας υπάρχει ένα νουκλεοτίδιο U. Έπειτα προστέθηκε στα σωληνάρια το ένζυμο USER Enzyme σε ποσότητα 3 μl και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε τομή στο σημείο της

U, με αποτέλεσμα το άνοιγμα της δομής φουρκέτας και το διαχωρισμό των 2 κλώνων των μορίων DNA με ένα μόριο προσαρμογέα να βρίσκεται σε κάθε άκρο του κάθε μονόκλωνου τμήματος DNA.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός των μορίων DNA που φέρουν μόρια προσαρμογέα με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, τα οποία δεσμεύουν τα μόρια DNA που είναι συνδεδεμένα με τους προσαρμογείς. Συγκεκριμένα, στα σωληνάρια PCR tubes προστέθηκε ποσότητα 87 μl διαλύματος με μαγνητικά σφαιρίδια SPRIselect beads και το μίγμα αναδεύτηκε (συνολική ποσότητα δείγματος * 0,9). Τα δείγματα στη συνέχεια επωάστηκαν σε συσκευή που εφαρμόζει μαγνητικό πεδίο με αποτέλεσμα τη δέσμευση των σφαιριδίων και των επιθυμητών μορίων DNA στη μια πλευρά του σωληναρίου. Πραγματοποιήθηκε απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 190 μl διαλύματος αιθανόλης περιεκτικότητας 80%. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων στο μαγνητικό πεδίο το διάλυμα απορρίφθηκε εκ νέου.

Το συγκεκριμένο βήμα με την προσθήκη EtOH επαναλήφθηκε και έπειτα τα δείγματα αφέθηκαν σε μαγνητικό πεδίο με ανοιχτό καπάκι για 5 λεπτά ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Έπειτα πραγματοποιήθηκε έκλουση με 17 μl νερό και ανάδευση. Τέλος, τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν και πάλι σε μαγνητικό πεδίο και πραγματοποιήθηκε λήψη του διαλύματος που πλέον περιείχε τα επιθυμητά μόρια DNA χωρίς μαγνητικά σφαιρίδια και μεταφορά του σε νέο σωληνάριο PCR.

Το τελευταίο στάδιο της κατασκευής βιβλιοθηκών σφορούσε στην επισήμανση των μορίων DNA μέσω της προσθήκης ολιγονουκλεοτιδίων με ειδική αλληλουχία (indexes, ραβδοκώδικες) που έχουν τη δυνατότητα να χαρακτηρίσουν μοναδικά το κάθε δείγμα. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες ενσωματώθηκαν στα μόρια DNA μέσω αντίδρασης PCR. Η συγκεκριμένη PCR αφορά στην πρόσδεση ενός διαφορετικού συνδυασμού εκκινητών για κάθε δείγμα. Έτσι λοιπόν στο σωληνάριο κάθε δείγματος προστέθηκε ένα μίγμα που περιλάμβανε 25 μl από το NEBNext Ultra II Q5 Master Mix και ποσότητα 5 μl από τους εκκινητές και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Έπειτα τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή όπου έλαβε χώρα το ακόλουθο πρόγραμμα: πραγματοποιήθηκε αρχική αποδιάταξη στους 98°C για 30 δευτερόλεπτα, ενώ ακολούθησαν 10 κύκλοι που αφορούσαν σε μεταβολές ανάμεσα στους 98°C για 10 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη) και στους 65°C για 75 δευτερόλεπτα (πρόσδεση εκκινητών και αντιγραφή των τμημάτων DNA). Τέλος, η τελική επέκταση αφορούσε στην επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά.

Στο τέλος του συγκεκριμένου βήματος, τα τμήματα DNA που αντιστοιχούσαν στα αρχικά προϊόντα PCR φέρουν στα άκρα τους μόρια προσαρμογέα και μόρια δεικτών (indexes). Τα συγκεκριμένα προϊόντα καθαρίζονται με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων με ανάλογο τρόπο όπως αυτός που προαναφέρθηκε μετά την προσθήκη των μορίων προσαρμογέα (Εικόνα 8).

Ποσοτικός/ποιοτικός έλεγχος βιβλιοθηκών

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Fragment Analyzer, η οποία βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μέσα από ειδικά τριχοειδή. Καθώς τα τμήματα DNA του δείγματος κινούνται κατά μήκος των τριχοειδών, αλληλεπιδρούν με φθορίζοντα μόρια και διαχωρίζονται βάσει μεγέθους. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 μl, τα οποία αναμίχθηκαν με 22 μl Diluent Marker, που είναι το μέσο αραίωσης του δείγματος με ιόντα Tris-EDTA και σχετίζεται με τη ρύθμιση του pH. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδική πλάκα στο μηχάνημα, διαπέρασαν ένα «παράθυρο ανίχνευσης» όπου ο χρόνος παραμονής τους αντικατόπτριζε το μέγεθός τους, ενώ το σήμα φθορισμού τη συγκέντρωσή τους.

Συγκεκριμένα, η συσκευή περιλαμβάνει ειδικό laser που αλληλεπιδρά με τα φθορίζοντα μόρια παρέχοντας ένα γράφημα ανάλογο με το σήμα των μορίων DNA του δείγματος όπου πραγματοποιείται συσχέτιση μεταξύ του σήματος κάθε μορίου και της συγκέντρωσής του. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το λογισμικό PROSize Data Analysis Software. Αναλύθηκαν για κάθε δείγμα τα γραφήματα της ηλεκτροφόρησης και πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί του μεγέθους και της

συγκέντρωσής τους, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διαμόρφωση ισομοριακού μίγματος βιβλιοθηκών για το στάδιο της αλληλούχησης.

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – δημιουργία ισομοριακού μίγματος

Διαμορφώθηκε ένα ισομοριακό μίγμα που να περιλαμβάνει τις βιβλιοθήκες του συνόλου των δειγμάτων ενδιαφέροντος. Η λογική πίσω από αυτό το στάδιο είναι ότι η προσθήκη ίδιας ποσότητας από κάθε βιβλιοθήκη θα εξασφαλίσει ίδιο αριθμό διαβασμάτων (reads) για κάθε δείγμα στο στάδιο της αλληλούχησης.

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Real Time PCR

Αφού παρασκευάστηκε το ισομοριακό μίγμα των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε RQ PCR με χρήση της χρωστικής SYBR Green ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ακριβής ποσότητα του μίγματος βιβλιοθηκών που πρόκειται να αλληλουχηθεί. Η διαδικασία στηρίζεται στο KAPA Library Quantification Kit Illumina platforms και περιλαμβάνει εκκινητές που υβριδίζονται μόνο σε μόρια που φέρουν προσαρμογείς (adaptors) και δείκτες (indexes) στα άκρα τους. Κάθε μοριακό μίγμα βιβλιοθηκών αραιώθηκε, ώστε η συγκέντρωσή του να βρίσκεται εντός των πλαισίων τα οποία καθορίζονται από 4 δείγματα ελέγχου με συγκεντρώσεις 0.002pM, 0.02pM, 0.2pM και 2pM, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση πρότυπης καμπύλης. Επίσης, παρασκευάστηκε μίγμα αντιδραστηρίων που περιείχε 5 ml του 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix και 1 ml από το 10X Primer Premix.

Το συγκεκριμένο μίγμα αναμίχθηκε με 4 μl της αραιωμένης βιβλιοθήκης. Πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις για κάθε δείγμα ώστε να υπάρχει ακρίβεια ως προς το αποτέλεσμα. Το πρόγραμμα της αντίδρασης που προτείνεται από τον κατασκευαστή αφορά σε αρχική αποδιάταξη των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολούθησαν 35 κύκλοι που αφορούν σε μεταβολές ανάμεσα σε 95°C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη) και 60°C για 45 δευτερόλεπτα (υβριδισμός εκκινητών και σύνθεση των νέων τμημάτων DNA). Μετά την αντίδραση, ποσοτικοποιήθηκε ο μέσος αριθμός αντιγράφων για κάθε βιβλιοθήκη. Για το συγκεκριμένο προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δεδομένα: το μέσο μήκος των τμημάτων DNA (που υπολογίζεται περίπου 452 bp), το οποίο προσδιορίστηκε από το Fragment Analyzer, και ο παράγοντας αραιώσης προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αρχικού μίγματος. Οι συγκεκριμένες πληροφορίες χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση της κάθε βιβλιοθήκης με βάση τον τύπο:

$$\text{Molarity} = (\text{Mean copies} \cdot 452 / \text{Fragment size}) \cdot \text{Παράγοντα Αραιώσης}$$

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Τελική προετοιμασία και αλληλούχηση σε MiSeq (Illumina)

Για την προετοιμασία της αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το μίγμα των βιβλιοθηκών, τα οποία αναμίχθηκαν με 0,2 N NaOH με σκοπό την διάσπαση δεσμών υδρογόνου της διπλής έλικας του DNA και την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 990 μl Hyb Buffer. Πρόκειται για διάλυμα που διαμορφώνει κατάλληλα τις συνθήκες για τον υβριδισμό των μορίων στη flow cell. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η αραιώση του μίγματος των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 13 pM. Διαμορφώθηκε ένα τελικό μίγμα με όγκο 600 μl, όπου προστέθηκε PhiX από έτοιμη βιβλιοθήκη της Illumina σε ποσοστό άνω του 10% προκειμένου να αυξηθεί η πολυπλοκότητα του μίγματος των βιβλιοθηκών. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίστηκε η εγκυρότητα της διαδικασίας της αλληλούχησης. Τέλος, το μίγμα τοποθετήθηκε για αλληλούχηση στην πλατφόρμα MiSeq (Illumina).

Τα μονόκλινα τμήματα DNA της κάθε βιβλιοθήκης προσδένονται στην επιφάνεια υαλοειδούς δομής κλωνικής ενίσχυσης, της flow cell. Η συγκεκριμένη σύνδεση εξυπηρετείται από τους προσαρμογείς στα άκρα κάθε τμήματος DNA που συνδέονται σε ολιγονουκλεοτίδια της flow cell τα οποία είναι

συμπληρωματικά τόσο για τον forward όσο και για τον reverse adaptor. Έτσι μετά τον υβριδισμό κάθε μονοκλωνικού τμήματος στην flow cell τα ολιγονουκλεοτίδια λειτουργούν σαν εκκινητές για σύνθεση νέου κλώνου DNA. Με αυτό τον τρόπο τα τμήματα DNA κάθε βιβλιοθήκης πολλαπλασιάζονται.

Η αλληλούχηση βασίζεται στην αντιγραφή του DNA (DNA synthesis, base by base) με ταυτόχρονη χρήση 4 φθοριζόντων νουκλεοτιδίων ανά κύκλο. Πραγματοποιείται ανίχνευση του σήματος με laser σε 4 κανάλια φάσματος (ένα ανά βάση) και ψηφιοποίηση με κάμερες υψηλής ευκρίνειας. Χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί για τμήμα του προσαρμογέα στα άκρα των τμημάτων DNA και στη συνέχεια πραγματοποιείται αντιγραφή του DNA και χαρακτηρισμός της κάθε βάσης που προστίθεται βάσει φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα dNTPs φέρουν στο 3' ένα μόριο παρεμποδιστή (blocker) ώστε να προστίθεται ένα νουκλεοτίδιο τη φορά. Έτσι κατά την αντιγραφή προστίθεται βάσει συμπληρωματικότητας ένα νουκλεοτίδιο, αφαιρείται ο παρεμποδιστής και εκπέμπεται φθορισμός που αναγνωρίζεται από ειδική βάση. Η αντίδραση συνεχίζεται με την προσθήκη επόμενου dNTP.

Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Ανάλυση δεδομένων

Αφού πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αλληλούχησης είναι σημαντικό τα αποτελέσματα να φιλτραριστούν βάσει κριτηρίων που αφορούν το μήκος και την ποιότητα των reads. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού αλγορίθμου για τη συρραφή των διαβασμάτων που αντιστοιχούν στην ίδια αλληλουχία βαριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης με επικέντρωση στην περιοχή CDR3. Τα διαβάσματα με χαμηλή ποιότητα αλληλούχησης απορρίπτονται ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή αξιοπιστία. Το συγκεκριμένο εργαλείο έχει ενσωματωθεί στην πλατφόρμα "Galaxy".

Στη συνέχεια, τα δεδομένα που προκύπτουν μεταφέρονται στην πλατφόρμα του IMGT (the International ImMunoGeneTics information system) που σχετίζεται με ανάλυση και χαρακτηρισμό ανοσογενετικής πληροφορίας που αφορά BκΥ και TκΥ.

Η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο IMGT/HighV-QUEST. Πρόκειται για ένα σημαντικό εργαλείο στην ανοσογενετική ανάλυση αλληλουχιών αναδιατάξεων ανοσοσφαιρινών που παρέχει πληροφορία σχετικά με τα αναδιαγμένα γονίδια, τις σωματικές μεταλλάξεις που εισάγονται μέσω της ΣΥΜ και τα χαρακτηριστικά της περιοχής CDR3. Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίζονται τα γονίδια IGHV, IGHD και IGHJ των αλληλουχιών που υποβάλλονται μέσω της σύγκρισής τους με τη βάση δεδομένων του IMGT. Από τη συγκεκριμένη σύγκριση προκύπτει και η πληροφορία που αφορά στα επίπεδα σωματικών μεταλλάξεων. Χαρακτηρίζεται η λειτουργικότητα των ίδιων των γονιδίων (π.χ λειτουργικά γονίδια ή ψευδογονίδια) καθώς και συνολικά της αναδιάταξης των γονιδίων. Επιπλέον, παρέχονται πληροφορίες για την περιοχή CDR3 όπως το μήκος και η αμινοξική της σύσταση. Η συνολική πληροφορία του εργαλείου IMGT/HighV-QUEST εξάγεται σε 11 αρχεία κειμένου (txt).

Έτσι, μετά από την ανάλυση των ανοσογενετικών δεδομένων που προέκυψαν με το εργαλείο IMGT/HighV-QUEST για κάθε ένα από τα 10 δείγματα, προέκυψε ένας διαφορετικός φάκελος που περιείχε 11 διαφορετικά αρχεία txt με διαφορετική ανοσογενετική πληροφορία. Η συγκεκριμένη πληροφορία αναλύθηκε περαιτέρω μέσα από εργαλείο που αναπτύχθηκε ώστε να αποτυπωθεί η κλωνική αρχιτεκτονική.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΟΥ ΕΡΓΑΛΕΙΟΥ



ΓΕΝΙΚΑ

Το “ClonalRevolution tool” είναι ένα βιοπληροφορικό εργαλείο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης με σκοπό το χαρακτηρισμό της ενδοκλωνικής ετερογένειας στο ανοσογενετικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, το εργαλείο εξάγει συγκεκριμένες πληροφορίες που είναι χρήσιμες για την περιγραφή του φαινομένου της κλωνικής εξέλιξης σε διαχρονικά δείγματα του ίδιου ασθενούς, ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα απεικόνισης της εξέλιξης της κλωνικής αρχιτεκτονικής. Αρχικά εντοπίζεται και χαρακτηρίζεται ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος και στη συνέχεια οι μικρότεροι κλωνότυποι που εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με αυτόν σε ανοσογενετικό επίπεδο. Τέλος, απεικονίζεται η μεταξύ τους σχέση μέσω του βαθμού των διαφορών τους.

Πρόκειται για εφαρμογή που διαμορφώθηκε σε R Shiny, μια πλατφόρμα που περιέχει βοηθητικά πακέτα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη διαδικτυακών εφαρμογών βασισμένων στην γλώσσα προγραμματισμού R. Πιο συγκεκριμένα, τα πακέτα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα shinyFiles, DT, plyr, dplyr, data.table, Biostrings, xtable, shinyalert, tidyverse, scales, stringr, e1071, widyr, igraph, stringdist, stringi, reshape και compare.

Το εργαλείο έχει αναπτυχθεί ως εφαρμογή διαδικτύου και ο χρήστης μπορεί να περιηγηθεί σε 6 καρτέλες με διαφορετική λειτουργικότητα.

Η πρώτη καρτέλα αντιστοιχεί στο βασικό παράθυρο του εργαλείου.

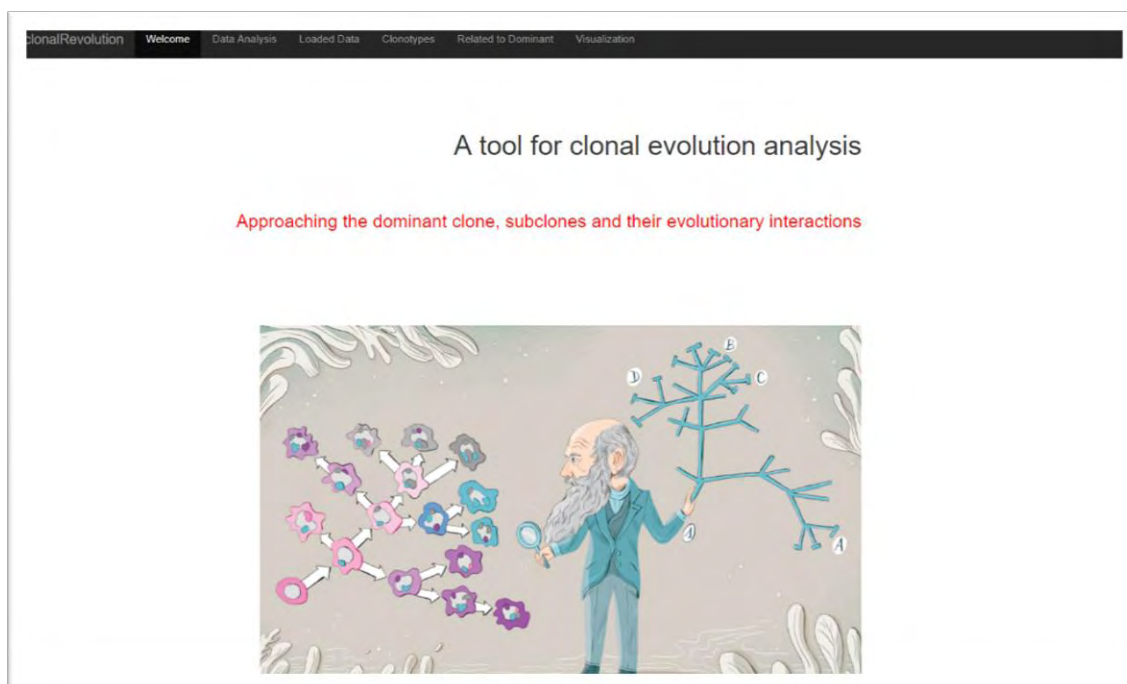
Η δεύτερη έχει τίτλο “Data Analysis” και σχετίζεται με το φιλτράρισμα και τη βασική επεξεργασία των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα μέσα από αυτή την καρτέλα ο χρήστης επιλέγει τις παραμέτρους που επιθυμεί τόσο για τον ορισμό του κλωνότυπου όσο και για την ανίχνευση των κλωνότυπων που σχετίζονται με τον κύριο λευχαιμικό κλωνότυπο.

Η τρίτη καρτέλα έχει τίτλο “Loaded Data” και είναι η σελίδα όπου ο χρήστης μπορεί να παρατηρήσει τα δεδομένα πριν και μετά το φιλτράρισμα.

Η τέταρτη καρτέλα έχει τίτλο “Clonotypes” και περιέχει πίνακες με το σύνολο των κλωνότυπων για κάθε δείγμα.

Η πέμπτη καρτέλα έχει τίτλο “Related to Dominant” και περιέχει όλους τους κλωνότυπους που σχετίζονται με τον κύριο λευχαιμικό κλωνότυπο με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους που έχει ορίσει ο χρήστης.

Τέλος, η έκτη καρτέλα έχει τίτλο “Visualization” και περιλαμβάνει την απεικόνιση του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων.



Εικόνα 9. Αρχική σελίδα του εργαλείου.

Το εργαλείο δέχεται ως αρχεία εισόδου (input files) αρχεία κειμένου σε text format (.txt), τα οποία αποτελούν αρχεία εξόδου (output files) του προαναφερόμενου εργαλείου IMGT/HighV-QUEST. Τα αρχεία του εργαλείου IMGT/HighV-QUEST που αφορούν σε ένα συγκεκριμένο δείγμα οργανώνονται σε ένα φάκελο 11 αρχείων txt.files που σχετίζονται με διαφορετικές πληροφορίες (Εικόνα 10).

Όνομα	Ημερομηνία τροποποι...	Τύπος	Μέγεθος
1_Summary.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	153.246 KB
2_IMGT-gapped-nt-sequences.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	310.299 KB
3_Nt-sequences.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	387.908 KB
4_IMGT-gapped-AA-sequences.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	125.011 KB
5_AA-sequences.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	119.378 KB
6_Junction.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	107.879 KB
7_V-REGION-mutation-and-AA-change-t...	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	35.756 KB
8_V-REGION-nt-mutation-statistics.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	86.018 KB
9_V-REGION-AA-change-statistics.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	73.892 KB
10_V-REGION-mutation-hotspots.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	232.952 KB
11_Parameters.txt	16/07/2018 5:45 μμ	Έγγραφο κειμένου	1 KB

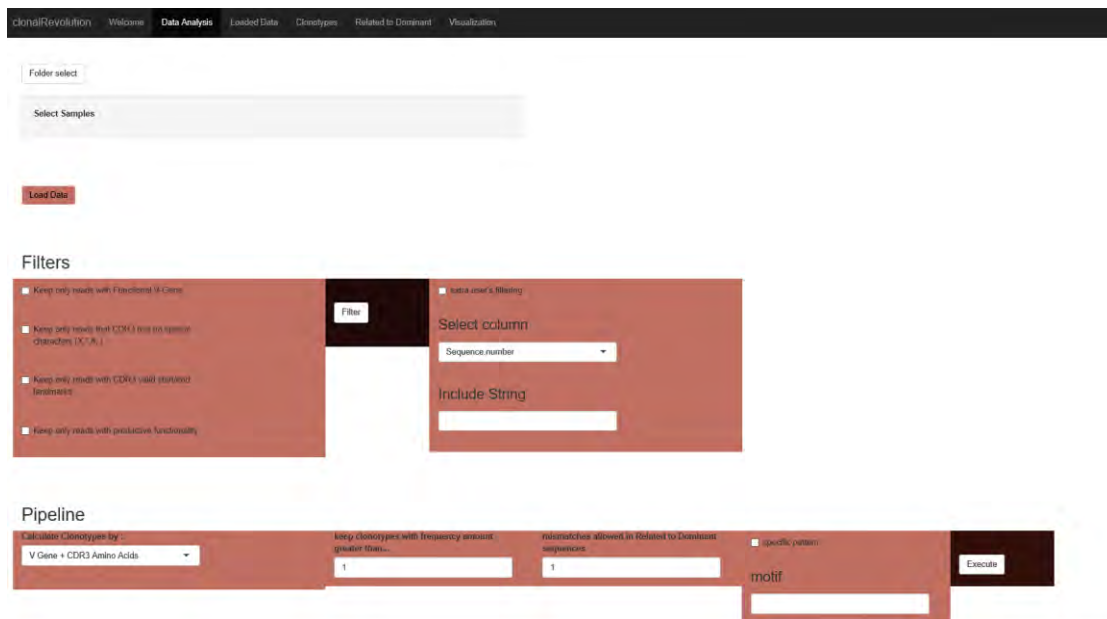
Εικόνα 10. Τα 11 αρχεία κειμένου που αποτελούν αρχεία εξόδου του εργαλείου IMGT/HighV-QUEST.

Το “clonalRevolution” χρησιμοποιεί την πληροφορία που περιέχεται σε 2 από τα 11 αρχεία, τα «3_Nt-sequences.txt» και «5_AA-sequences.txt», που περιέχουν δεδομένα σχετικά με τις αλληλουχίες σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για πίνακες που περιέχουν πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργικότητα των αλληλουχιών, τα γονίδια που συμμετέχουν σε κάθε αλληλουχία (V.DOMAIN.Functionality, V.GENE.and.allele, D.GENE.and.allele) κ.ά.

Η πληροφορία διαχειρίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωριστεί και να χαρακτηριστεί ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος (Dominant Clonotype), οι κλωνότυποι που σχετίζονται με τον κύριο κλωνότυπο (Related to Dominant Clonotypes) και η μεταξύ τους σχέση.

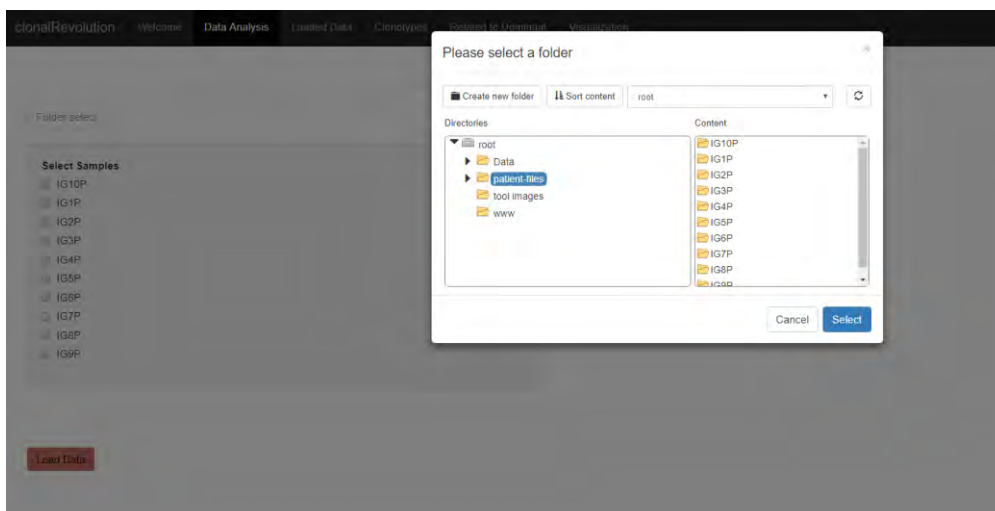
Καρτέλα “Data Analysis”

Η καρτέλα “Data Analysis” σχετίζεται με τον ορισμό του συνόλου των παραμέτρων της ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη καρτέλα πραγματοποιείται η μεταφόρτωση των αρχείων και το φιλτράρισμά τους. Επιπλέον, ορίζονται οι παράμετροι που αφορούν σε μια σειρά από επιμέρους διαδικασίες (Pipeline) που οδηγούν στον εντοπισμό του κύριου κλωνότυπου καθώς και των κλωνότυπων που σχετίζονται με αυτόν. Οι επιλογές του χρήστη στη συγκεκριμένη καρτέλα απεικονίζονται στις επόμενες καρτέλες (“Loaded Data”, “Clonotypes”, “Related to Dominant” και “Visualization”).



Εικόνα 11. Η καρτέλα “Data Analysis”.

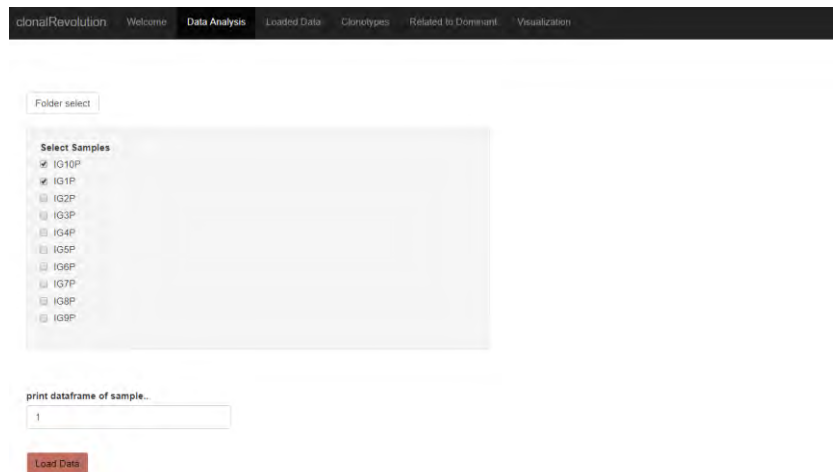
Αρχικά, απαιτείται η μεταφόρτωση των δεδομένων στο εργαλείο. Με την επιλογή «Folder select» ο χρήστης επιλέγει το φάκελο όπου είναι αποθηκευμένα τα δεδομένα των δειγμάτων ενδιαφέροντος.



Εικόνα 12. Επιλογή του φακέλου που περιέχει τα δεδομένα των δειγμάτων ενδιαφέροντος.

Με την επιλογή “Select”, οι συγκεκριμένοι φάκελοι εμφανίζονται στο πλαίσιο “Select Samples”. Σε αυτό το σημείο ο χρήστης επιλέγει τους φακέλους που αντιστοιχούν στα δείγματα που θέλει να φορτωθούν στο εργαλείο. Έτσι είναι δυνατό να φορτωθούν δεδομένα που αφορούν σε πολλαπλά

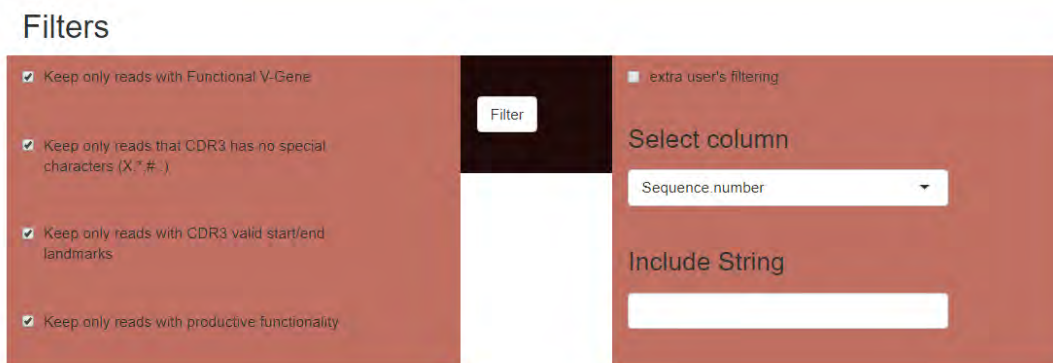
δείγματα του ίδιου ασθενή, τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα (π.χ. πριν και μετά τη θεραπεία) (Εικόνα 12).



Εικόνα 13. Επιλογή των δειγμάτων που πρόκειται να φορτωθούν στο εργαλείο.

Με την επιλογή “Load Data” φορτώνονται στο εργαλείο τα δεδομένα από τα δείγματα που έχουν επιλεγεί (Εικόνα 13). Πιο συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα που έχει επιλέξει ο χρήστης χρησιμοποιούνται 2 txt files, τα «3_Nt-sequences.txt» και «5_AA-sequences.txt», τα οποία περιέχουν ανοσογενετικές πληροφορίες σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο, αντίστοιχα. Πραγματοποιείται συγχώνευση των δεδομένων των 2 αρχείων με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενιαίου πίνακα για κάθε δείγμα, ο οποίος Οι συγκεντρωτικοί πίνακες που προκύπτουν αποθηκεύονται σε μορφή λίστας. Στη συνέχεια, ο χρήστης μπορεί να δει τα δεδομένα από όποιον πίνακα επιθυμεί στην καρτέλα “Loaded Data”. Η σχετική επιλογή μπορεί να γίνει στην καρτέλα “Loaded Data” κάτω από το πλαίσιο του πίνακα.

Πιο κάτω στην καρτέλα εντοπίζεται το πλαίσιο “Filters” που αφορά σε φίλτρα που σχετίζονται με την ποιότητα των δεδομένων.



Εικόνα 14. Το πλαίσιο “Filters” στην καρτέλα “Data Analysis”.

Συνολικά, έχουν ενσωματωθεί 4 διαφορετικά ποιοτικά φίλτρα στο εργαλείο.

- **Functional V-Gene:** Η πρώτη επιλογή σχετίζεται με τη λειτουργικότητα του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου φίλτρου αντιστοιχεί στην επιλογή των αλληλουχιών που διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο IGHV και την απόρριψη των αλληλουχιών με ψευδογονίδιο ή γονίδιο IGHV με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF).

- **CDR3 with no special characters:** Το δεύτερο φίλτρο σχετίζεται με την επιλογή των αλληλουχιών με υψηλή ποιότητα αλληλούχησης της περιοχής CDR3. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του φίλτρου αυτού οδηγεί στην απόρριψη των αλληλουχιών που φέρουν μη ειδικούς χαρακτήρες στην περιοχή CDR3, οι οποίοι δεν αντιστοιχούν σε αμινοξέα και προκαλούνται είτε από λάθη κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης είτε αντιστοιχούν σε μη λειτουργικές αλληλουχίες όπως X, *, . και #. Συγκεκριμένα, το σύμβολο X αφορά σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί το αμινοξύ που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη θέση της περιοχής CDR3, το σύμβολο # εντοπίζεται σε αλληλουχίες εκτός αναγνωστικού πλαισίου (out of frame), ενώ το σύμβολο * αντιστοιχεί σε κωδικόνιο λήξης.
- **CDR3 with valid start/end landmarks:** Το τρίτο φίλτρο αφορά στην οριοθέτηση της περιοχής CDR3. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή CDR3 της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών οριοθετείται μεταξύ 2 εξαιρετικά συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων, μιας κυστεΐνης (CYS) στη θέση 104 και μιας τρυπτοφάνης (W) στη θέση 118 (οι αριθμοί των θέσεων βασίζονται στον ορολογία του IMGT). Η εφαρμογή του συγκεκριμένου φίλτρου οδηγεί στην επιλογή των αλληλουχιών με σαφώς οριοθετημένη περιοχή CDR3.
- **Productive functionality:** Το τέταρτο φίλτρο αφορά στη λειτουργικότητα της αναδιάταξης των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Με αυτό το φίλτρο επιλέγονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε λειτουργικές αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας.

Στην περίπτωση που ο χρήστης θέλει να διαμορφώσει ένα νέο επίπεδο φιλτραρίσματος πέρα από αυτές τις 4 προεπιλεγμένες παραμέτρους μπορεί να επιλέξει το πεδίο με ετικέτα “extra user’s filtering”. Σε αυτό το πεδίο έχουν ενσωματωθεί δυο επιπλέον παράμετροι, με την πρώτη να φέρει την ετικέτα “Select column”, όπου ο χρήστης μπορεί να επιλέξει οποιαδήποτε στήλη του ενιαίου πίνακα κάθε δείγματος και να φιλτράρει ανάλογα τα δεδομένα του. Η δεύτερη παράμετρος φέρει την ετικέτα “Include String” και σχετίζεται με το σύνολο χαρακτήρων ή κάποιο αμινοξικό χαρακτήρα με βάση τον οποίο θα πραγματοποιηθεί το φιλτράρισμα των δεδομένων. Αφού καθοριστούν οι παράμετροι για το φιλτράρισμα, ο χρήστης μπορεί να προχωρήσει με το φιλτράρισμα των δεδομένων μέσω της επιλογής “Filter” (Εικόνα 14). Το αποτέλεσμα του φιλτραρίσματος είναι η διαμόρφωση ενός νέου πίνακα για κάθε δείγμα όπου περιέχονται μόνο οι αλληλουχίες με τα χαρακτηριστικά που επιλέχθηκαν. Στη συνέχεια, ο χρήστης πρέπει να επιλέξει τον ορισμό των κλωνότυπων για την ανάλυσή του στο πεδίο με τίτλο “Pipeline”.

Εικόνα 15. Το πλαίσιο “Pipeline” στην καρτέλα “Data Analysis”.

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί διαφορετικοί ορισμοί για τον κλωνότυπο ανάλογα με το εκάστοτε κλινικό/βιολογικό πλαίσιο. Γενικά, πρόκειται για μια σειρά αλληλουχιών που φέρουν συγκεκριμένα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζοντας ένα (υπο)κλώνο Β λεμφοκυττάρων.

Στο αριστερό μέρος του πεδίου “Pipeline” βρίσκεται ένα πλαίσιο με ετικέτα “Calculate Clonotypes by”. Το εργαλείο παρέχει 14 διαφορετικές επιλογές για τον ορισμό του κλωνότυπου, με κάποιες να εστιάζουν στο αμινοξικό και άλλες στο νουκλεοτιδικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, οι επιλογές παρέχονται είναι οι εξής: “V Gene + CDR3 Amino Acids”, “V Gene and Allele + CDR3 Amino Acids”, “V Gene + CDR3 Nucleotide”, “V Gene and Allele + CDR3 Nucleotide”, “J Gene + CDR3 Amino Acids”, “J Gene + CDR3 Nucleotide”, “J Gene and Allele + CDR3 Amino Acids”, “J Gene and Allele + CDR3 Nucleotide”, “CDR3 Amino Acids”, “CDR3 Nucleotide”, “V nt sequence + CDR3 Amino Acids”, “V region and CDR3 Nucleotide”, “V.D.J nt sequence” και “V.D.J AA sequence”.

Μετά την επιλογή για τον ορισμό του κλωνοτύπου, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε κάθε κλωνότυπο και η συχνότητα κάθε κλωνότυπου. Ο κλωνότυπος με την μεγαλύτερη συχνότητα χαρακτηρίζεται ως ο κύριος κλωνότυπος κάθε δείγματος (Dominant Clonotype). Αφού υπολογιστούν οι κλωνότυποι για κάθε δείγμα στην καρτέλα “Clonotypes” θα εμφανιστούν 2 πίνακες, ένας με το σύνολο των κλωνότυπων του δείγματος και ένας με τον κύριο κλωνότυπο ξεχωριστά.

Οι υπόλοιπες παράμετροι του πεδίου “Pipeline” αφορούν στον ορισμό των κλωνότυπων που θεωρούνται ως σχετιζόμενοι με τον κύριο κλωνότυπο. Υπάρχουν επιλογές που δίνουν στο χρήστη το περιθώριο να επιλέξει κάποια κριτήρια, αλλά υπάρχουν και κάποια προκαθορισμένα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, για να σχετίζεται ένας κλωνότυπος με τον κύριο κλωνότυπο θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίουIGHV από την ίδια υποομάδα και να έχουν περιοχές CDR3 με το ίδιο μήκος. Το πλαίσιο με ετικέτα “keep clonotypes with frequency amount greater than” αποτελεί ένα επίπεδο φιλτραρίσματος όπου τίθεται ένα κατώφλι που σχετίζεται με το σχετικό μέγεθος των κλωνότυπων. Με αυτόν τον τρόπο, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει τους κλωνότυπους που η συχνότητά τους είναι μεγαλύτερη από κάποιο προκαθορισμένο ποσοστό.

Το πλαίσιο με ετικέτα “mismatches allowed in Related to Dominant sequences” δίνει στον χρήστη να επιλέξει το επίπεδο ομοιότητας μεταξύ του κύριου κλωνότυπου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων μέσω του ορισμού του ανώτερου αριθμού επιτρεπόμενων διαφορών (mismatches) εντός της περιοχής CDR3. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση που οι κλωνότυποι οριστούν σε αμινοξικό επίπεδο τότε οι διαφορές αφορούν σε αμινοξέα, ενώ στην περίπτωση που ο ορισμός αναφέρεται στο νουκλεοτιδικό επίπεδο, οι διαφορές θα αντιστοιχούν σε νουκλεοτίδια. Οι δυνατές επιλογές ξεκινούν από το 0 και φτάνουν έως τον μέγιστο αριθμό αμινοξέων ή νουκλεοτιδίων (ανάλογα με τον ορισμό του κλωνοτύπου) της περιοχής CDR3 του κύριου κλωνότυπου.

Στο πεδίο “Pipeline” υπάρχει μια ακόμη προαιρετική επιλογή που δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να ορίσει τους σχετιζόμενους με τον κύριο κλωνότυπους μέσω την αναγνώρισης ενός κοινού συγκεκριμένου (αμινοξικού ή νουκλεοτιδικού) μοτίβου. Με αυτόν τον τρόπο θα επιλεγούν αποκλειστικά ως σχετιζόμενοι οι κλωνότυποι που φέρουν ένα προκαθορισμένο μοτίβο που διαθέτει ο κύριος κλωνότυπος.

Με την επιλογή “Execute” εκτελείται ο υπολογισμός όλων των κλωνότυπων και συγκεκριμένα, ο κύριος κλωνότυπος και οι σχετιζόμενοι με αυτόν κλωνότυποι για κάθε δείγμα. Δημιουργείται ένας τέτοιος πίνακας για κάθε δείγμα, ενώ στην περίπτωση ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων τα δεδομένα συγχωνεύονται ώστε να σχηματιστεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας που είναι διαθέσιμος στην καρτέλα “Related to Dominant”. Στον συγκεκριμένο πίνακα υπάρχει και μια επιπλέον στήλη με τίτλο “id” που αντιστοιχεί στο δείγμα προέλευσης (Εικόνα 15).

Καρτέλα “Loaded Data”

Η καρτέλα “Loaded Data” περιέχει πληροφορίες για τα δεδομένα που μεταφορτώθηκαν καθώς και τις αλληλουχίες που πέρασαν από τα οριζόμενα φίλτρα. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη καρτέλα εντοπίζεται ένας πίνακας με ετικέτα “Raw Data” όπου εμφανίζονται τα αρχικά δεδομένα (πριν την εφαρμογή φίλτρων) του δείγματος επιλογής. Οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορετικές αλληλουχίες, ενώ οι στήλες αφορούν σε διάφορες πληροφορίες είτε σε νουκλεοτιδικό είτε σε αμινοξικό επίπεδο, όπως τα γονίδια της αναδιάταξης, πληροφορίες για την περιοχή CDR3 κ.ά. Στο πλαίσιο με ετικέτα “print dataframe of sample” ο χρήστης μπορεί να επιλέξει το δείγμα ενδιαφέροντος (Εικόνα 16).

Εικόνα 16. Ο Πίνακας με τα αρχικά δεδομένα στην καρτέλα “Load Data”.

Στο πεδίο “Loaded Data” εντοπίζεται ένας πίνακας με τίτλο “Filtered Data” που περιέχει τα αντίστοιχα δεδομένα μετά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος. Ακριβώς κάτω από τον συγκεκριμένο πίνακα εντοπίζεται ένα πλαίσιο με ετικέτα “print dataframe of sample”, όπου ο χρήστης μπορεί να επιλέξει το δείγμα ενδιαφέροντος (Εικόνα 17).

Εικόνα 17. Ο Πίνακας Filtered Data με τα φιλτραρισμένα δεδομένα στην καρτέλα “Load Data”.

Καρτέλα “Clonotypes”

Η καρτέλα “Clonotypes” αφορά στην πληροφορία που σχετίζεται με τους κλωνότυπους του δείγματος ενδιαφέροντος. Στο πάνω μέρος της σελίδας εντοπίζεται ένας πίνακας με τίτλο “All Clonotypes”. Στον συγκεκριμένο πίνακα ο χρήστης μπορεί να παρατηρήσει όλους τους κλωνότυπους ενός δείγματος. Κάτω και από τον συγκεκριμένο πίνακα υπάρχει χαρακτηριστικά πλαίσιο με την ετικέτα “print dataframe of sample” όπου ο χρήστης μπορεί να επιλέξει το δείγμα ενδιαφέροντος.

Κάθε γραμμή του πίνακα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό κλωνότυπο. Οι πρώτες 2 στήλες αφορούν τις παραμέτρους ορισμού του κλωνότυπου (π.χ. γονίδιο V, μήκος περιοχής CDR3). Επιπλέον, υπάρχουν στήλες που αφορούν στα γονίδια IGHV, IGHG και IGHJ, τον αριθμό των αλληλουχιών που αντιστοιχούν

σε κάθε κλωνότυπο (n), τη συχνότητα του κάθε κλωνότυπου (Frequency), το μήκος της περιοχής CDR3 και τον κωδικό του δείγματος (id) (Εικόνα 18).

V_Gene	CDR3.IMGT.y	n	Frequency	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	24883	0.861301488404292	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	296	0.0102457597784701	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	24	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGAVSYYYYYYGMVDV	100	0.00348140533056421	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	90	0.00311526479750779	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	76	0.0026306680512289	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDA	69	0.0023883696780893	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYCGMVDV	65	0.00224991348486674	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	64	0.00221529941168109	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSASYYYYYGMVDV	60	0.00207684319833853	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYCGMVDV	60	0.00207684319833853	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P

Εικόνα 18. Ο πίνακας “All Clonotypes” στην καρτέλα “Clonotypes”.

Στο κάτω μέρος της σελίδας εντοπίζεται ένας πίνακας με ετικέτα “Dominant Clone” που αναφέρεται στον κύριο κλωνότυπο και περιέχει τις ίδιες πληροφορίες με τον προαναφερόμενο πίνακα. Στην περίπτωση που ο κύριος κλωνότυπος είναι ίδιος σε διαφορετικά δείγματα του ίδιου ασθενούς εμφανίζεται κάτω από τον πίνακα η επιγραφή “SAME DOMINANT CLONE BETWEEN SAMPLES” (Εικόνα 19).

V_Gene	CDR3.IMGT.y	n	Frequency	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMVDV	24883	0.861301488404292	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IG5P

SAME DOMINANT CLONE BETWEEN SAMPLES

Εικόνα 19. Ο πίνακας του κύριου κλωνότυπου (Dominant Clone) στην καρτέλα “Clonotypes”.

Καρτέλα “Related to Dominant”

Η καρτέλα “Related to Dominant” αφορά στους κλωνότυπους που σχετίζονται με τον κύριο κλωνότυπο. Πιο συγκεκριμένα, στην σελίδα παρατίθενται 3 διαφορετικοί πίνακες. Ο πρώτος με τίτλο “(from all samples)” αφορά στους κλωνότυπους από όλα τα δείγματα που σχετίζονται με τον κύριο κλωνότυπο (Εικόνα 20).

clonalRevolution Welcome Data Analysis Loaded Data Clonotypes Related to Dominant Visualization

Related to Dominant Clone Clonotypes

(from all samples)

Show 10 entries Search:

V_Gene	CDR3.IMGTy	n	Frequency	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id	V_gene_family	Mismatches
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	76	0.0026309680512288	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	91	0.00202758405561373	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AKATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	21	0.000726895119418484	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AMATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	17	0.000588438906195916	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AMATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	31	0.000980715447516767	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAAQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	43	0.00148840429214281	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAAQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	54	0.00120318174728727	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAIQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	22	0.000761509172724126	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAIQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	23	0.000512466299770504	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATANQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	36	0.00124610591900312	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1

Showing 1 to 10 of 122 entries Previous 1 2 3 4 5 ... 13 Next

Εικόνα 20. Πίνακας των σχετιζόμενων κλωνότυπων στην καρτέλα “Related to Dominant” που αφορά σε όλα τα δείγματα ενδιαφέροντος.

Ακολουθούν πίνακες που περιέχουν την ίδια πληροφορία για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Έτσι προκύπτουν πίνακες με τίτλο “(from 1st sample)”, “(from 2nd sample)”.

(from 1st sample)

Show 10 entries Search:

V_Gene	CDR3.IMGTy	n	Frequency	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id	V_gene_family	Mismatches
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	76	0.0026309680512288	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AKATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	21	0.000726895119418484	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AMATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	17	0.000588438906195916	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAAQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	43	0.00148840429214281	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAIQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	22	0.000761509172724126	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATANQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	36	0.00124610591900312	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATASQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	18	0.000623052959601558	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	27	0.000934579439252336	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	41	0.00141917618553133	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	16	0.000553824852890273	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1

Showing 1 to 10 of 70 entries Previous 1 2 3 4 5 6 7 Next

The Mean Frequency of Subclones is 0.00125945705384968
 The Maximum Frequency of Subclones is 0.00346140533056421
 The Minimum Frequency of Subclones is 0.000519210799584631

(from 2nd Sample)

Show 10 entries Search:

V_Gene	CDR3.IMGTy	n	Frequency	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id	V_gene_family	Mismatches
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	91	0.00202758405561373	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	AAATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	31	0.000980715447516767	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAAQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	54	0.00120318174728727	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATAIQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	23	0.000512466299770504	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATANQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	39	0.00098984596250329	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	35	0.000779640021389808	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	68	0.00151511775584323	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	25	0.00055702858670707	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	36	0.000802121164858181	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1
Homsap IGHV1-2	ATATQSRNYYGSVSYYYYYYGMDEV	44	0.000980370312604443	Homsap IGH3-10	Homsap IGHJ6	25	IG6P	Homsap IGHV1	1

Showing 1 to 10 of 52 entries Previous 1 2 3 4 5 6 Next

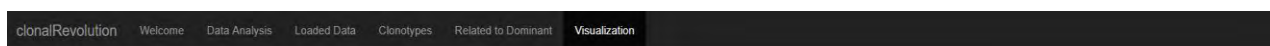
The Mean Frequency of Subclones is 0.00111277172282943
 The Maximum Frequency of Subclones is 0.00251770921191596
 The Minimum Frequency of Subclones is 0.000512466299770504

Εικόνα 21. Πίνακες στην καρτέλα “Related to Dominant” που αφορούν σε διαφορετικά δείγματα.

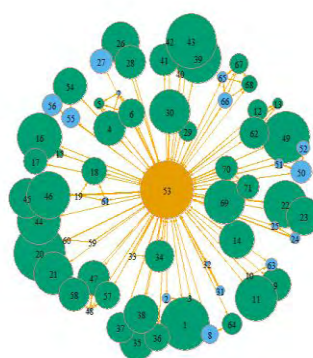
Οι πίνακες στην συγκεκριμένη καρτέλα φέρουν γραμμές που αντιστοιχούν σε διαφορετικούς κλωνότυπους και στήλες με την ίδια πληροφορία με τον πίνακα στην καρτέλα “Clonotypes”. Επιπρόσθετα στις περιπτώσεις που αφορούν πίνακες για συγκεκριμένα δείγματα κάτω από τον κάθε πίνακα δίνεται πληροφορία που αφορά στη μέση συχνότητα, τη μέγιστη συχνότητα και την ελάχιστη συχνότητα των κλωνότυπων στο συγκεκριμένο δείγμα (Εικόνα 21).

Καρτέλα “Visualization”

Η καρτέλα “Visualization” σχετίζεται με την απεικόνιση των εξελικτικών σχέσεων σε ενδοκλωνικό επίπεδο. Απεικονίζονται μέσω γράφων για κάθε δείγμα οι εξελικτικές σχέσεις των υποκλώνων με τον κύριο κλώνο καθώς και μεταξύ τους. Επίσης, οπτικοποιείται μέσα από γραφήματα η κατανομή της συχνότητας του κύριου κλώνου και των υποκλώνων σε δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται ο γράφος που αντανακλά την ενδοκλωνική ετερογένεια ενός τυχαίου δείγματος (Εικόνα 22).



1st Sample Graph



Εικόνα 22. Γράφος απεικόνισης της ενδοκλωνικής ετερογένειας.

Τα διαφορετικά στοιχεία του γράφου αντιστοιχούν σε διαφορετικούς κλωνότυπους και κατά επέκταση σε διακριτούς κλωνικούς υποπληθυσμούς. Κάθε στοιχείο φέρει ένα νούμερο που χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο κλωνότυπο. Χρησιμοποιούνται διαφορετικά χρώματα για την απεικόνιση: του κύριου κλωνότυπου, των σχετιζόμενων κλωνότυπων που εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε κάποιο 1 χρονικό στιγμιότυπο και, τέλος, των σχετιζόμενων κλωνότυπων που εντοπίστηκαν στα δείγματα από τα 2 διαφορετικά στιγμιότυπα.

Συγκεκριμένα, ο κύριος κλωνότυπος απεικονίζεται με κίτρινο, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι που παρίστανται μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα με μπλε και οι κλωνότυποι που εμφανίζονται και στα 2 δείγματα με πράσινο. Τα διαφορετικά στοιχεία του γράφου έχουν διαφορετικό μέγεθος ανάλογα με τη συχνότητα του κλωνότυπου που αφορά στον υποπληθυσμό που αντικατοπτρίζουν. Τα βέλη που εμφανίζονται στον γράφο ενώνουν στοιχεία που αφορούν σε κλωνότυπους με περιοχές CDR3 που παρουσιάζουν μόνο 1 αμινοξική αναντιστοιχία. Με αυτό τον τρόπο απεικονίζονται οι άμεσες εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στους ενδοκλωνικούς υποπληθυσμούς. Είναι δυνατό επίσης να παρατηρηθούν δίκτυα που αναπτύσσονται ενδοκλωνικά ανάμεσα σε διαφορετικούς υποκλώνους και να χαρακτηριστεί η ενδοκλωνική πολυπλοκότητα.

Κάτω από τον γράφο του πρώτου δείγματος υπάρχει πίνακας που φέρει πληροφορία για κάθε στοιχείο του γράφου χαρακτηρίζοντας τον αντίστοιχο κλωνότυπο (Εικόνα 23).

Graph Clarification / 1st Sample

Show 10 entries

	CDR3_AA_SUBCLONES	Frequency	n	V_Gene	D_Gene	J_Gene	CDR3_length	id	V_gene_family	Mismatches
1	AAATQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.0026306880512288	76	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
2	AKATQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000726895119419484	21	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IGSP	Homsap IGHV1	1
3	AMATQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000588438906195916	17	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
4	ATAAQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.00148640429214261	43	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
5	ATAIQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000761509172724126	22	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
6	ATANQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.00124610591900312	36	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
7	ATASQSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000623052959501558	18	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IGSP	Homsap IGHV1	1
8	ATATHSRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000934579439252336	27	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IGSP	Homsap IGHV1	1
9	ATATQARNRYGVSYYYYYGMDEV	0.00141917818553133	41	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IN BOTH SAMPLES	Homsap IGHV1	1
10	ATATQFRNRYGVSYYYYYGMDEV	0.000553824652690273	16	Homsap IGHV1-2	Homsap IGHJ3-10	Homsap IGHJ6	25	IGSP	Homsap IGHV1	1

Showing 1 to 10 of 71 entries

Previous 1 2 3 4 5 8 Next

Εικόνα 23. Πίνακας δεδομένων του γράφου που αντιστοιχεί στο 1^ο δείγμα.

Στον συγκεκριμένο πίνακα κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε έναν κλώνο/στοιχείο του γράφου. Η αντιστοίχιση ανάμεσα στα στοιχεία του γράφου και τις διαφορετικές γραμμές του πίνακα πραγματοποιείται μέσα από την αρίθμηση των γραμμών στο αριστερό μέρος του πίνακα και τους αριθμούς των στοιχείων στο γράφο. Ο πίνακας φέρει στήλες που παρέχουν ανοσογενετική πληροφορία για κάθε κλώνο. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται οι στήλες “CDR3_AA_SUBCLONES”, “Frequency”, “n”, “V_Gene”, “D_Gene”, “J_Gene”, “CDR3_length”, “id”, “V_gene_family” και “Mismatches”.

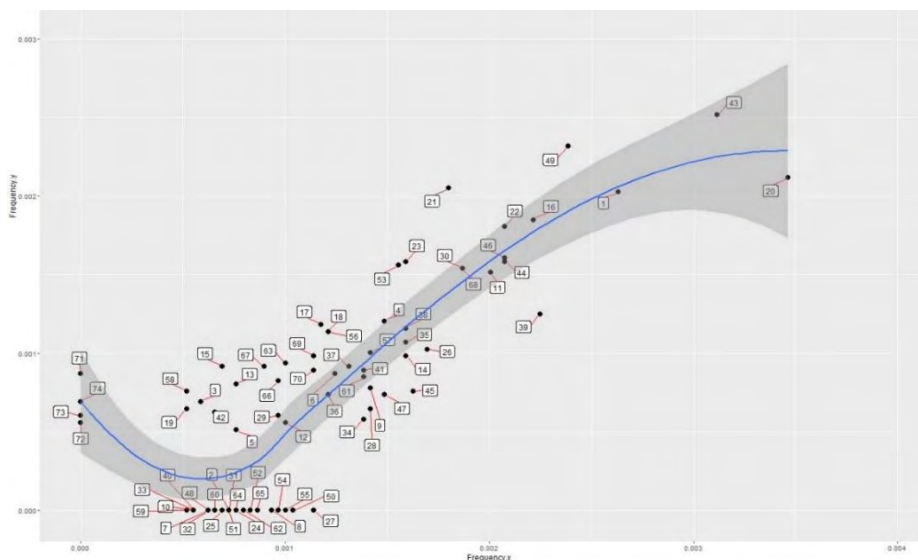
Η στήλη “CDR3_AA_SUBCLONES” αφορά στην αμινοξική αλληλουχία της περιοχής CDR3 για τον αντίστοιχο κλώνο. Στην περίπτωση που η ανάλυση πραγματοποιείται σε νουκλεοτιδικό επίπεδο στη θέση της συγκεκριμένης στήλης εντοπίζεται η στήλη “CDR3_Nt_SUBCLONES” που εμφανίζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής CDR3.

Η στήλη “Frequency” αντιστοιχεί στη συχνότητα του συγκεκριμένου κλώνου. Η στήλη “n” απεικονίζει το σύνολο των διαβασμάτων που σχηματίζουν το συγκεκριμένο κλώνο. Οι στήλες “V_Gene”, “D_Gene” και “J_Gene” παρέχουν πληροφορία σχετικά με τα γονίδια V, D και J, αντίστοιχα.

Η στήλη CDR3_length παρέχει πληροφορία σχετικά με το μήκος της περιοχής CDR3 κάθε κλώνου. Η στήλη “id” χαρακτηρίζει την ταυτότητα του κλώνου. Στη συγκεκριμένη στήλη εμφανίζεται το όνομα του δείγματος από το οποίο προέρχεται ο κλώνος. Στην περίπτωση που ο συγκεκριμένος κλώνος παρίσταται και στα 2 δείγματα του ίδιου ασθενούς, τότε στη στήλη εμφανίζεται η πληροφορία “IN BOTH SAMPLES”. Στην περίπτωση που ο κύριος κλώνος είναι κοινός μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων στη συγκεκριμένη στήλη εμφανίζεται η επιγραφή “DOMINANT”. Βάσει των χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης στήλης επιλέγονται τα χρώματα των στοιχείων του γράφου.

Τέλος, η στήλη “V_gene_family” αφορά την υποομάδα του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV του σχετικού κλώνου, ενώ η στήλη “Mismatches” απεικονίζει τον αριθμό διαφορών που εντοπίζονται στην περιοχή CDR3 μεταξύ του συγκεκριμένου κλώνου και του κύριου κλώνου.

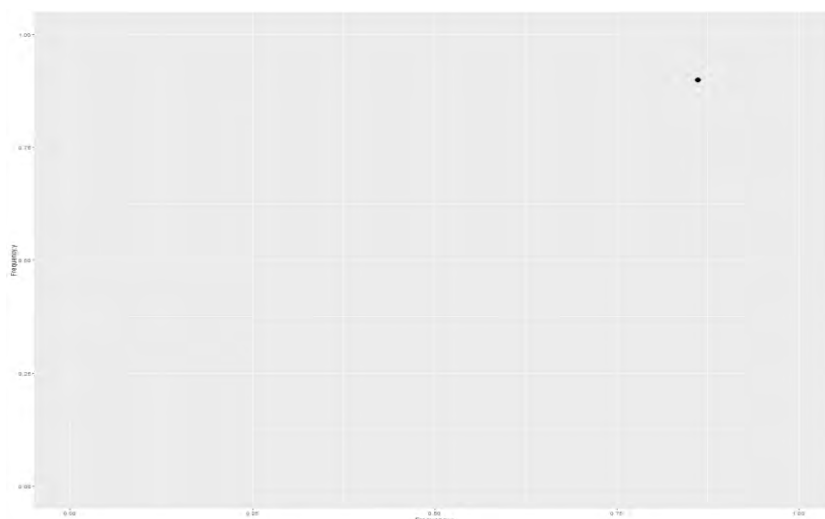
Στη συνέχεια της σελίδας εμφανίζεται γράφος που αφορά στο 2^ο δείγμα και αντίστοιχος πίνακας που περιέχει την ίδια ακριβώς πληροφορία. Τόσο ο γράφος όσο και ο πίνακας για το 2^ο δείγμα οργανώνονται όπως οι αντίστοιχοι του 1^{ου}. Ακολούθως εμφανίζεται γράφημα που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλώνων στα 2 διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Γράφημα απεικόνισης των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων μεταξύ 2 διαφορετικών δειγμάτων του ίδιου ασθενούς.

Κάθε τελεία του γραφήματος αντικατοπτρίζει ένα διαφορετικό κλωνότυπο και συνδέεται με ένα σειριακό αριθμό που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο υποκλώνο. Οι δύο άξονες x και y αφορούν στη συχνότητα των κλωνότυπων στα διαφορετικά δείγματα. Έτσι, οι κλωνότυποι που εμφανίζονται και στα δείγματα έχουν τιμή και για τις 2 διαστάσεις, ενώ όσοι παρατηρούνται μόνο σε ένα εκ των 2 εμφανίζονται πάνω στον αντίστοιχο άξονα. Το συγκεκριμένο γράφημα παρέχει πληροφορία σχετικά με σύγκριση της συχνότητας των κλωνότυπων μεταξύ των 2 δειγμάτων. Κάτω από το συγκεκριμένο γράφημα εντοπίζεται πίνακας που παραθέτει ανοσογενετική πληροφορία για κάθε κλωνότυπο, όπως και στις προαναφερόμενες περιπτώσεις των γράφων.

Στη συνέχεια της καρτέλας εμφανίζεται γράφημα που συσχετίζει τις διαφορετικές συχνότητες του κύριου κλώνου μεταξύ των δειγμάτων στην περίπτωση που αυτός παραμένει ίδιος στις 2 περιπτώσεις. Ο κύριος κλώνος απεικονίζεται με τη μορφή τελείας και οι δύο άξονες x και y αφορούν στη συχνότητά του στα διαφορετικά δείγματα(Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Γράφημα απεικόνισης της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου σε 2 δείγματα του ίδιου ασθενούς.

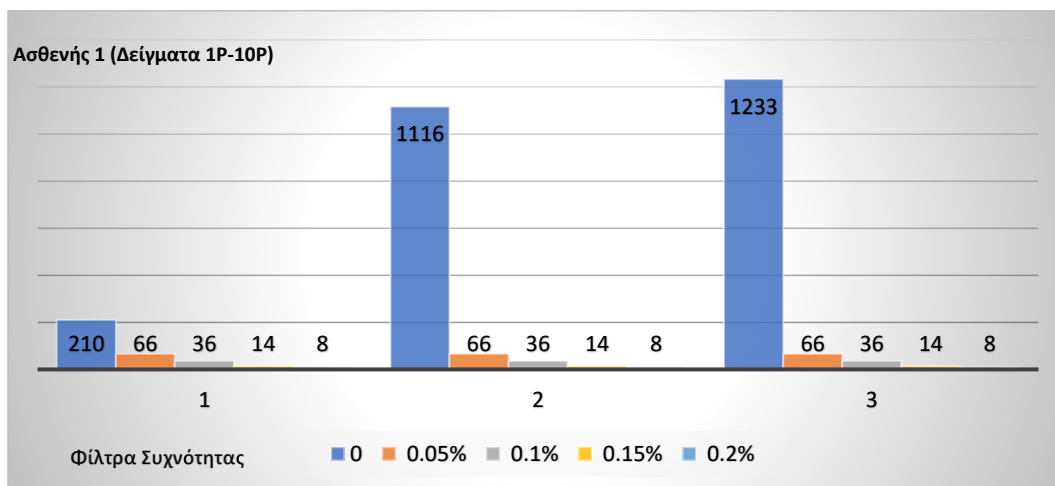
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναλύθηκαν ανοσογενετικά δεδομένα από 5 ασθενείς με ΧΛΛ με το εργαλείο “clonalRevolution”. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του ρεπερτορίου του ΒκΥ με τεχνικές νέας γενιάς σε 2 διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα για κάθε ασθενή. Το πρώτο χρονικό στιγμιότυπο αφορούσε στη διάγνωση των ασθενών, ενώ το δεύτερο στην υποτροπή της νόσου μετά τη χορήγηση θεραπείας. Τα δεδομένα μεγάλης κλίμακας αναλύθηκαν με σκοπό το χαρακτηρισμό της αρχιτεκτονικής του ρεπερτορίου, με έμφαση στην ενδοκλωνική ετερογένεια και την κλωνική εξέλιξη σε ανοσογενετικό επίπεδο.

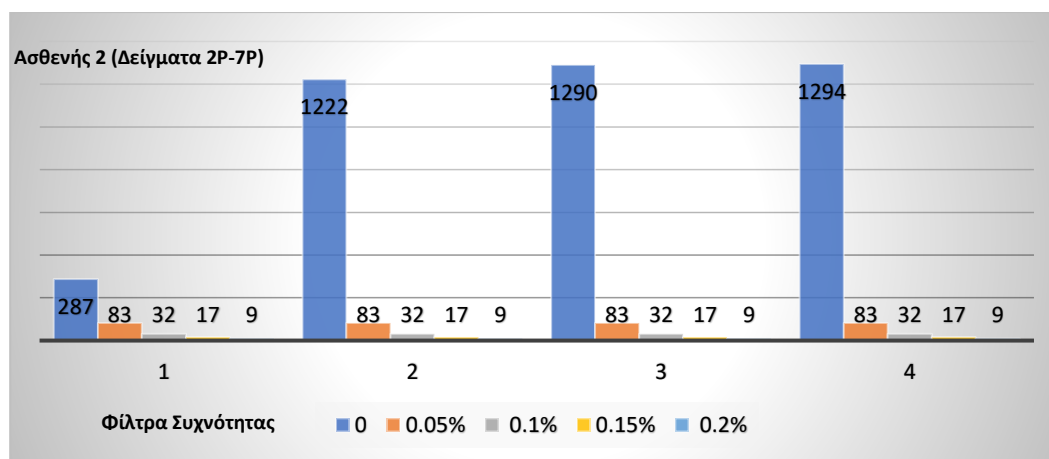
Στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε ο κύριος κλωνότυπος κάθε δείγματος καθώς και οι σχετιζόμενοι με αυτόν μικρότεροι κλωνότυποι. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του αριθμού και του σχετικού μεγέθους των σχετιζόμενων κλωνοτύπων καθώς και η μεταξύ τους σχέση με σκοπό τον πλήρη χαρακτηρισμό της ενδοκλωνικής ετερογένειας σε κάθε δείγμα. Στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των δειγμάτων κάθε ασθενούς, ώστε να αποσαφηνιστεί η επίδραση της θεραπείας στην ανοσογενετική αρχιτεκτονική του λευχαιμικού κλώνου. Ο ορισμός που χρησιμοποιήθηκε για τον κλωνότυπο στην παρούσα ανάλυση ήταν ο εξής: “V Gene + CDR3 Aminoacid”, ο οποίος περιλαμβάνει το αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV και την αμινοξική αλληλουχία της περιοχής CDR3. Με άλλα λόγια, ο κάθε κλωνότυπος περιλάμβανε διαβάσματα (reads) που έφεραν το ίδιο γονίδιο IGHV και ταυτόσημες αλληλουχίες CDR3 σε αμινοξικό επίπεδο.

Η συγκεκριμένη επιλογή για τον ορισμό του κλωνότυπου βασίστηκε στα ευρήματα σχετικών επιστημονικών εργασιών, τα οποία ανέδειξαν τη σημασία του συνόλου της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης στην αντιγονική αναγνώριση. Συγκεκριμένα, η CDR3 αποτελεί την περιοχή της ανοσοσφαιρίνης με τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα και, συνεπώς, με τη μεγαλύτερη σημασία για την αναγνώριση του αντιγόνου. Προτιμήθηκε η ανάλυσή της σε αμινοξικό επίπεδο, καθώς αυτό αντανακλά το τελικό προϊόν των μηχανισμών μεταβλητότητας και της αλληλεπίδρασης με τα σχετικά αντιγόνα. Επιπλέον, στον ορισμό του κλωνοτύπου χρησιμοποιήθηκε και το γονίδιο IGHV, καθώς σχετικές δημοσιεύσεις έχουν αναδείξει τη σημασία της συγκεκριμένης περιοχής στην αλληλεπίδραση με (υπερ)αντιγόνα.

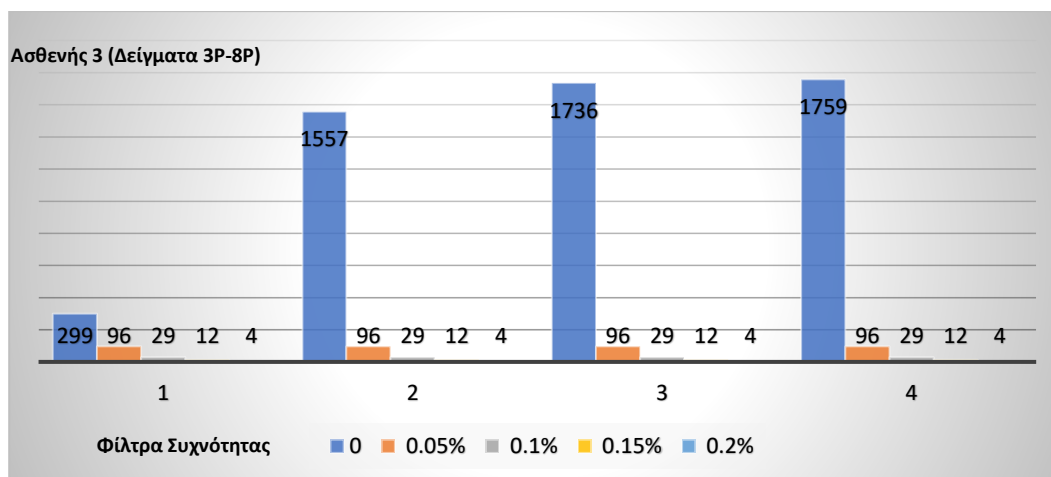
Αρχικά, εφαρμόστηκαν διαφορετικές επιλογές φίλτρων για τον υπολογισμό και χαρακτηρισμό των κλωνότυπων. Ο σκοπός των συγκεκριμένων δοκιμών ήταν η ανάκτηση μιας πιο λεπτομερούς εικόνας για την αρχιτεκτονική του ρεπερτορίου του ΒκΥ σε ασθενείς με ΧΛΛ πριν και μετά τη θεραπεία. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δοκιμάστηκαν 5 φίλτρα συχνότητας (0%, 0,05%, 0,1%, 0,15% και 0,2%) και αναλύθηκαν τα σχετικά αποτελέσματα ως προς τον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνοτύπων που χαρακτηρίζουν το ρεπερτόριο κάθε ασθενούς.



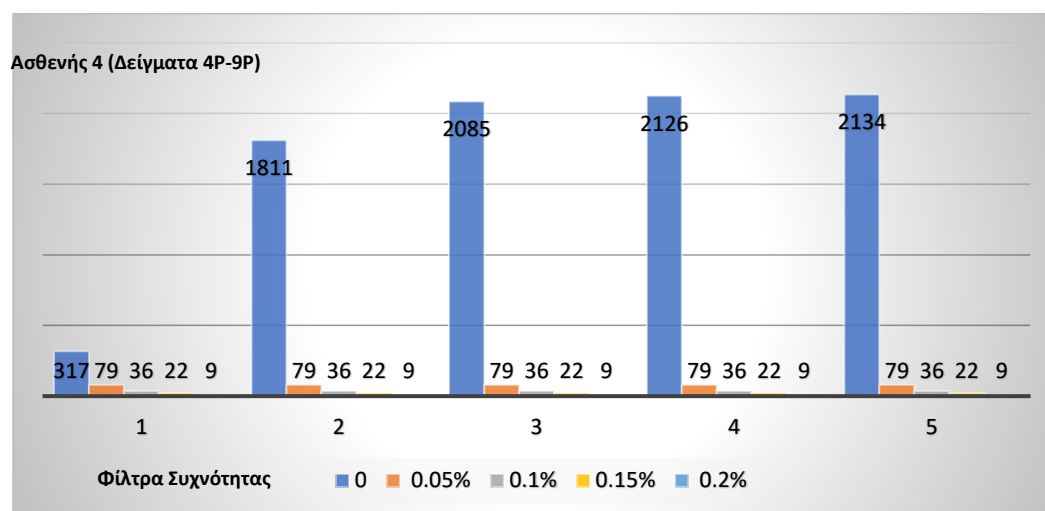
Εικόνα 26. Αριθμός σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με την εφαρμογή διαφορετικών φίλτρων συχνότητας και αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 για την ασθενή 1. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον αριθμό αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων και ο άξονας y στον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο όριο συχνότητας.



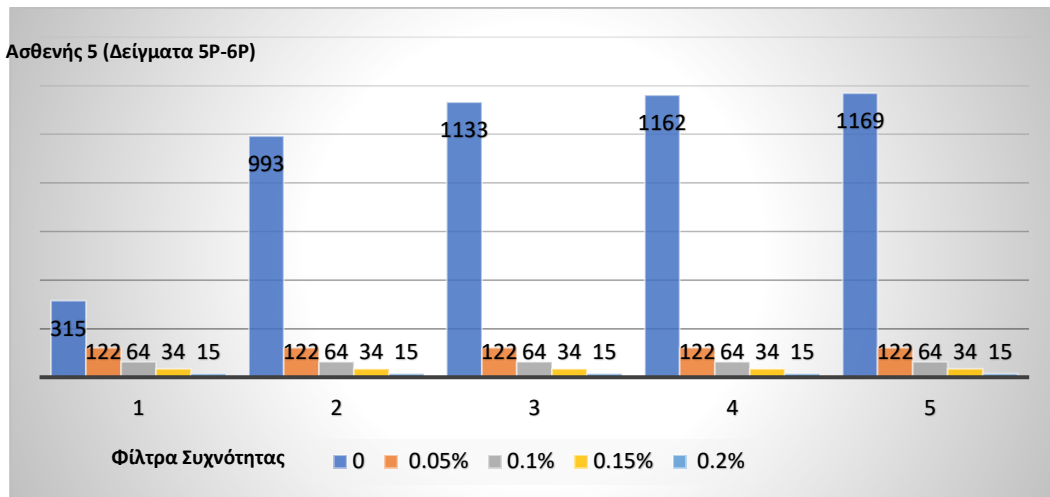
Εικόνα 27. Αριθμός σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με την εφαρμογή διαφορετικών φίλτρων συχνότητας και αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 για τον ασθενή 2. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον αριθμό αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων και ο άξονας y στον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο όριο συχνότητας.



Εικόνα 28. Αριθμός σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με την εφαρμογή διαφορετικών φίλτρων συχνότητας και αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 για τον ασθενή 3. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον αριθμό αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων και ο άξονας y στον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο όριο συχνότητας.



Εικόνα 29. Αριθμός σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με την εφαρμογή διαφορετικών φίλτρων συχνότητας και αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 για τον ασθενή 4. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον αριθμό αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων και ο άξονας y στον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο όριο συχνότητας.



Εικόνα 30. Αριθμός σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με την εφαρμογή διαφορετικών φίλτρων συχνότητας και αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 για τον ασθενή 5. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον αριθμό αμινοξικών διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων και ο άξονας y στον αριθμό των σχετιζόμενων κλωνότυπων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο όριο συχνότητας.

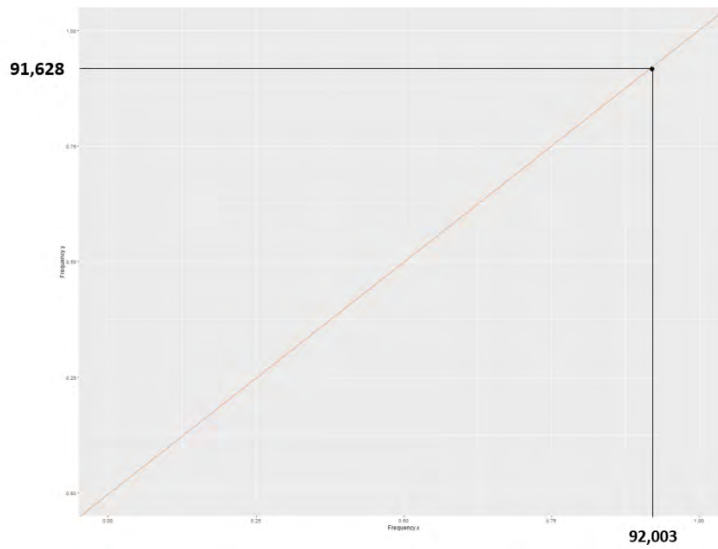
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ως προς την επίπτωση της εφαρμογής του φίλτρου συχνότητας στον αριθμό των κλωνότυπων ήταν παρόμοια σε όλους τους ασθενείς της ομάδας μελέτης. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της μη εφαρμογής φίλτρου και της εφαρμογής του χαμηλότερου φίλτρου συχνότητας (0,05%). Αντίθετα, η μείωση του αριθμού των κλωνότυπων ήταν πολύ μικρότερη στις περιπτώσεις που εφαρμόστηκαν μεγαλύτερα φίλτρα συχνότητας.

Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια όταν λήφθηκε υπόψιν και ο αριθμός επιτρεπόμενων αμινοξικών διαφορών μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων με αυτόν κλωνότυπων με τη μεγαλύτερη διαφορά να εντοπίζεται μεταξύ των φίλτρων συχνότητας 0% και 0,5%. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συντριπτική πλειοψηφία των κλωνότυπων είχαν πολύ μικρή συχνότητα σε όλα τα δείγματα. Με βάση τη σχετική βιβλιογραφία, η βιολογική εγκυρότητα κλωνότυπων με τόσο μικρή συχνότητα είναι αμφισβητήσιμη, καθώς υπάρχει η πιθανότητα να οφείλονται σε τεχνικό λάθος που προέκυψε κατά την πειραματική διαδικασία. Επομένως, για την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων επιλέχθηκε το φίλτρο συχνότητας 0,05% με σκοπό τον αποκλεισμό των αμφισβητούμενων κλωνότυπων και και παράλληλα τη μείωση της πολυπλοκότητας της πληροφορίας, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα αποτελεσματικής μελέτης της ενδοκλωνικής ετερογένειας των δειγμάτων της μελέτης.

Σχετικά με το φίλτρο που αναφέρεται στην αμινοξική αλληλουχία της περιοχής CDR3 εφαρμόστηκαν διαφορετικές επιλογές ως προς τον επιτρεπόμενο αριθμό αμινοξικών διαφορών μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων (1 έως 5). Η μόνη αξιολογηθείσα διαφορά αφορούσε στη μετάβαση από 1 σε 2 διαφορές αποκλειστικά στους κλωνότυπους με συχνότητα μικρότερη από 0,05%. Με βάση τα δεδομένα αυτά, προτιμήθηκε η εφαρμογή σχετικά αυστηρού φίλτρου ώστε να εξασφαλιστεί υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ του κύριου και των μικρότερων κλωνότυπων, ο οποίος θα αντανακλά κοινά πρότυπα αντιγονικής αναγνώρισης. Έτσι, η επιλογή φίλτρου σχετικά με τις αμινοξικές διαφορές που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη εργασία επιτρέπει ως μέγιστο ποσοστό διαφορών το 20% των αμινοξέων της περιοχής CDR3 του κύριου κλωνότυπου. Το ποσοστό αυτό προσαρμόστηκε σε απόλυτο αριθμό επιτρεπόμενων αμινοξικών διαφορών ανάλογα με το μήκος της περιοχής CDR3 του κύριου κλωνότυπου σε κάθε δείγμα. Συνολικά, τα ανοσογενετικά δεδομένων των ασθενών της ομάδας μελέτης αναλύθηκαν με βάση το φίλτρο συχνότητας 0,05% και το φίλτρο αμινοξικών διαφορών 20% της περιοχής CDR3 του κύριου κλωνότυπου για κάθε ασθενή.

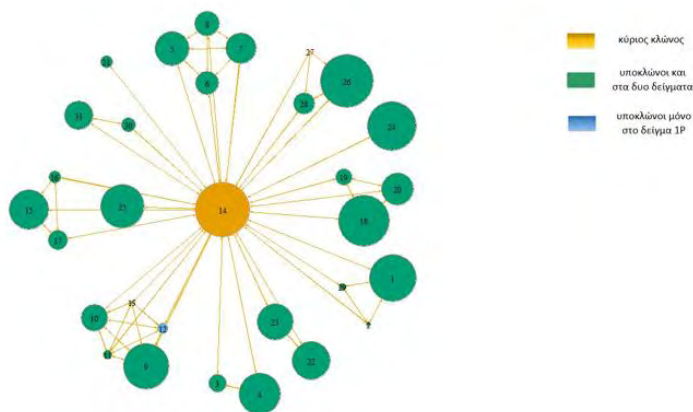
Ασθενής 1 (Δείγματα 1P-10P)

Πρόκειται για ασθενή θηλυκού φύλου και ηλικίας 57 ετών στη διάγνωση της ΧΛΛ. Η ανοσογενετική ανάλυση της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης οδήγησε στην κατάταξή της στην Α-ΧΛΛ, ενώ η ανάλυση της στερεοτυπίας του ΒκΥ έδειξε ότι ανήκει στο στερεότυπο υποσύνολο #1. Συνολικά, τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης σχετίζονται με κακή πρόγνωση και επιθετική νόσο. Στα 2 δείγματα πριν/μετά τη θεραπεία παρατηρήθηκε ο ίδιος κύριος κλωνότυπος. Η περιοχή CDR3 του κύριου κλωνότυπου είχε μήκος 13 αμινοξέα. Επομένως, ο μέγιστος αριθμός επιτρεπόμενων διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 3. Η συγκριτική ανάλυση της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας ανέδειξε μια μικρή μείωση: 92,003% (1P) και 91,628% (10P), αντίστοιχα (Εικόνα 31).

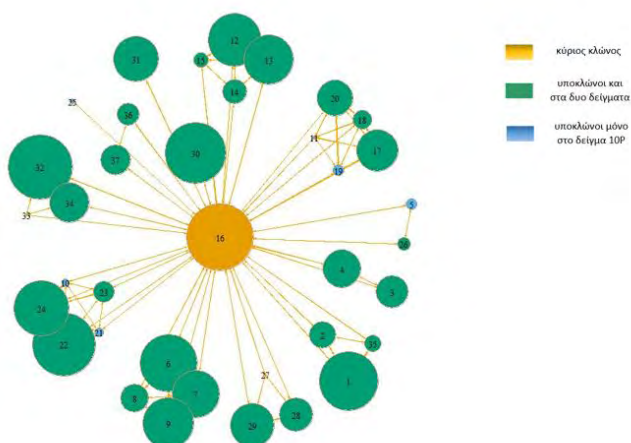


Εικόνα 31. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σχετική συχνότητα του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 1P πριν από τη θεραπεία, άξονας y : η συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 10P μετά τη θεραπεία).

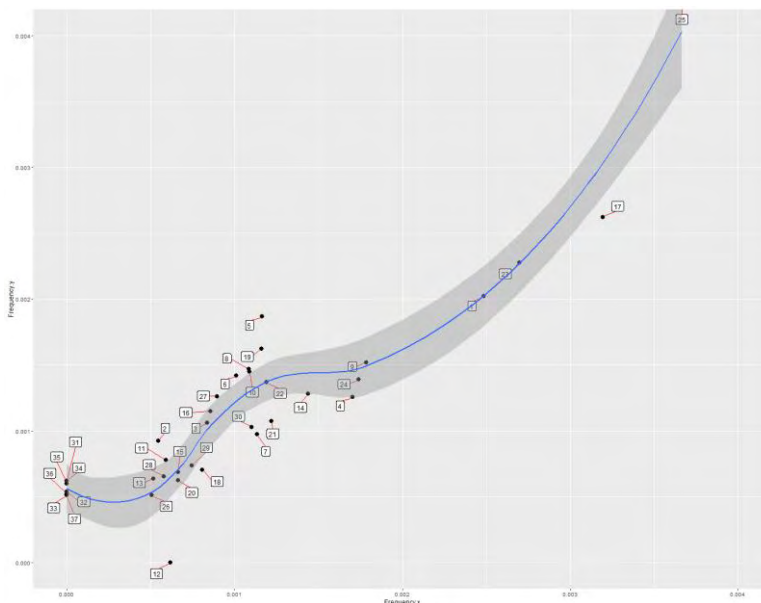
Ο αριθμός των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 30 πριν από τη θεραπεία (1P) και 36 μετά τη θεραπεία (10P). Συγκριτικά, 29 κλωνότυποι ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια 1 κλωνότυπου και την εμφάνιση 7 νέων (6 περισσότεροι). Η μέση συχνότητα των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν τη θεραπεία (1P) ήταν 0,11% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,42%), ενώ μετά τη θεραπεία (10P) ήταν 0,12% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,36%). Το άθροισμα των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 3,3% πριν τη θεραπεία και 4,32% μετά τη θεραπεία. Επομένως, παρατηρήθηκε μια αύξηση στον αριθμό και το σχετικό μέγεθος των σχετιζόμενων κλωνότυπων κατά την υποτροπή της νόσου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των σχετιζόμενων κλωνότυπων μέσω της ομαδοποίησής εκείνων που είχαν διαφορά 1 αμινοξέ. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, στο δείγμα 1P εντοπίστηκαν: 1 ομάδα από 5 σχετιζόμενους κλωνότυπους, 1 ομάδα από 4 κλωνότυπους, 4 ομάδες από 3 κλωνότυπους και 3 ομάδες από 2 κλωνότυπους, ενώ 3 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Στο δείγμα 10P εντοπίστηκαν 2 ομάδες των 5 κλωνότυπων, 2 ομάδες των 4 κλωνότυπων, 3 ομάδες των 3 κλωνότυπων και 3 ομάδες των 2 κλωνότυπων ενώ, 3 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Επομένως, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία επέδειξαν ένα μεγαλύτερο βαθμό ομοιογένειας σε σχέση με τους σχετιζόμενους κλωνότυπους πριν τη θεραπεία.



Εικόνα 32. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 1P (πριν τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 1P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ ο κλωνότυπος που εντοπίστηκε μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζεται με μπλε χρώμα (κλωνότυπος 12). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 33. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 10P (μετά τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 10P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 5, 10, 11, 19, 21, 25 και 27). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.

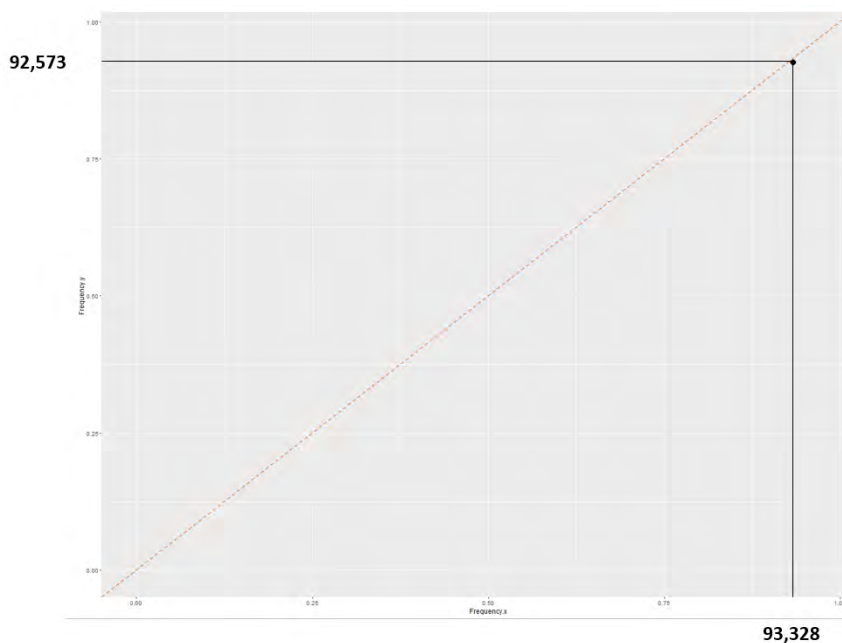


Εικόνα 34. Dot plot που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν/μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 1P, άξονας γ : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 10P).

Ασθενής 2 (Δείγματα 2P-7P)

Πρόκειται για ασθενή αρσενικού φύλου και ηλικίας 44 ετών στη διάγνωση της ΧΛΛ. Η ανοσογενετική ανάλυση της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης οδήγησε στην κατάταξή του στην Μ-ΧΛΛ, ενώ η ανάλυση της στερεοτυπίας του ΒκΥ έδειξε ότι ανήκει στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Συνολικά, τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης σχετίζονται με καλή πρόγνωση και ήπια νόσο.

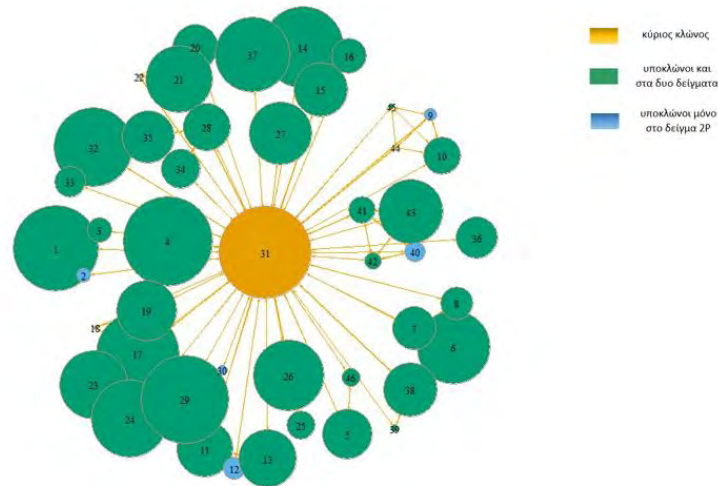
Στα 2 δείγματα πριν/μετά τη θεραπεία εντοπίστηκε ο ίδιος κύριος κλωνότυπος. Η περιοχή CDR3 του κύριου κλώνου είχε μήκος 20 αμινοξέα. Επομένως ο μέγιστος αριθμός επιτρεπόμενων διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 4. Η συγκριτική ανάλυση της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά την χορήγηση θεραπείας ανέδειξε μια μικρή μείωση: 93,328% (2P) και 92,573% (7P) αντίστοιχα (Εικόνα 35).



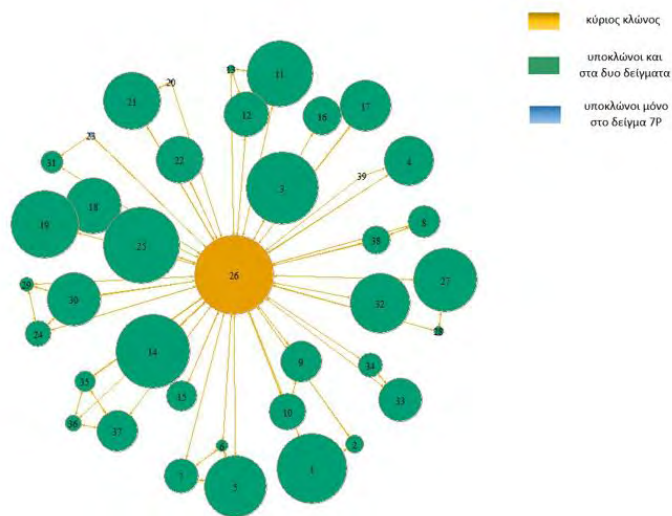
Εικόνα 35. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σχετική συχνότητα του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 2P πριν τη θεραπεία, άξονας γ : η συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 7P μετά τη θεραπεία).

Ο αριθμός των σχετιζόμενων κλωνότυπων στον ασθενή 2 ήταν 45 πριν τη θεραπεία (2P) και 38 μετά τη θεραπεία (7P). Συγκριτικά, 37 κλωνότυποι ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας οδήγησε στην απώλεια 8 κλωνότυπων και στην εμφάνιση 1 νέου (7 λιγότεροι). Η μέση συχνότητα των κλωνότυπων πριν τη θεραπεία (2P) ήταν 0,1072% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,2%), ενώ μετά τη θεραπεία (7P) ήταν 0,1077% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,24%).

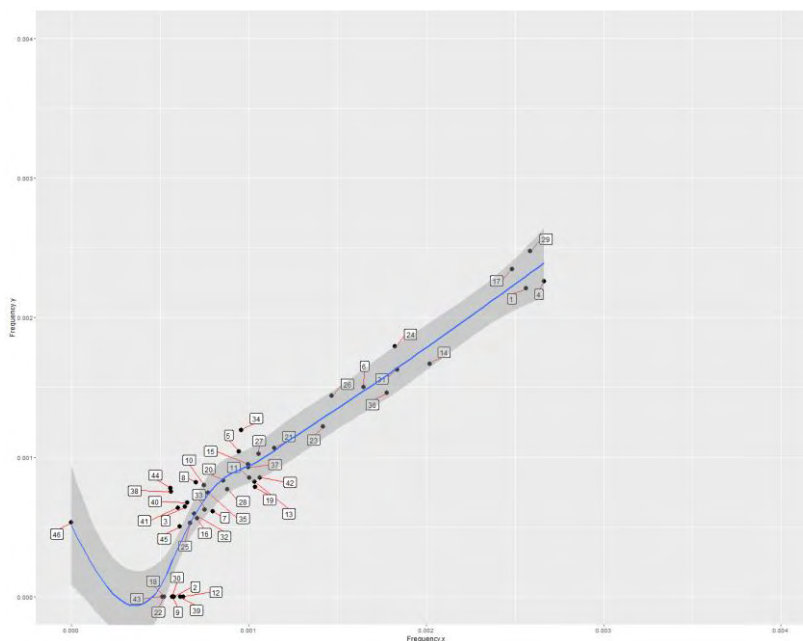
Άρα, κατά την υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των σχετιζόμενων κλωνότυπων παράλληλα με μια οριακή αύξηση στο μέγεθός τους. Το άθροισμα των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 4,82% πριν τη θεραπεία και 4,09% μετά τη θεραπεία. Στο διαγνωστικό δείγμα του ασθενούς, η ομαδοποίηση των σχετιζόμενων κλωνότυπων με διαφορά 1 αμινοξύ οδήγησε στον εντοπισμό 2 ομάδων από 4 κλωνότυπους, 7 ομάδων από 3 κλωνότυπους και 5 ομάδων από 2 κλωνότυπους ενώ, 6 κλωνότυποι δεν σχετιζόνταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Στο αντίστοιχο δείγμα μετά τη θεραπεία εντοπίστηκαν 4 ομάδες των 3 κλωνότυπους και 11 ομάδες των 2 κλωνότυπων. Επίσης, 4 κλωνότυποι δεν σχετιζόνταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Επομένως, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία επέδειξαν μικρότερο βαθμό ομοιογένειας σε σχέση με εκείνους πριν τη θεραπεία, φαινόμενο που πιθανόν να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό σχετιζόμενων κλωνότυπων στην υποτροπή της νόσου.



Εικόνα 36. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 2P (πριν τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 2P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 2, 9, 12, 18, 22, 30, 40 και 44). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 37. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 7P (μετά τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυπος 23). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.

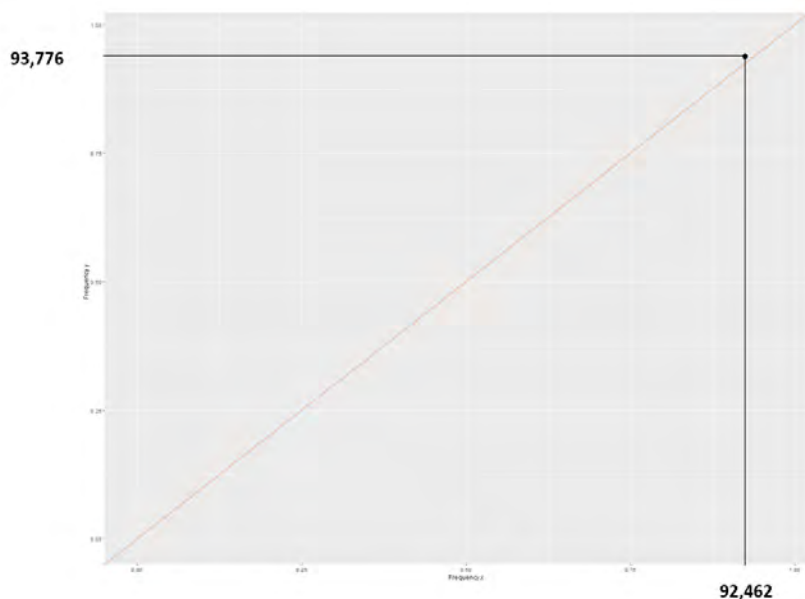


Εικόνα 38. Dot plot που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν/μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 2P, άξονας y : Συχνότητα των κλωνότυπων στο δείγμα 7P).

Ασθενής 3 (Δείγματα 3P-8P)

Πρόκειται για ασθενή αρσενικού φύλου και ηλικίας 66 ετών στη διάγνωση. Η ανοσογενετική ανάλυση της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης οδήγησε στην κατάταξή της στην A-ΧΛΛ, ενώ η ανάλυση στερεοτυπίας του ΒκΥ έδειξε ότι ανήκει στο στερεότυπο υποσύνολο #6. Συνολικά, τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης σχετίζονται με κακή πρόγνωση και επιθετική νόσο.

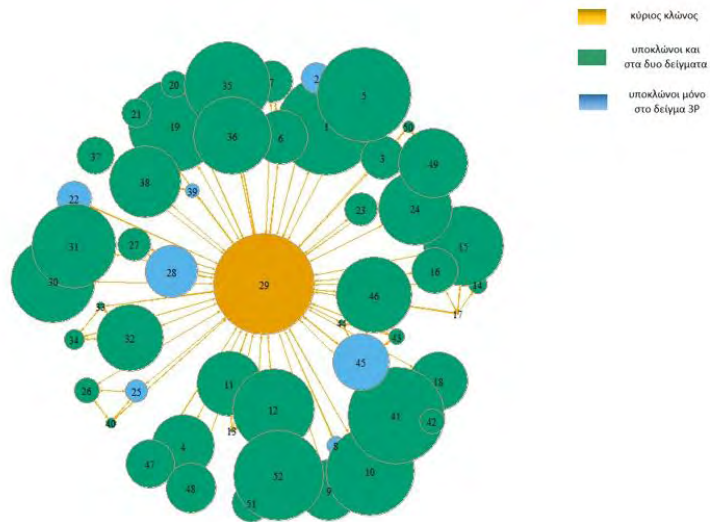
Στα 2 δείγματα πριν/μετά τη θεραπεία παρατηρήθηκε ο ίδιος κύριος κλωνότυπος. Η περιοχή CDR3 του κύριου κλωνότυπου είχε μήκος 21 αμινοξέα. Επομένως, ο μέγιστος αριθμός επιτρεπόμενων διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ κύριου και σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 4. Η συγκριτική ανάλυση της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη χορήγηση της θεραπείας ανέδειξε μια μικρή αύξηση: 92,462% (3P) και 93,776% (8P) αντίστοιχα (Εικόνα 39).



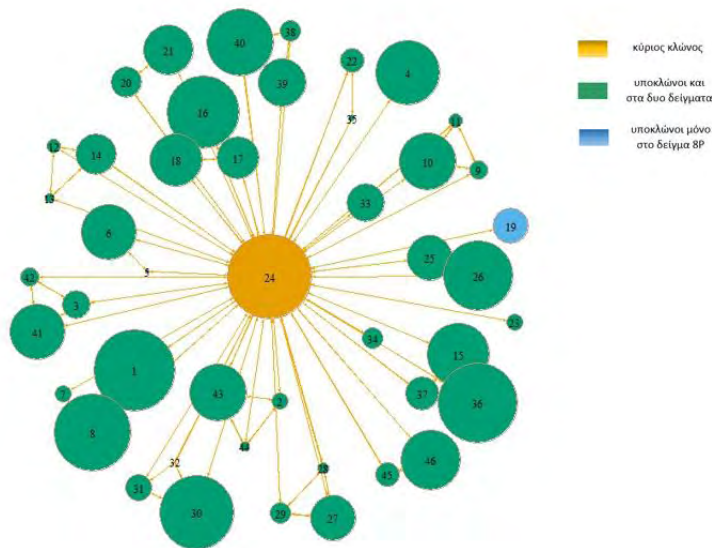
Εικόνα 39. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σχετική συχνότητα του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 3P πριν τη θεραπεία, άξονας y : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 8P μετά τη θεραπεία).

Ο αριθμός των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 51 πριν τη θεραπεία (3P) και 45 μετά τη θεραπεία (8P). Συγκριτικά, 43 κλωνότυποι ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας οδήγησε στην απώλεια 8 κλωνότυπων και στην εμφάνιση 2 νέων (6 λιγότεροι). Η μέση συχνότητα των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν τη θεραπεία (3P) ήταν 0,1% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,36%) ενώ μετά τη θεραπεία (8P) ήταν 0,08% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,35%). Το άθροισμα των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 5,1% πριν τη θεραπεία και 3,6% μετά τη θεραπεία. Επομένως, εντοπίστηκε μείωση του αριθμού και της σχετικής συχνότητας των κλωνότυπων στην υποτροπή της νόσου σε σχέση με τη διάγνωση. Η ομαδοποίηση των σχετιζόμενων κλωνότυπων με βάση το βαθμό ομοιότητάς τους (1 αμινοξική διαφορά) στο δείγμα 3P οδήγησε στον εντοπισμό 2 ομάδων από 4 κλωνότυπους, 8 ομάδων από 3 κλωνότυπους και 6 ομάδων από 2 κλωνότυπους.

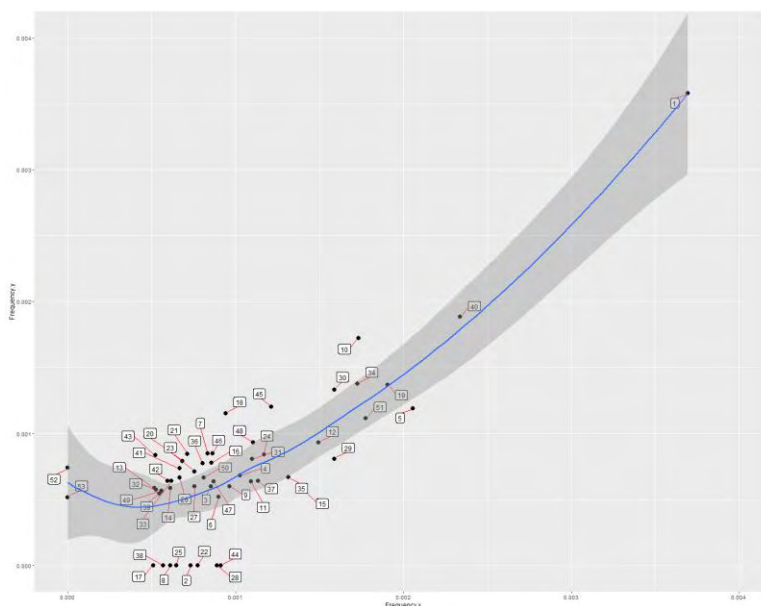
Επίσης, 7 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Στο δείγμα μετά τη θεραπεία (8P) εντοπίστηκαν 9 ομάδες των 3 κλωνότυπων και 6 ομάδες των 2 κλωνότυπων. Τέλος, 6 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Με βάση τα συγκεκριμένα ευρήματα, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία επέδειξαν μικρότερο βαθμό ομοιογένειας σε σχέση με τους σχετιζόμενους κλωνότυπους πριν τη θεραπεία, φαινόμενο που πιθανόν να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό σχετιζόμενων κλωνότυπων στην υποτροπή της νόσου.



Εικόνα 40. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 3P (πριν τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 3P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 2, 8, 17, 22, 25, 28, 39 και 45). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 41. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 8P (μετά τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 8P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 19 και 32). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.

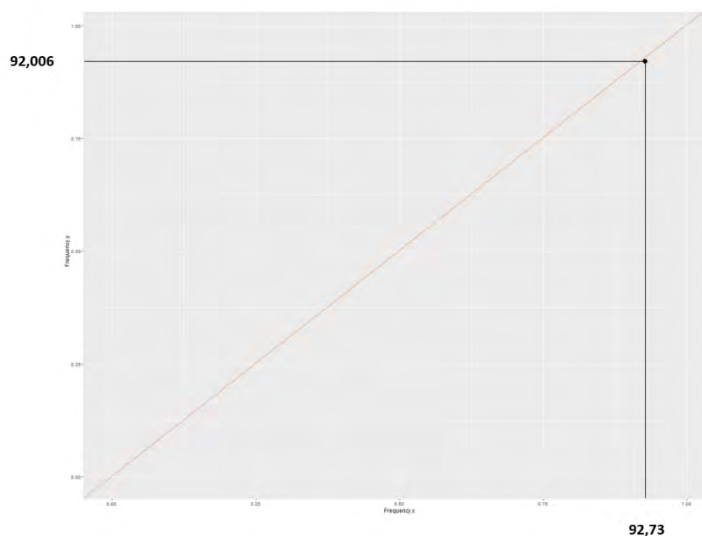


Εικόνα 42. Dot plot που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν/μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 3P, άξονας y : Συχνότητα των κλωνότυπων στο δείγμα 8P).

Ασθενής 4 (4P-9P)

Πρόκειται για ασθενή αρσενικού φύλου και ηλικίας 64 ετών στη διάγνωση. Η ανοσογενετική ανάλυση της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης οδήγησε στην κατάταξή της στην A-ΧΛΛ, ενώ η ανάλυση της στερεοτυπίας του ΒκΥ έδειξε ότι δεν ανήκει σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο. Η κατάταξη του ασθενούς στην A-ΧΛΛ συνδέεται με κακή πρόγνωση και επιθετική νόσο.

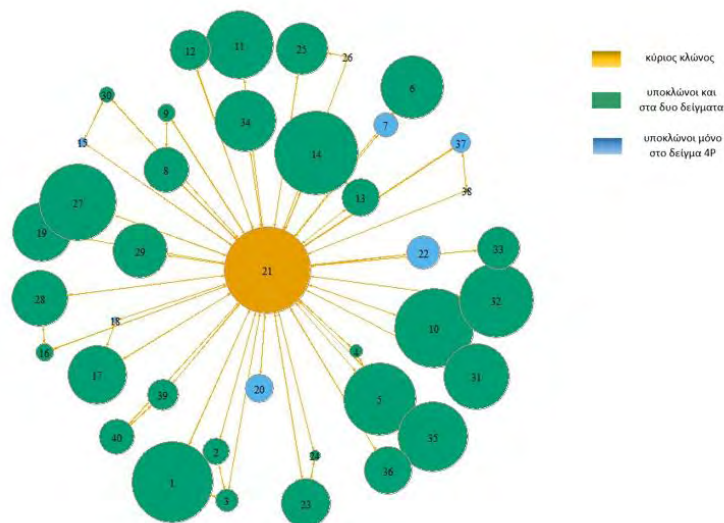
Στα 2 δείγματα πριν και μετά τη θεραπεία εντοπίστηκε ο ίδιος κύριος κλωνότυπος. Η περιοχή CDR3 του κύριου κλώνου είχε μήκος 23 αμινοξέα. Επομένως, ο μέγιστος αριθμός επιτρεπόμενων διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 5. Η συγκριτική ανάλυση της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη χορήγηση της θεραπείας ανέδειξε μια μικρή μείωση: 92,73% (4P) και 92,006% (9P), αντίστοιχα (Εικόνα 43).



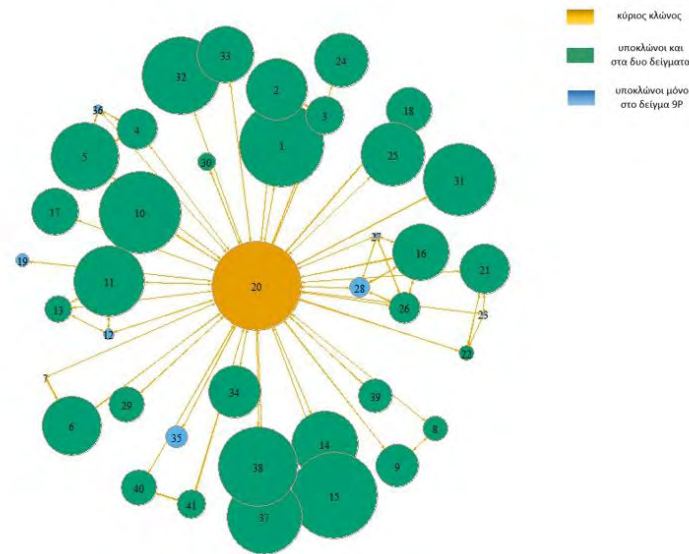
Εικόνα 43. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σχετική συχνότητα του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 4P πριν τη θεραπεία, άξονας y : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 9P μετά τη θεραπεία).

Ο αριθμός των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 39 πριν τη θεραπεία (4P) και 40 μετά τη θεραπεία (9P). Συγκριτικά, 32 κλωνότυποι ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας οδήγησε στην απώλεια 7 κλωνότυπων και στην εμφάνιση 8 νέων (1 παραπάνω). Η μέση συχνότητα των κλωνότυπων πριν τη θεραπεία (4P) ήταν 0,12% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,38%) ενώ μετά τη θεραπεία (9P) ήταν 0,11% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,35%). Το άθροισμα των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 4,68% πριν τη θεραπεία και 4,4% μετά τη θεραπεία. Επομένως, παρατηρήθηκε μια αύξηση του αριθμού των σχετιζόμενων κλωνότυπων μαζί με μια μείωση στη μέση συχνότητά τους.

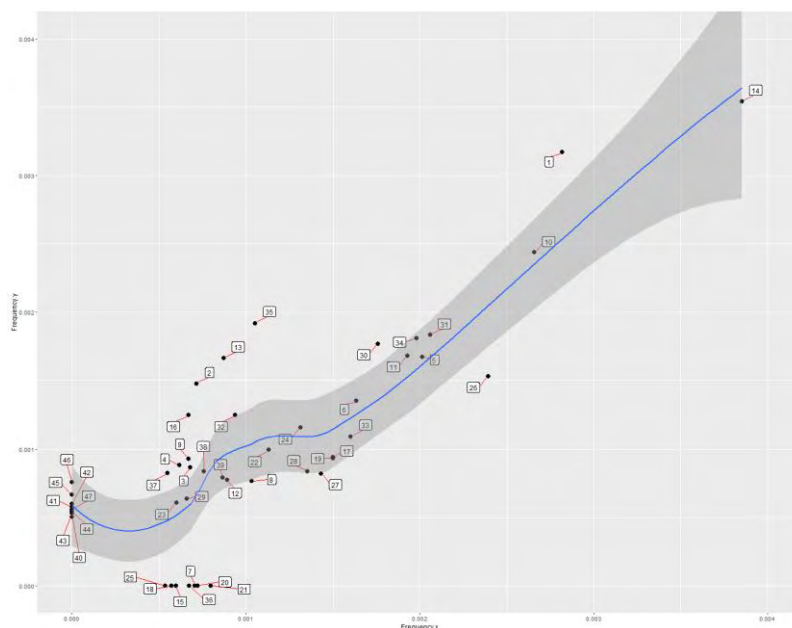
Με βάση την ομαδοποίηση των σχετιζόμενων κλωνότυπων με 1 αμινοξική διαφορά στην περιοχή CDR3, στο δείγμα πριν τη θεραπεία (4P) εντοπίστηκαν 1 ομάδα από 3 κλωνότυπους και 15 ομάδες από 2 κλωνότυπους. Επίσης, 6 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Αντίστοιχα, στο δείγμα μετά τη θεραπεία (9P) εντοπίστηκαν 1 ομάδα των 4 κλωνότυπων, 4 ομάδες των 3 κλωνότυπων και 7 ομάδες των 2 κλωνότυπων. Επίσης, 10 κλωνότυποι δεν σχετίζονταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Επομένως, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία επέδειξαν μικρότερο βαθμό ομοιογένειας σε σχέση με τους σχετιζόμενους κλωνότυπους πριν τη θεραπεία, φαινόμενο που πιθανόν να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό σχετιζόμενων κλωνότυπων στην υποτροπή της νόσου.



Εικόνα 44. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 4P (πριν τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 4P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 7, 15, 18, 20, 22, 26 και 37). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 45. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 9P (μετά τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 9P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 7, 12, 19, 23, 27, 28, 35 και 36). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.

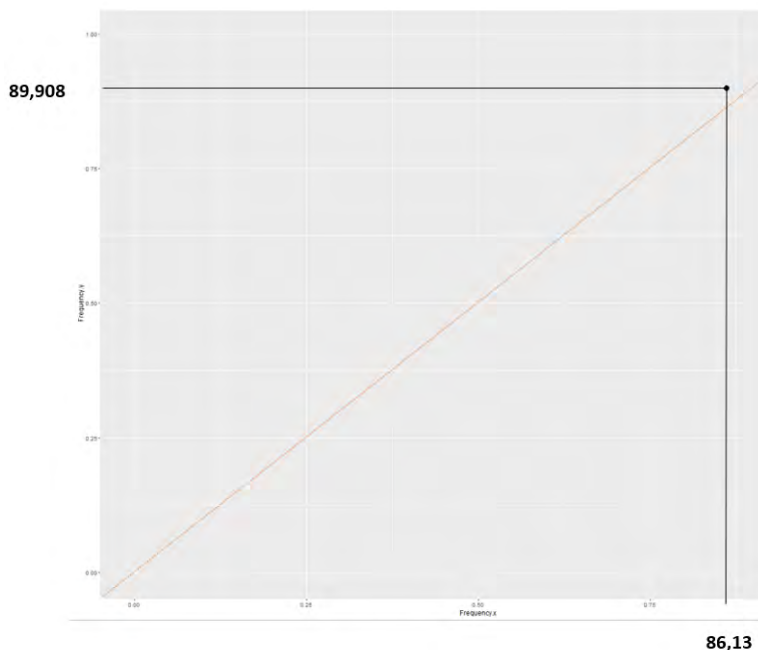


Εικόνα 46. Dot plot που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν/μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 4P, άξονας γ : η συχνότητα των κλωνότυπων στο δείγμα 9P).

Ασθενής 5 (Δείγματα 5P-6P)

Πρόκειται για ασθενή αρσενικού φύλου και ηλικίας 59 ετών στη διάγνωση. Η ανοσογενετική ανάλυση της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης οδήγησε στην κατάταξή της στην A-ΧΛΛ, ενώ η ανάλυση της στερεοτυπίας του Βκγ έδειξε ότι δεν ανήκει σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο. Η κατάταξη του ασθενούς στην A-ΧΛΛ συνδέεται με κακή πρόγνωση και επιθετική νόσο.

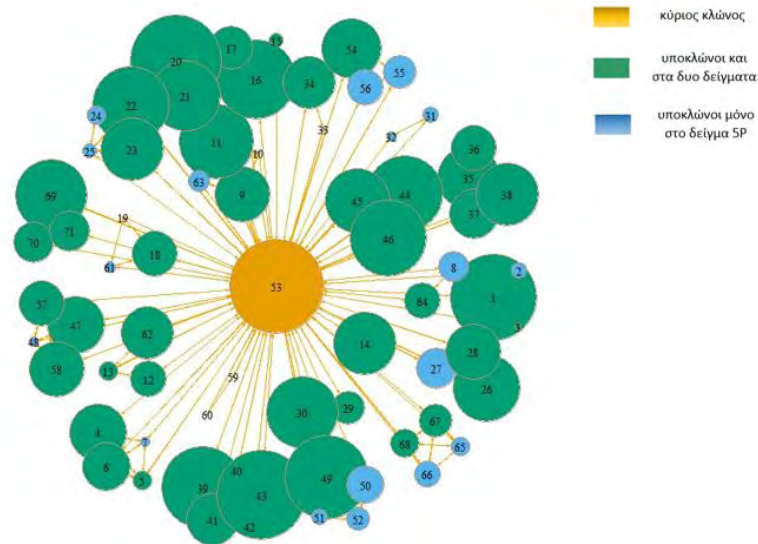
Στα 2 δείγματα πριν/μετά τη θεραπεία παρατηρήθηκε ο ίδιος κύριος κλωνότυπος. Η περιοχή CDR3 του κύριου κλώνου είχε μήκος 25 αμινοξέα. Επομένως, ο μέγιστος αριθμός επιτρεπόμενων διαφορών στην περιοχή CDR3 μεταξύ κύριου και σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 5. Η συγκριτική ανάλυση της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη χορήγηση της θεραπείας ανέδειξε μια αύξηση: 86,13% (5P) και 89,908% (6P), αντίστοιχα (Εικόνα 47).



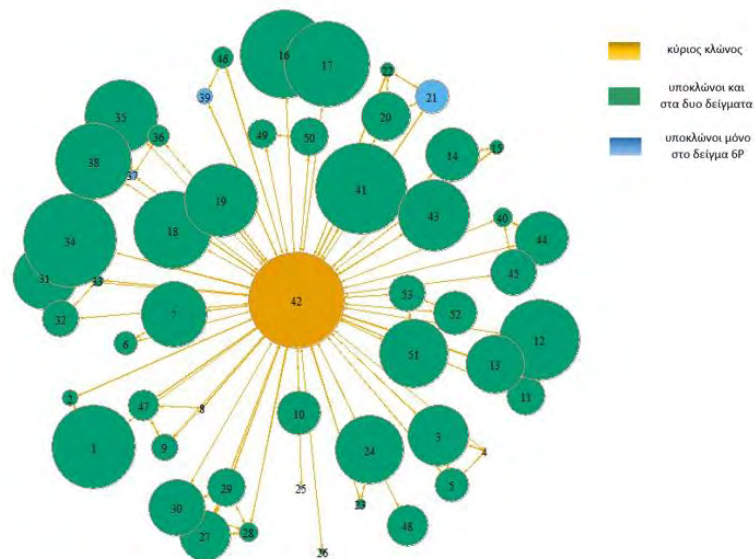
Εικόνα 47. Διάγραμμα που απεικονίζει τη σχετική συχνότητα του κύριου κλωνότυπου πριν και μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 5P πριν τη θεραπεία, άξονας y : Συχνότητα του κύριου κλωνότυπου στο δείγμα 6P μετά τη θεραπεία).

Ο αριθμός των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 70 πριν τη θεραπεία (5P) και 52 μετά τη θεραπεία (6P). Συγκριτικά, 48 κλωνότυποι ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας οδήγησε στην απώλεια 22 κλωνότυπων και στην εμφάνιση 4 νέων (18 παραπάνω). Η μέση συχνότητα των κλωνότυπων πριν τη θεραπεία (5P) ήταν 0,12% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,34%) ενώ μετά τη θεραπεία (6P) ήταν 0,11% (εύρος συχνοτήτων: 0,05% έως 0,25%). Το άθροισμα των συχνοτήτων των σχετιζόμενων κλωνότυπων ήταν 8,4% πριν τη θεραπεία και 5,72% μετά τη θεραπεία. Επομένως, παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό και το μέγεθος των σχετιζόμενων κλωνότυπων στο στάδιο της υποτροπής της νόσου.

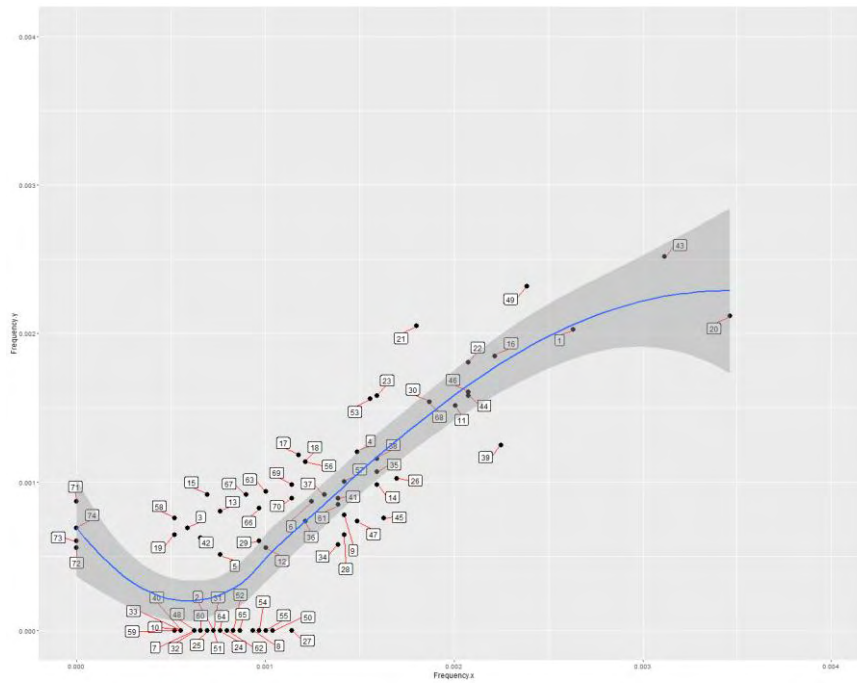
Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, στο συγκεκριμένο δείγμα εντοπίστηκαν 7 ομάδες των 4 κλωνότυπων, 8 ομάδες των 3 κλωνότυπων και 6 ομάδες των 2 κλωνότυπων. Επίσης, 1 κλωνότυπος δεν σχετιζόταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, στο συγκεκριμένο δείγμα εντοπίστηκαν 3 ομάδες των 4 κλωνότυπων, 7 ομάδες των 3 κλωνότυπων και 7 ομάδες των 2 κλωνότυπων. Επίσης, 5 κλωνότυποι δεν σχετιζόταν άμεσα με άλλον κλωνότυπο. Επομένως, οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι μετά τη θεραπεία επέδειξαν μικρότερο βαθμό ομοιογένειας σε σχέση με τους σχετιζόμενους κλωνότυπους πριν τη θεραπεία, φαινόμενο που πιθανόν να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό σχετιζόμενων κλωνότυπων στην υποτροπή της νόσου.



Εικόνα 48. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 5P (πριν τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 5P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε χρώμα (κλωνότυποι 2, 7, 8, 10, 24, 25, 27, 31, 32, 33, 40, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 60, 61, 63, 65 και 66). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 49. Γράφος του κύριου και των σχετιζόμενων κλωνότυπων του δείγματος 6P (μετά τη θεραπεία). Ο κύριος κλωνότυπος του δείγματος 6P απεικονίζεται στο κέντρο του γραφήματος με κίτρινο χρώμα. Οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν και στα 2 δείγματα του ασθενούς (πριν και μετά τη θεραπεία) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι κλωνότυποι που εντοπίστηκαν μόνο στο συγκεκριμένο δείγμα απεικονίζονται με μπλε (κλωνότυποι 21, 25, 37 και 39). Το μέγεθος των στοιχείων του γράφου αντικατοπτρίζει τη συχνότητα του αντίστοιχου σχετιζόμενου κλωνότυπου, ενώ οι γραμμές αντιστοιχούν σε διαφορά ενός αμινοξέος στην περιοχή CDR3 και επομένως ομαδοποιούν κλωνότυπους με μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 50. Dot plot που απεικονίζει τις συχνότητες των σχετιζόμενων κλωνότυπων πριν/μετά τη θεραπεία (Άξονας x : Συχνότητα κλωνότυπων στο δείγμα 5P, άξονας γ : Συχνότητα των κλωνότυπων στο δείγμα 6P).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ευαισθησία των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς επιτρέπει τη μελέτη και το χαρακτηρισμό του άνοσου ρεπερτορίου σε ένα πολύ μεγαλύτερο βάθος σε σχέση με τις προηγούμενες τεχνολογίες. Στο ανοσογενετικό επίπεδο, μπορεί να προωθήσει μελέτες που στοχεύουν στην ανάλυση της κλωνικής ποικιλομορφίας και ενδοκλωνικής δυναμικής^{85,86}. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση της εξέλιξης του νεοπλασματικού κλώνου σε ανοσογενετικό επίπεδο οδήγησε στην ανακάλυψη μιας απροσδόκητης ενδοκλωνικής ποικιλομορφίας που δεν είχε αναδειχτεί από προηγούμενες προσεγγίσεις⁸¹. Συγκεκριμένα, η ανάλυση ανοσογενετικών δεδομένων από ασθενείς με ΧΛΛ οδήγησε στον εντοπισμό πολλών μικρών κλωνότυπων, οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις που δεν παρατηρούνται στον κύριο κλωνότυπο αντικατοπτρίζοντας διαφορετικά στάδια της κλωνικής εξέλιξης. Σε παρόμοια μελέτη που ακολούθησε με ευαισθησία ανίχνευσης $1,6 \times 10^{-4}$, εντοπίστηκε και πάλι έντονη ενδοκλωνική παραλλαγή του μεταλλακτικού φορτίου⁸⁷.

Επιπρόσθετα, η εφαρμογή των συγκεκριμένων τεχνικών αλληλούχησης έχει ιδιαίτερη σημασία και σε κλινικό επίπεδο καθώς τα κύτταρα που εκφράζουν αυτούς του κλωνότυπους μπορεί να έχουν διαφορετικές ιδιότητες, όπως π.χ. αυξημένη ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Μια από τις πιο γνωστές εφαρμογές είναι η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN) με την ευαισθησία της μεθόδου να είναι ένα πολύ κρίσιμο ζήτημα, καθώς οι μισοί από τους ασθενείς που υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων (allo-HCT) επανεμφανίζουν τη νόσο⁸⁸. Σε περιπτώσεις που παρατηρείται ανίχνευση EYN, ακόμη και σε πολύ μικρό βαθμό μετά από τη θεραπεία, η πρόγνωση των ασθενών δεν είναι καλή. Αρκετές από αυτές τις περιπτώσεις σχετίζονται με την ύπαρξη πολύ μικρών, μη-ανιχνεύσιμων λευχαιμικών κλώνων, οι οποίοι εκπτύχθηκαν ραγδαία στο πλαίσιο της εξελικτικής πίεσης από τη χορήγηση θεραπείας⁸³. Η μελέτη των συγκεκριμένων κλωνότυπων έδειξε ότι συχνά προέκυπταν από άλλους προϋπάρχοντες κλωνότυπους ως αποτέλεσμα της διαδικασίας της ενδοκλωνικής ετερογένειας. Επίσης, μελέτες που εστίασαν στη σχέση μεταξύ του αριθμού των διαφορετικών λευχαιμικών κλωνότυπων που προέκυψαν μετά τη θεραπεία και την πορεία της νόσου κατέληξαν στη διατύπωση του συμπεράσματος ότι όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ανιχνεύσιμων κλωνότυπων, τόσο αυξάνεται η επικινδυνότητα της νόσου⁸⁴. Επομένως, οι τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς σε συνδυασμό με ειδικά βιοπληροφορικά εργαλεία δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της ενδοκλωνικής ετερογένειας με εγκυρότητα, ευαισθησία και ακρίβεια με σημαντικές επιπτώσεις σε βιολογικό και κλινικό επίπεδο.

Σε αυτό το πλαίσιο, το βιοπληροφορικό εργαλείο που αναπτύχθηκε αποτύπωσε με λεπτομέρεια την κλωνική αρχιτεκτονική μέσω του ακριβούς υπολογισμού του συνόλου των κλωνότυπων και των σχετικών τους μεγεθών. Η εφαρμογή συγκεκριμένων φίλτρων που αφορούσαν στη συχνότητα και τις αμινοξικές διαφορές εντός της περιοχής CDR3 έδωσε τη δυνατότητα εξαγωγής σημαντικής πληροφορίας τόσο για την κλωνικότητα του δείγματος όσο και για την εγκυρότητα των μικρότερων κλωνότυπων που σχετίζονταν με αυτόν.

Η συγκεκριμένη μελέτη εστίασε στην ανάλυση ανοσογενετικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας με σκοπό την αποτύπωση της ενδοκλωνικής ετερογένειας και το χαρακτηρισμό του φαινομένου της κλωνικής εξέλιξης σε 5 ασθενείς με ΧΛΛ που χορηγήθηκε χημειο-ανοσοθεραπεία FCR. Πρόκειται για συνδυασμό 3 φαρμάκων, fludarabine (ανάλογο πουρίνης), cyclophosphamide (αλκυλιωτικός παράγοντας) και rituximab (anti-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα). Αναλύθηκαν 2 δείγματα από κάθε ασθενή, τα οποία αντιστοιχούσαν σε χρονικά στιγμιότυπα πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας και πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της κλωνικής αρχιτεκτονικής με το βιοπληροφορικό εργαλείο

“clonalRevolution”. Κατά την ανάλυση, αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε ο κύριος κλωνότυπος κάθε δείγματος καθώς και οι σχετιζόμενοι με αυτόν μικρότεροι κλωνότυποι. Ακολούθως, αναλύθηκε ο αριθμός και το σχετικό μέγεθος των σχετιζόμενων κλωνότυπων στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού της ενδοκλωνικής ετερογένειας ώστε να αποσαφηνιστεί η επίδραση της θεραπείας στην ανοσογενετική αρχιτεκτονική του κλώνου.

Το κύριο συμπέρασμα που προκύπτει από την συγκεκριμένη μελέτη είναι ότι ο κύριος κλωνότυπος παραμένει ίδιος τόσο πριν όσο και μετά τη θεραπεία στο σύνολο των ασθενών της ομάδας μελέτης χωρίς σημαντική μεταβολή στο σχετικό του μέγεθος. Οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι που ανιχνεύθηκαν παρουσίασαν εξαιρετικά χαμηλότερες συχνότητες σε σχέση με τον κύριο κλωνότυπο. Επομένως, η χορήγηση θεραπείας FCR δεν είχε μεγάλη επιρροή στην αρχιτεκτονική του κλώνου.

Επιπρόσθετα, κατά την συγκριτική ανάλυση των δειγμάτων πριν και μετά τη θεραπεία, παρατηρήθηκαν κλωνότυποι που ήταν παρόντες και στα 2 δείγματα, κλωνότυποι που χάθηκαν μετά τη θεραπεία και κάποιοι νέοι κλωνότυποι που εμφανίστηκαν μετά τη θεραπεία. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται άμεσα με την αντιγονική επιλογή που ασκείται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων που πλαισιώνουν τις ελαφρά διαφοροποιημένες ανοσοσφαιρίνες των διαφορετικών κλωνότυπων. Πιο συγκεκριμένα, σε όλα τα δείγματα η πλειψηφία των σχετιζόμενων κλωνότυπων εντοπίστηκε και στα 2 χρονικά στιγμιότυπα υποδεικνύοντας ότι η επίπτωση της θεραπείας στο επίπεδο της ενδοκλωνικής ετερογένειας ήταν περιορισμένη. Όσον αφορά στο επίπεδο της κλωνικής εξέλιξης, ο αριθμός των κλωνότυπων που χάθηκαν μετά τη χορήγηση θεραπείας ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των νέων κλωνότυπων στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Το συγκεκριμένο εύρημα αποτελεί ένδειξη ότι η χορήγηση θεραπείας οδήγησε σε μείωση της ενδοκλωνικής ετερογένειας των δειγμάτων.

Οι σχετιζόμενοι κλωνότυποι που ανιχνεύτηκαν κατά τη συγκεκριμένη ανάλυση παρουσίασαν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τον κύριο κλωνότυπο. Σε εξελικτικό επίπεδο, θα μπορούσαν είτε να προϋπάρχουν του κύριου κλωνότυπου, είτε να εμφανίστηκαν μετά την κλωνική εξαλλαγή και να προέρχονται από αυτόν. Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε ενδοκλωνικό επίπεδο, ανέδειξε τις πιο άμεσες σχέσεις μεταξύ του κύριου κλωνότυπου και των σχετιζόμενων με αυτόν μικρότερων κλωνότυπων, οι οποίες αφορούσαν σε διαφορά σε 1 αμινοξέος στην περιοχή CDR3. Χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκαν ομάδες των 2, 3, 4 και 5 σχετιζόμενων κλωνότυπων που είχαν παράλληλα άμεση σχέση με τον κύριο κλωνότυπο. Ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι στις περιπτώσεις μικρής αύξησης της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου μετά τη θεραπεία η πολυπλοκότητα τέτοιων ομάδων ενδοκλωνικά εμφάνισε μείωση. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις μικρής μείωσης της συχνότητας του κύριου κλωνότυπου η πολυπλοκότητα τέτοιων ομάδων εμφάνισε μικρή αύξηση. Επομένως, το σχετικό μέγεθος του κύριου κλωνότυπου φαίνεται να συνδέεται με το βαθμό ενδοκλωνικής ετερογένειας σε κάθε δείγμα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι το εργαλείο που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης μπορεί να εμπλουτιστεί με περαιτέρω επιλογές. Πιο συγκεκριμένα, θα ήταν σημαντικό να αναγνωριστούν πιθανά πρότυπα επιλογής στην αντικατάσταση αμινοξέων σε συγκεκριμένες θέσεις της περιοχής CDR3 του κύριου κλωνότυπου. Έτσι, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν οι πιο συντηρημένες και άρα πιο σημαντικές θέσεις της περιοχής CDR3 όσον αφορά στην αλληλεπίδραση με αντιγόνα. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη των διαφορών ώστε να διευκρινιστεί αν υπάρχουν συγκεκριμένα πρότυπα εισαγωγής μεταλλάξεων που συνδέονται με θετική επιλογή ως προς την αντιγονική αναγνώριση. Τέλος, η βαθμονόμηση των διαφορών στο αμινοξικό επίπεδο με βάση τις φυσικοχημικές τους διαφορές μπορεί να βελτιώσει τον χαρακτηρισμό της εξελικτικής απόστασης ανάμεσα σε διαφορετικούς κλωνότυπους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuby, Immunology, 7th edition, W H Freeman & Co. 2013
2. Janeway C TP, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6th ed: Garland Publishing Inc. 2004
3. Kawai, T. & Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373–384.
4. Cooper MD, Alder MN. *The evolution of adaptive immune systems*. *Cell*. 2006;124:815-822.
5. Schlissel MS. *Regulating antigen-receptor gene assembly*. *Nature reviews. Immunology*. Nov 2003;3(11):890-899.
6. Lefranc MP LG. *The immunoglobulin FactsBook*. London: Academic Press. 2001
7. Burmester GR PA, Wandrey SO, Ulrichs T. *Color Atlas of immunology*. Vol 2nd edition.: Thieme. 2003
8. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Experimental and clinical immunogenetics*. 2001;18(2):100-116.
9. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Experimental and clinical immunogenetics*. 2001;18(3):161-174.
10. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Experimental and clinical immunogenetics*. 2001;18(4):242-254.
11. Ghia P, Rosenquist R, Davi F. *Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia*, Wolters Kluwer Health Italy Ltd, 2009
12. Nishihara T, Nagawa F, Imai T, Sakano H. RAG-heptamer interaction in the synaptic complex is a crucial biochemical checkpoint for the 12/23 recombination rule. *The Journal of biological chemistry*. Feb 22 2008;283(8):4877-4885.
13. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. Sep 1 2008;112(5):1570-1580.
14. Fang T, Smith BP, Roman CA. Conventional and surrogate light chains differentially regulate Ig mu and Dmu heavy chain maturation and surface expression. *J Immunol*. Oct 1 2001;167(7):3846-3857.
15. Lassoued K, Illges H, Benlagha K, Cooper MD. Fate of surrogate light chains in B lineage cells. *The Journal of experimental medicine*. Feb 1 1996;183(2):421-429.
16. Meffre E, Davis E, Schiff C, et al. Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nature immunology*. Sep 2000;1(3):207-213.
17. Mårtensson, Inga L, Ceredig, Rhodri. Role of the surrogate light chain and the pre-B-cell receptor in mouse B-cell development. *Immunology*. 2000;101:435-441.
18. Ohmori H, Hikida M. Expression and function of recombination activating genes in mature B cells. *Critical reviews in immunology*. 1998;18(3):221-235.
19. McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. Germinal center reaction. *Current opinion in hematology*. Jan 2001;8(1):52-59.
20. Papavasiliou, F.N. & Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell 109 Suppl*. 2002:S35-44.
21. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Oct 20 2011;118(16):4313-4320.
22. DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer*. Mar 15 2002;94(6):1721-1730.
23. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*. Oct 1994;8(10):1640-1645.
24. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in clinical and experimental hematology*. Mar 2000;4(1):22-47.
25. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American journal of clinical pathology*. Oct 1997;108(4):378-382.

26. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. Feb 24 2005;352(8):804-815.
27. Fouad N, Ibrahim N, Aziz R, Ibrahim S. CD200 Expression in Diagnostic and Prognostic Assessment of Mature B Cell Lymphoproliferative Neoplasms. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2018;19: 3383-3392.
28. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E et al. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;5: v78-v84
29. Hallek M, Cheson B, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 111. 2008;5446-56.
30. Agathangelidis A, Rosenquist R, Davi F et al. Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia: Methods and Protocols. 2019;10:1007/978.
31. Kipps T, Stevenson F, Wu C et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*.2017; 3-17008
32. Jaksic B, Pejša V, Ostojić K S, Kardum K I et al. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Krohem B-ClI 2017. Acta Clinica Croatica*. 2018; 57: 190-215.
33. Hallek M, Cheson B, Catovsky D et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018;131: blood-2017
34. Roos W D, N K F, Bernard O. Chronic lymphocytic leukemia: Time to go past genomics?. *American journal of hematology*. 2016; 91:518–528
35. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Dec 15 2002;100(13):4609-4614.
36. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Feb 1 2003;101(3):1087-1093.
37. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. Mar 1 2007;109(5):2032-2039.
38. Sutton L A, Agathangelidis A, Belessi C, Darzentas N, Davi F, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Antigen selection in B-cell lymphomas-Tracing the evidence. *Seminars in cancer biology*. 2013; 23: 10.1016
39. Dicker F, Schnitger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. Nov 1 2006;108(9):3152-3160.
40. AbdelSalam M, El Sissy A, Samra MA, Ibrahim S, El Markaby D, Gadallah F. The impact of trisomy 12, retinoblastoma gene and P53 in prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. Jun 2008;13(3):147-153.
41. Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathology oncology research : POR*. 2005;11(4):205-210.
42. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. Mar 1 2007;109(5):2032-2039.
43. Dohner, H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
44. Puente XS et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101–105.
45. Damle, R.N. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847.
46. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848-1854.
47. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation*. Oct 15 1998;102(8):1515-1525.
48. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology*. 2003;21:841-894.
49. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. Feb 15 2005;105(4):1678-1685.

50. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2004;113(7):1008-1016
51. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. Aug 16 2004;200(4):519-525
52. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. Jan 1 2007;109(1):259-270.
53. Thorselius M, Krober A, Murray F, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. Apr 1 2006;107(7):2889-2894.
54. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. Jun 15 2003;101(12):4952-4957.
55. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Mar 15 2002;99(6):2262-2264.
56. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2879-2885.
57. Widhopf GF, 2nd, Kipps TJ. Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. Jan 1 2001;166(1):95-102.
58. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. Oct 15 2004;104(8):2499-2504.
59. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2004;113(7):1008-1016.
60. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. Aug 16 2004;200(4):519-525.
61. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. Jan 1 2007;109(1):259-270
62. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. Jun 15 2003;101(12):4952-4957.
63. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2879-2885
64. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. Oct 15 2004;104(8):2499-2504
65. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *British journal of haematology*. Feb 2009;144(4):492-506
66. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* Jan 2010;24(1):125-132.
67. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. Feb 1 2008;111(3):1524-1533
68. Agathangelidis A, Psomopoulos F, Stamatopoulos K. Stereotyped B Cell Receptor Immunoglobulins in B Cell Lymphomas. 2019;139-155
69. Agathangelidis A, Rosenquist R, Davi F, Ghia P, Belessi C, Hadzidimitriou A, Stamatopoulos K. Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia: Methods and Protocols. 2019;1477-1481
70. Greaves M, Malcy C. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481:306-13
71. Shlush L, Hershkovitz D. Clonal Evolution Models of Tumor Heterogeneity. American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting. 2015;662-5
72. Landau D, Tausch E, Taylor W A et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;525-30
73. Alexandrov L, Nik Z S, Wedge D et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500. 415-421.

74. Gerlinger M , Mcgranahan N , Dewhurst S et al. Cancer: Evolution Within a Lifetime. *Annual Review of Genetics*. 2014; 48:215-36.
75. Kostareli E , Sutton L A , Hadzidimitriou A et al. Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2010 24. 1317-24.
76. Sutton L A , Papadopoulos G , Hadzidimitriou et al. An Entity Evolving into a Community: Defining the Common Ancestor and Evolutionary Trajectory of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #4. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2014;720-728
77. Sutton L A , Kostareli E , Stalika E et al. Temporal Dynamics of Clonal Evolution in Chronic Lymphocytic Leukemia with Stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 Antigen Receptors: Longitudinal Immunogenetic Evidence. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2013;230-6.
78. Sutton L A , Kostareli E , Hadzidimitriou A et al. Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: Implications for ongoing interactions with antigen. *Blood*. 2009;114:4460-8
79. Kostareli E , Sutton L A , Hadzidimitriou A et al. Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2010; 24:1317-24.
80. Murray F , Darzentas N , Hadzidimitriou A , Tobin G et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: Implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111:1524-33.
81. Campbell P P E , Stephens P , Dicks E et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2008)105. 13081-6.
82. Jiang Y , Redmond D , Nie K et al. Deep Sequencing Reveals Clonal Evolution Patterns and Mutation Events Associated With Relapse In B Cell Lymphomas. *Genome biology*. 2014; 15(8):432
83. Landau D , Carter S , Getz G et al. Clonal evolution in hematologic malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 2013; 28(1):34-43
84. Wu J , Jia S , Wang C et al. Minimal Residual Disease Detection and Evolved IGH Clones Analysis in Acute B Lymphoblastic Leukemia Using IGH Deep Sequencing. *Frontiers in Immunology*. 2016; 7. 10.3389/fimmu.2016.00403.
85. Bewicke C F , Kumar E , Palladino et al. Applications and Analysis of Targeted Genomic Sequencing in Cancer Studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2019; 17. 10.1016/j.csbj.2019.10.004.
86. Metzker M. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11(1):31-46
87. Niklas N , Pröll J , Weinberger J et al. Qualifying high-throughput immune repertoire sequencing. *Cellular immunology*. 2014;288:31-38.
88. Ritgen M , Böttcher S , Stilgenbauer S et al. 166: Quantitative MRD Monitoring Identifies Distinct GVL Response Patterns after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from the GCLLSG CLL3X Trial. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2008;22:1377-86.