

Πτυχιακή εργασία

Λειτουργική μελέτη των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών
σε ασθενείς με Β λεμφώματα

Functional analysis of the clonotypic B cell receptor
immunoglobulin in patients with B cell lymphomas

Κοτρώνη Ελένη

A.M: 1818055

Επιβλέπων: Κώστας Σταματόπουλος, M.D., PhD

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**



Λάρισα, 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

KONSTANTINO S
STAMATOPOU
LOS

Digitally signed by
KONSTANTINOS
STAMATOPOULOS
Date: 2023.02.17
11:41:07 +02'00'

Κώστας Σταματόπουλος (επιβλέπων)

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

Antonis
Giakoun
tis

Digitally signed by Antonis
Giakountis
DN: cn=Antonis Giakountis,
o=Department of Biochemistry
and Biotechnology, ou=University
of Thessaly,
email=agiakountis@uth.gr, c=GR
Date: 2023.02.15 15:10:24 +02'00'

Αντώνιος Γιακουντής

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

Σταματία Παπουτσοπούλου

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η αντιγονική διέγερση μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα (BκΥ) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση και την ανάπτυξη των κακοηθειών που προέρχονται από ώριμα Β λεμφοκύτταρα. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ανάγκη για την εκτενή μελέτη του ΒκΥ παρέχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη δυνατότητα να κατανοηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί παθογένειας που διέπουν την ανάπτυξη των Β λεμφωμάτων. Η παρούσα εργασία μέσω της παραγωγής των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ από ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #4 της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (ΧΛΛ) ως ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) έχει ως στόχο τη μελέτη του αντιγονικής ειδικότητας και κατά συνέπεια την ανίχνευση του αντίκτυπου της αντιγονικής διέγερσης στη διαμόρφωση του αντιγονικού προφίλ του στερεότυπου υποσυνόλου #4.

Η εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ) υπό την επίβλεψη του κ. Κώστα Σταματόπουλου, Διευθυντή του Ινστιτούτου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ίδιο και την κ. Αναστασία Χατζηδημητρίου, Ερευνήτρια Α' για την ευκαιρία που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την πτυχιακή εργασία στο Ινστιτούτο και συνεργαστώ μαζί τους.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Ιατρού καθώς η εργασία μου δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια, την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλη μου την πορεία μέσα στο Ινστιτούτο. Η ενεργή συμμετοχή της και οι γνώσεις που μου προσέφερε αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους του Ινστιτούτου, Μαρίνα Γερούση, Γιάννη Γκέκα και τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, Ασημένια Γιαγλή, Αντώνη Μίγγο, Κατερίνα Πλιάτσικα, Σοφία Νοτοπούλου και την Μαρία Φυτοπούλου για την εμπειρία που απέκτησα μέσω της ευχάριστης συνεργασίας μας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που με την αγάπη τους, την στήριξη και την αφοσίωσή τους μου έδωσαν την δύναμη και το κουράγιο να ολοκληρώσω επιτυχώς τις σπουδές μου.

Περίληψη

Η λειτουργική μελέτη των ανοσοσφαιρινών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ερευνητικά βήματα για τη βαθύτερη κατανόηση της οντογένεσης των Β λεμφωμάτων. Με βάση την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζεται πως η αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με αντιγόνα αποτελεί κρίσιμο σημείο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ. Συνεπώς, καθίσταται μείζονος σημασίας η περαιτέρω μελέτη για τη φύση των αντιγόνων που εμπλέκονται στη διαμόρφωση της αντιγονικής ειδικότητας των αντισωμάτων των Β κυτταρικών κλώνων.

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στον δυτικό κόσμο. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει το σημαντικό ρόλο του μικροπεριβάλλοντος στην οντογένεση και την εξέλιξη της ΧΛΛ. Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί η μελέτη του υποσύνολου #4 ως προς την αντιγονική του ειδικότητα, εξετάζοντας και συγκρίνοντας την αντιδραστικότητα των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που αντιπροσωπεύουν τον κύριο μεταλλαγμένο ΒκΥ των ασθενών με αυτήν των ΒκΥ που βρίσκονται υποκλωνικά. Αναλυτικότερα, βασιζόμενοι σε αδημοσίευτη μελέτη της ομάδας που πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) βρέθηκε η ύπαρξη 100% αμετάλλακτων υποκλώνων στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Αυτή η ανακάλυψη έρχεται σε αντίθεση με τη μεταλλαγμένη φύση του υποσύνολου γεγονός που προκάλεσε το ενδιαφέρον της ομάδας για περαιτέρω μελέτη.

Μέσα από την παρούσα εργασία καθίσταται φανερό η ύπαρξη ενός διακριτού μηχανισμού παθογένειας στο στερεότυπο υποσύνολο #4, άρρηκτα εξαρτώμενο από αντιγόνα.

Abstract

The functional analysis of the clonotypic B cell receptor immunoglobulin (BcR IG) is one of the most important steps for a better understanding of the ontogeny of B cell malignancies. Accumulating evidence support the notion that the interplay between the BcR IG and the microenvironment is crucial for the survival and the proliferation of the CLL malignant cells. Therefore, the analysis of the nature of the antigens that are implicated in the configuration of the clonotypic BcR IG antigenic profile.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common adult leukemia in the western world. Previous studies have emphasized the importance of the microenvironment in the ontogeny and evolution of the disease. In the present thesis, we focus on the study of the CLL subset #4. In particular, the aim of this study was to investigate the antigenic specificity of this subset and whether/how is affected by the affinity maturation. To achieve that we compared the (auto)reactivity profile of the clonotypic BcR IG to that detected in the subclonal level by next-generation sequencing. To be more specific, according to an unpublished study of our research team and through NGS analysis, distinct clonotypes with 100% unmutated gene rearrangements were observed; these findings are quite contradictory to the mutational status of the clonotypic BcR IG, so it sparked the team's interest.

Throughout this study, we suggest the existence of a characteristic antigen-dependent mechanism for the pathogeny and the evolution of the CLL stereotyped subset #4.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	3
Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Περιεχόμενα	7
1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό.....	10
1.2. Αντιγόνα	11
2. Έμφυτη και Επίκτητη ανοσία.....	11
2.1. Έμφυτη ανοσία.....	12
2.2. Επίκτητη ανοσία.....	12
3. Χυμικές και Κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις.....	13
3.1. Χυμικές ανοσοαποκρίσεις.....	13
3.2. Κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις.....	14
4. Αντισώματα.....	15
4.1. Δομή αντισωμάτων.....	15
4.1.1. Κατηγορίες αντισωμάτων.....	16
4.1.2. Αναγνώριση και σύνδεση με το αντιγόνο.....	16
4.1.3. Γενετικοί τόποι αντισωμάτων.....	17
4.2. Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλομορφίας.....	18
4.2.1 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση	18
4.2.2. Εναλλαγή ιστύπου	19
4.2.3. Συνδυαστική ποικιλότητα και VDJ ανασυνδυασμός.....	19
5. Β λεμφοκύτταρα.....	20
5.1. Ωρίμανση και επιλογή Β λεμφοκυττάρων	20
5.2. Ενεργοποίηση Β λεμφοκυττάρων.....	22
5.3. Διαφοροποίηση Β λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια.....	23
5.3.1 Β λεμφοζιδιακά κύτταρα.....	23
5.3.2. Β κύτταρα οριακής ζώνης του σπλήνα.....	23
5.3.3. Β-1 κύτταρα.....	24
6. Σηματοδότηση μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα.....	24

7. Β λεμφώματα	25
7.1. Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.....	25
7.1.1. Συχνότητα εμφάνισης, διάγνωση και σταδιοποίηση.....	26
7.1.2. Γενετικές μεταλλάξεις.....	27
7.1.3. Προγνωστικοί δείκτες.....	27
7.1.3.1. Μεταλλάξεις στην TP53.....	28
7.1.3.2. Μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών.....	28
7.1.3.3. Πρωτεΐνες ZAP70 και CD38.....	29
7.1.3.4. Μεταλλάξεις στο NOTCH1.....	29
7.1.4. Γενετικά χαρακτηριστικά της ΧΛΛ και ανοσοφαινότυπος.....	29
7.1.5. Στερεοτυπία.....	30
7.1.6. Αντιγόνα στη ΧΛΛ.....	30
7.1.7. Αυτόνομη σηματοδότηση μέσω BκΥ στη ΧΛΛ.....	31
7.2. Στερεότυπο υποσύνολο #4 της ΧΛΛ.....	32
Αντικείμενο Μελέτης.....	33
Μεθοδολογία.....	34
1. Παραγωγή ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	34
1.1. Περιγραφή πλασμιδιακών φορέων.....	34
1.2. Ενίσχυση με PCR.....	35
1.3. Απομόνωση του DNA από τα προϊόντα της PCR.....	36
1.4. Πέψη του απομονωμένου DNA.....	37
1.5. Σύνδεση του DNA με λιγκάση.....	37
1.6. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	37
1.7. Αλληλούχηση κατά Sanger του ενθέματος των πλασμιδίων.....	40
2. Παραγωγή των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	41
2.1. Καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων.....	41
2.2. Διαμόλυνση των HEK293T.....	42
2.3. Συμπύκνωση των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	43
2.4. Ποσοτικοποίηση των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	44
3. Έλεγχος της αντιγονικής ειδικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων.....	45
3.1. Αντιδραστικότητα έναντι δίκλωνου DNA και λιποπολυσακχαριτών (LPS).....	45

3.2. Έλεγχος αντιδραστικότητας έναντι παθογόνων με ELISA	46
3.3. Κυτταρομετρία ροής.....	46
4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	47
Αποτελέσματα.....	48
1. Παραγωγή ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	48
2. Έλεγχος της αντιγονικής ειδικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων.....	50
2.1. Αντιδραστικότητα έναντι δίκλωνου DNA (anti-dsDNA).....	50
2.2. Αντιδραστικότητα έναντι λιποπολυσακχαριτών (LPS)	51
2.3. Αντιδραστικότητα έναντι παθογόνων.....	52
2.3.1. Αντιδραστικότητα έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV).....	52
2.3.2. Αντιδραστικότητα έναντι του Influenza A.....	53
2.3.3. Αντιδραστικότητα έναντι του <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	54
3. Πειράματα μελέτης αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων με χρήση της κυτταρομετρίας ροής (FACS)	57
3.1. Έλεγχος αντιδραστικότητας έναντι επιφανειακών αντιγόνων κυτταρικών σειρών.....	57
Συζήτηση.....	60
Βιβλιογραφία.....	63

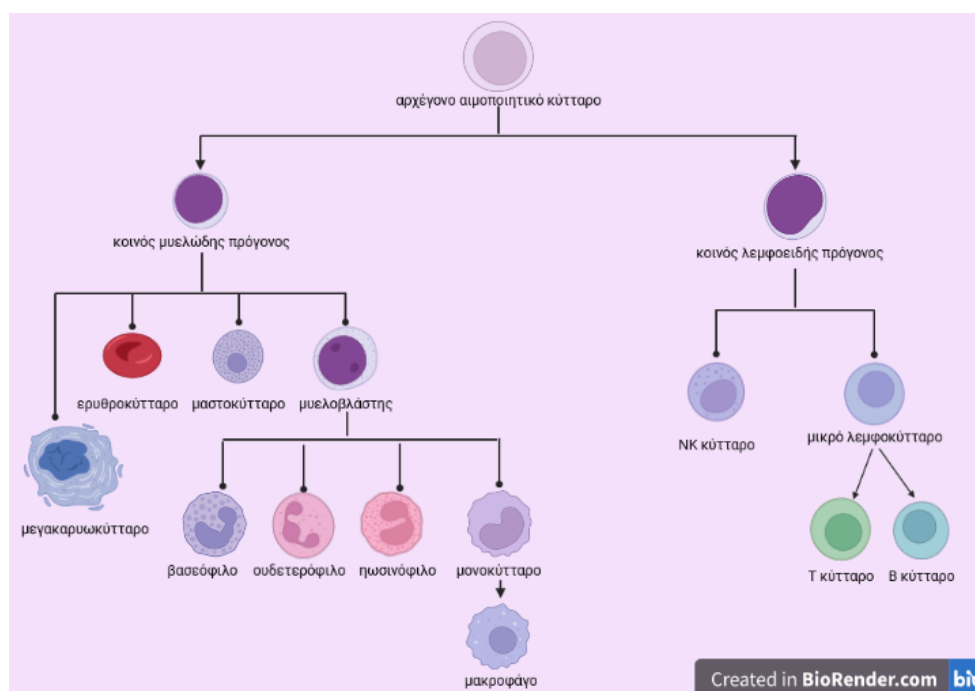
Εισαγωγή

1.1. Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η ανοσία είναι η αντίσταση ενός οργανισμού σε οποιονδήποτε λοιμώδη παράγοντα ή αντιγόνο εισέλθει σε αυτόν. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα σύστημα οργάνων, ιστών και βιολογικών μηχανισμών με τελικό στόχο την επίτευξη της ανοσίας. Επομένως, το ανοσοποιητικό δρα ως αμυντικό σύστημα του οργανισμού και στοχεύει στην παρεμπόδιση ή καταπολέμηση λοιμώξεων. Οι παθογόνοι παράγοντες διαθέτουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα. Ως αντιγόνα ορίζονται συνθετικά μόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα) τα οποία όταν αναγνωρίζονται από μια ποικιλία ανοσοκυττάρων επάγουν την ανοσοαπόκριση.^{1,2}

Οι ανοσοαποκρίσεις υπόκεινται σε δύο κατηγορίες: τις έμφυτες ή φυσικές και τις επίκτητες ή προσαρμοστικές. Η φυσική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, δεν είναι ειδική, δεν απαιτεί προηγούμενη έκθεση σε παθογόνα και επάγεται μέσω της αναγνώρισης συγκεκριμένων μοτίβων στην επιφάνεια των εισερχόμενων παθογόνων. Από την άλλη, η επίκτητη ανοσία χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση ενώ παράλληλα δημιουργεί άνοση μνήμη που προστατεύει τον οργανισμό από μελλοντική λοίμωξη από το ίδιο παθογόνο με ταχύτερη και ισχυρότερη απόκριση.^{1,2} Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από πολλά κύτταρα, ιστούς και όργανα. Τα όργανα κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες: τα πρωτογενή λεμφικά όργανα, τα οποία είναι ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών και παρέχουν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στα οποία συγκαταλέγονται οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, η σκωληκοειδής υπόφυση, οι πλάκες Peyer, οι αμυγδαλές, ο διάχυτος λεμφικός ιστός και οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων (Mucosa Associated Lymphoid Tissue, MALT).^{1,2} Όλα τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος προέρχονται από ένα και μόνο προγονικό κύτταρο που ονομάζεται αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (hematopoietic stem cell, HSC) και βρίσκεται στο μυελό των οστών, είναι πολυδύναμο και διαθέτει την ικανότητα αυτό-ανανέωσης. Η διαδικασία της αιμοποίησης οδηγεί στην παραγωγή νέων κυττάρων μέσω δύο οδών διαφοροποίησης που η καθμία οδηγεί είτε σε

λεμφοειδές προγονικό κύτταρο είτε σε μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Αν και προέρχονται από κοινή πηγή, κάθε κύτταρο ωριμάζει και μεταφέρεται σε διαφορετικά σημεία. Ο κοινός λεμφοειδής πρόγονος οδηγεί στη δημιουργία των φυσικών φονικών κυττάρων (Natural Killers cells, NK) και των λεμφοβλαστών από όπου προκύπτουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, ο κοινός μυελοειδής πρόγονος είναι υπεύθυνος για την παραγωγή των ερυθροκυττάρων, των μαστοκυττάρων, των θρομβοκυττάρων και των μυελοβλαστών από όπου προκύπτουν τα κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα) και τα μονοκύτταρα (μακροφάγα).^{1,2}



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αιμοποίησης

1.2. Αντιγόνα

Οποιαδήποτε ουσία ικανή να επάγει την ανοσοαπόκριση ενός οργανισμού αποτελεί ένα αντιγόνο (antigen). Τα αντιγόνα μπορεί να είναι διάφορα μόρια όπως λιπίδια, τοξίνες, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Συνήθως, τα αντιγόνα προέρχονται από μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα και μύκητες είτε ως εκκρινόμενα μόρια είτε ως συστατικά των μεμβρανών τους. Υπάρχουν ωστόσο αντιγόνα (αυτοαντιγόνα) και στο μικροπεριβάλλον ενός οργανισμού, συγκεκριμένα τα ίδια τα κύτταρα του αλλά και συστατικά του κυτταροπλάσματός είναι ικανά να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, η ανοσολογική αντίδραση εξαρτάται

από το μέγεθος, τη χημική σύσταση και την πολυπλοκότητα του μορίου που την προκαλεί.

Οι ανοσοαποκρίσεις κατηγοριοποιούνται σε δύο τάξεις με βάση την αλληλεπίδρασή τους με τα Τ λεμφοκύτταρα: στις θυμοεξαρτώμενες (T-Dependent, TD) και τις θυμοανεξάρτητες (T-Independent, TI). Στην πρώτη κατηγορία, τα πρωτεϊνικής φύσεως αντιγόνα είναι απαραίτητο να επεξεργαστούν από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να ενεργοποιήσουν τα Β λεμφοκύτταρα με τη βοήθεια των Τ βοηθητικών κυττάρων. Από την άλλη, μη πρωτεϊνικά αντιγόνα όπως κάποια κύρια συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. LPS), πολυσακχαρίτες, πολυμερή των D-αμινοξέων, δεξτράνες και φικόλη προκαλούν ισχυρές ανοσοαποκρίσεις χωρίς τη συμβολή των Τ βοηθητικών κυττάρων.^{1,2}

2. Έμφυτη και επίκτητη ανοσία

2.1. Έμφυτη ανοσία

Η έμφυτη ανοσία αποτελείται από μηχανισμούς άμυνας που αναπτύσσονται εναντίον μιας μόλυνσης και είναι έτοιμοι προς άμεση ενεργοποίηση. Είναι η πρώτη γραμμή άμυνας στην είσοδο ενός ξένου αντιγόνου, δε χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και δεν απαιτείται προηγούμενη έκθεση στο αντιγόνο. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που συναντώνται στις απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας είναι τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα), τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Αρχικά, το παθογόνο αλληλεπιδρά με μόρια του ξενιστή που έχουν την ικανότητα διάκρισης του εαυτού από το ξένο. Αυτού του είδους οι μοριακοί ανιχνευτές αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα δομικών προτύπων, τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα στα περισσότερα μικρόβια, ενώ απουσιάζουν από τον ίδιο τον ξενιστή. Αυτά ονομάζονται σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) και οι υποδοχείς που τα αναγνωρίζουν υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Οι πιο σημαντικοί από τους PRRs είναι οι υποδοχείς τύπου Toll και υποδοχείς τύπου Nod (Toll Like Receptors, TLRs, Nod Like Receptors, NLRs). Τα δενδριτικά και μακροφάγα κύτταρα χρησιμοποιούν τους toll-like υποδοχείς τους για την επαγωγή της άμεσης ανοσοαπάντησης. Τα κοκκιοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την αντιμετώπιση

των παρασίτων, των εξωκυτταρικών βακτηρίων και των όγκων. Με τη συσσώρευσή τους στο σημείο εισόδου έχουν τη δυνατότητα επαγωγής της φλεγμονής και διαστολής των αιμοφόρων αγγείων για τη διέλευση περισσότερων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά δρουν παρομοίως με τα ουδετερόφιλα και αφού ενδοκυτταρώσουν το παθογόνο ξεκινούν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό των δύο αυτών κυττάρων είναι η αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα με την οποία δίνουν το ερέθισμα για την ενεργοποίηση των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας.^{1,2}

2.2 Επίκτητη ανοσία

Ορισμένα παθογόνα είναι δυνατόν να διαφύγουν από τους αμυντικούς μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας. Στην περίπτωση αυτή, ενεργοποιείται η επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση ενώ παράλληλα δημιουργεί άνοση μνήμη που προστατεύει τον οργανισμό από ενδεχόμενη μελλοντική λοίμωξη από το ίδιο παθογόνο με ταχύτερη και ισχυρότερη απόκριση. Με γνώμονα αυτό, πυροδοτείται η παραγωγή μεγάλου αριθμού λεμφοκυτταρικών κλώνων με ήδη εξειδικευμένους για το αντιγόνο-στόχο, υποδοχείς. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που συμμετέχουν στην ειδική ανοσία είναι τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης αντιγόνου, το Β-κυτταρικό υποδοχέα (ΒκΥ) και τον Τ-κυτταρικό υποδοχέα (ΤκΥ), αντίστοιχα. Η σύνδεση των υποδοχέων των λεμφοκυττάρων με τα αντιγόνα ενεργοποιεί τα λεμφοκύτταρα και πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό τους και τη διαφοροποίηση σε «δραστικά» κύτταρα, τα οποία θα συντελέσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή της απειλής, διαδικασία που περιλαμβάνει και την παραγωγή κυττάρων μνήμης. Οι ειδικές ανοσοαποκρίσεις διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: στην ανοσοαπόκριση με τη μεσολάβηση κυττάρων (κυτταρική ή κυτταρομεσολαβητική ανοσία) και την ανοσοαπόκριση με τη μεσολάβηση εξειδικευμένων κυτταρικών προϊόντων (χυμική ανοσία). Στην πρώτη κατηγορία, εξειδικευμένα κύτταρα αντιδρούν απευθείας με τα αντιγόνα και τα καταστρέφουν. Στη δεύτερη κατηγορία, η ανοσοαπόκριση περιλαμβάνει την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα, τα αντισώματα. Όταν

τα αντισώματα έλθουν σε επαφή με το αντιγόνα, δεσμεύονται ειδικά σε αυτά, τα παγιδεύουν και προάγουν την καταστροφή τους.^{2,3}

3. Χυμικές και κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις

3.1. Χυμικές ανοσοαποκρίσεις

Οι χυμικές αποκρίσεις ξεκινούν όταν τα ειδικά για το αντιγόνο Β λεμφοκύτταρα του σπλήνα, των λεμφαδένων, των βλεννογόννιων λεμφικών ιστών αναγνωρίσουν τα αντιγόνα. Τα Β κύτταρα που είναι ειδικά για ένα αντιγόνο χρησιμοποιούν τα μεμβρανικά αντισώματα ως υποδοχείς για να αναγνωρίσουν το αντιγόνο στη φυσική του διαμόρφωση. Τα Β κύτταρα είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των φυσικών (μη επεξεργασμένων) αντιγόνων έτσι ώστε τα αντισώματα που θα εκκριθούν στη συνέχεια (τα οποία έχουν την ίδια ειδικότητα με τους αντιγονικούς υποδοχείς των Β κυττάρων) να μπορούν να συνδεθούν στους φυσικούς μικροοργανισμούς ή στα προϊόντα τους.^{2,4}

3.2. Κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις

Κάποιοι παθογόνοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να μολύνουν κύτταρα-στόχους και να πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία εντοπισμού τους από τα αντισώματα στην κυκλοφορία. Η άμυνα εναντίον τέτοιων μικροοργανισμών ονομάζεται κυτταρική λόγω της συμμετοχής των Τ λεμφοκυττάρων. Μέσω συνεργασίας τους με τα Β λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καταστρέφουν το περιεχόμενο των φαγοκυττάρων ή τα ενεργοποιούν για να ενδοκυτταρώσουν τα ήδη μολυσμένα κύτταρα.^{1,2}

4. Αντισώματα

4.1. Δομή αντισωμάτων

Ένα μόριο αντισώματος αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες, δύο πανομοιότυπες βαριές (heavy chains) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (light chains). Κάθε μόριο αντισώματος διαθέτει στο αμινοτελικό άκρο τη μεταβλητή περιοχή (variable region, περιοχή V) και στο καρβοξυτελικό άκρο την σταθερή περιοχή (constant region, περιοχή C), καθοριστικής σημασίας για τη δέσμευση του αντιγόνου και τη μεσολάβηση των δραστικών λειτουργιών αντίστοιχα. Οι τέσσερις αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν μια δομή Y. Πιο συγκεκριμένα, κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μια βαριά και οι βαριές μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μια μεταβλητή και μια σταθερή περιοχή ενώ κάθε βαριά αποτελείται από μια μεταβλητή και 3 ή 4 σταθερές περιοχές. Οι περιοχές αυτές αναδιπλώνονται σε μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή που ονομάζεται αντίσωμα ή αλλιώς ανοσοσφαιρίνη. Το αντίσωμα αποτελείται από δύο δομές β-πτυχωτού φύλλου που συγκρατούνται μαζί μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας και τα β-πτυχωτά φύλλα συνδέονται με προεξέχουσες θηλιές (loops). Η περιοχή του αντισώματος που συνδέεται με το αντιγόνο αποτελείται από μεταβλητές περιοχές τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας και ο πυρήνας του αντισώματος περιέχει δύο πανομοιότυπες περιοχές πρόσδεσης αντιγόνων. Κάθε μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας VH ή της ελαφριάς VL περιέχει 3 περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs). Από αυτές τις 3 περιοχές, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα συγκεντρώνεται στη CDR3, η οποία βρίσκεται στο σημείο σύνδεσης της μεταβλητής και της σταθερής περιοχής και αποτελεί το σημείο που συνεισφέρει περισσότερο στην αναγνώριση του αντιγόνου. Οι υπόλοιπες θέσεις με τη χαμηλότερη μεταβλητότητα καλούνται περιοχές πλαισίου (framework regions, FR) και είναι σχετικά συντηρημένες. Τέλος, η σταθερή περιοχή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του αντισώματος και εμπλέκεται στη διαδικασία του οψωνισμού, την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

4.1.1 Κατηγορίες αντισωμάτων

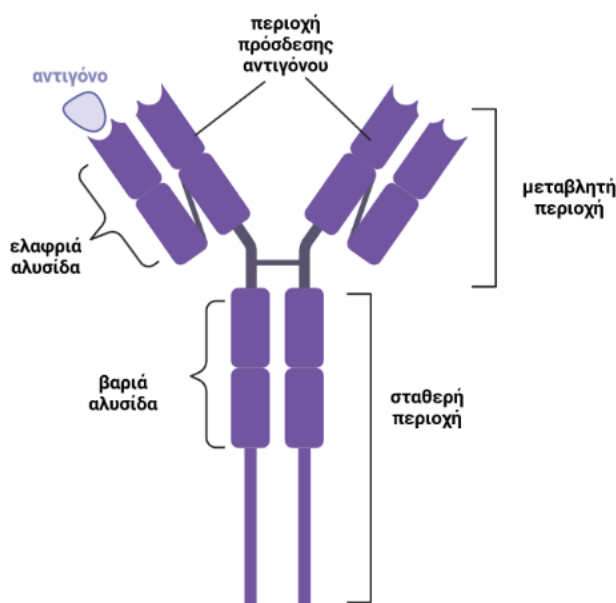
Τα αντισώματα διακρίνονται σε 5 τάξεις ή κλάσεις, καθεμία από τις οποίες έχει διαφορετική δομή και βιολογική λειτουργία. Στις ελαφριές αλυσίδες διακρίνονται μόνο δύο τύποι: οι κάππα (κ) και οι λάμβδα (λ) ελαφριές αλυσίδες, χωρίς γνωστή διαφορά στη λειτουργία μεταξύ τους. Σε κάθε αντίσωμα εκφράζεται ένας μόνο τύπος ελαφριών αλυσίδων, είτε κ είτε λ. Η τάξη του αντισώματος καθορίζεται από τον τύπο της βαριάς αλυσίδας. Έτσι, προκύπτουν τα αντισώματα τάξεων IgM, IgD, IgG, IgA και IgE που φέρουν τις βαριές αλυσίδες μ, δ, γ, α και ε, αντίστοιχα. Οι τάξεις αντισωμάτων IgG και IgA διακρίνονται περαιτέρω σε υποτάξεις: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 και IgA1, IgA2. Οι τρεις κύριες τάξεις των αντισωμάτων είναι οι IgG, IgM και IgA ενώ οι αντισώματα IgD και IgE αποτελούν μαζί λιγότερο από 1% του συνόλου των αντισωμάτων.^{2,5}

Το ανοσιακό ρεπερτόριο ξεχωρίζει λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας του καθώς υπάρχουν πολλοί κλώνοι λεμφοκυττάρων με διαφορετική ειδικότητα ίσως και 10^9 που δημιουργούνται πριν την επαφή των λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο. Καθώς δεν υπάρχουν αρκετά γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα που να επιτρέπουν την έκφραση υποδοχέων με διαφορετικά γονίδια, στόχος της ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων είναι να δημιουργηθεί ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός κυττάρων με διαφορετικούς αντιγονικούς υποδοχείς και να διατηρηθούν μόνο τα κύτταρα με χρήσιμους υποδοχείς.

4.1.2. Αναγνώριση και σύνδεση με το αντιγόνο

Τα αντισώματα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλότητα για την επιτυχημένη αναγνώριση πολυάριθμων αντιγονικών δομών και την αποτελεσματική προστασία του οργανισμού από ενδογενείς και εξωγενείς απειλές. Οι περιοχές CDRs των μορίων των αντισωμάτων που αποτελούν τις θέσεις πρόσδεσης του αντιγόνου μπορούν είτε να έρθουν κοντά και να σχηματίσουν σχισμές για πρόσδεση μικρών μορίων, είτε να δημιουργήσουν πιο μεγάλες επιφάνειες ικανές για να υποδεχθούν μεγαλύτερα μόρια. Τα τμήματα του αντιγόνου που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα ονομάζονται επίτοποι ή καθοριστές. Η αναγνώριση μπορεί να εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων τους ή από το σχήμα των επιτόπων. Η ισχύς με την οποία η επιφάνεια πρόσδεσης ενός αντισώματος συνδέεται με το αντιγόνο ονομάζεται συγγένεια (affinity). Όσο μικρότερη η σταθερά διάστασης K_d τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια. Η συνάφεια (avidity) είναι η ολική ισχύς πρόσδεσης του αντιγόνου. Αντισώματα που

παράγονται έναντι ενός αντιγόνου αλλά μπορούν να συνδέονται και με άλλα δομικά παρόμοια αντιγόνα αποτελούν τη διασταυρωτή αντίδραση (cross-reaction).^{1,2,6}



Εικόνα 2: Δομή ενός αντισώματος

4.1.3 Γενετικοί τόποι των αντισωμάτων

Οι ελαφριές και οι βαριές αλυσίδες των αντισωμάτων κωδικοποιούνται από οικογένειες γονιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι γενετικοί τους τόποι περιέχουν πολλά γονίδια για την περιοχή V (variable) και λίγα γονίδια για την περιοχή C (constant). Αναλυτικότερα ανάμεσα στις δύο αυτές περιοχές υπάρχουν και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν τις περιοχές J (joining) και D (diversity). Στον άνθρωπο τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14 ενώ τα γονίδια της ελαφριάς κ και της ελαφριάς λ στα χρωμοσώματα 2 και 22 αντίστοιχα.^{7,8} Όσον αφορά τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας (IGH), στη μεταβλητή περιοχή υπάρχουν 44 λειτουργικά IGHV γονίδια, 23 λειτουργικά IGHD γονίδια, 6 λειτουργικά γονίδια IGHJ και 11 γονίδια IGHC. Στον γενετικό τόπο της κ ελαφριάς αλυσίδας περιέχονται 31–35 λειτουργικά γονίδια IGKV, 5 λειτουργικά γονίδια IGKJ και 1 γονίδιο IGKC. Τέλος, ο γενετικός τόπος της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL) περιλαμβάνει 29-33 λειτουργικά γονίδια IGLV, γονίδια IGLJ είναι ισάριθμα με τα γονίδια IGLC. Να σημειωθεί πως οι βαριές αλυσίδες κωδικοποιούνται από τα γονίδια VDJ και C ενώ οι ελαφριές μόνο από

τα VJ και C. Κάθε γονιδιακό τμήμα αποτελείται στο 5' άκρο της από μια περιοχή που κωδικοποιεί ένα πεπτιδιο-οδηγό (leader peptide) που κατευθύνει τις νεοσυνθετιμένες βαριές και ελαφριές αλυσίδες προς το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο ανασυνδυασμός της βαριάς αλυσίδας αρχίζει με τη μεταβλητή περιοχή V όπου ένα V γονίδιο ανασυνδυάζεται με τυχαία γονίδια των D και J. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο μεταγράφεται και ενώνεται με το RNA της C σταθερής περιοχής. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις ελαφριές αλυσίδες μόνο που στην περίπτωση τους δεν υπάρχει γονίδιο D. Η ποικιλομορφία επομένως των αντισωμάτων δημιουργείται όταν διαφορετικά γονιδιακά τμήματα των περιοχών V, D, J συνδυάζονται τυχαία μεταξύ τους (συνδυαστική ποικιλομορφία).^{7,9,10}

4.2. Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλομορφίας στα αντισώματα

4.2.1 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (SYM, somatic hypermutation–SHM) περιλαμβάνει την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στις μεταβλητές περιοχές των ανασυνδυασμένων γονιδίων της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας ως συνέπεια της επαφής με το αντιγόνο με τελικό σκοπό την παραγωγή ανοσοσφαιρινών με υψηλή συγγένεια με το αντιγόνο. Η διεργασία αυτή καλείται ωρίμανση συγγένειας (affinity maturation).⁴

Η SYM λαμβάνει χώρα σε δομές των δευτερογενών λεμφικών οργάνων (σπλήνας, λεμφαδένες) που ονομάζονται βλαστικά κέντρα (germinal center, GC) όπου σημειακές μεταλλάξεις, απαλοιφές, ενθέσεις ή ακόμα και διπλασιασμοί λαμβάνουν χώρα στα ήδη αναδιαταγμένα V γονίδια. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι υπάρχουν ορισμένα σημεία–«επίκεντρα» (hotspots) για την εισαγωγή μεταλλάξεων και είναι συχνά μοτίβα τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων όπως τα RGYW, WRCY και GNW (R: πουρίνη, Y: πυριμιδίνη, W: A ή T). Κομβικής σημασίας είναι η συμμετοχή της δεαμινάσης της κυτιδίνης (activation-induced cytidine deaminase, AID) ενζύμου που μετατρέπει την κυτοσίνη σε ουρακίλη πάνω στο DNA με απαμίνωση. Μιας και η ουρακίλη δεν είναι φυσιολογικό να υπάρχει στο DNA, αυτή αναγνωρίζεται από μηχανισμούς επιδιόρθωσης, οι οποίοι θα δημιουργήσουν σημειακές μεταλλάξεις κατά την επιδιόρθωση.^{4,11,12}

4.2.2. Εναλλαγή ισοτύπου

Οι βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών υφίστανται περαιτέρω ανασυνδυασμό όπου το σύμπλοκο VDJ μπορεί να ανασυνδυαστεί με οποιοδήποτε γονίδιο C της σταθερής περιοχής. Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τα αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να εκφράζονται με διαφορετικούς ισοτύπους και κατά συνέπεια να έχουν διαφορετική λειτουργία.

Η εναλλαγή ισοτύπου είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CD40 του B λεμφοκυττάρου με το συνδέτη CD40L ενός T λεμφοκυττάρου παρουσία κυτοκινών, όπως οι IFN γ , IL-4, και TGF β . Οι κυτοκίνες ενεργοποιούν υποκινητές που βρίσκονται στο 5' άκρο κάθε αλληλουχίας εναλλαγής, οδηγώντας σε παραγωγή «στείρων» μεταγράφων (sterile transcripts, δηλαδή μεταγράφων που δε μεταφράζονται). Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων C συμβαίνει πριν από την εναλλαγή ισοτύπου. Τα μετάγραφα που παράγονται δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη αλλά φαίνεται να κατευθύνουν σε επίπεδο DNA το μηχανισμό της εναλλαγής ισοτύπου. Η δεαμινάση της κυτιδίνης (AID) παίζει κύριο ρόλο στην έναρξη και αυτής της διαδικασίας.¹¹

4.2.3. Συνδυαστική ποικιλότητα και ανασυνδυασμός V(D)J

Το ρεπερτόριο των αντισωμάτων όπως προαναφέρθηκε αναπτύσσεται με τη συνδυαστική ποικιλομορφία των γενετικών τόπων των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Η συνδυαστική ποικιλότητα διαδραματίζεται στον μυελό των οστών, στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των B λεμφοκυττάρων. Κατά την σύνθεση της βαριάς αλυσίδας ένα γονίδιο από κάθε ομάδα γονιδίων V, D, J αναδιατάσσεται με τα άλλα γονίδια και οδηγεί στην παραγωγή ενός μεταγράφου VDJ ενώ για την ελαφριά αλυσίδα αναδιατάσσονται μόνο τα γονίδια των V και J περιοχών.⁹

Η διαδικασία του ανασυνδυασμού καθορίζεται από συγκεκριμένες αλληλουχίες σηματοδότησης ανασυνδυασμού (RSS-recombinational signal sequence) που πλαισιώνουν καθένα από τα τμήματα V, D και J. Οι αλληλουχίες αυτές έχουν δύο συντηρημένα μοτίβα, ένα επταμερές 5'-CACAGTG-3' και ένα εννιαμερές μοτίβο με την αλληλουχία 5'-ACAAAACC-3' ανάμεσα σε αυτά υπάρχει μια διαστηματική αλληλουχία (space region) μήκους 12 ή 23 ζευγών. Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μόνο ανάμεσα σε τμήματα που φέρνουν την αλληλουχία RSS και

ακολουθεί τον κανόνα 12/23 δηλαδή η διαστηματική αλληλουχία ενός γονιδίου μήκους 12 ζευγών βάσεων θα συνδυαστεί με την διαστηματική αλληλουχία 23 ζευγών ενός άλλου γονιδίου. Σημαντική είναι και η διάταξη των διαστηματικών αλληλουχιών στα γονίδια για την εξασφάλιση της σωστής αναδιάταξης μεταξύ των γονιδίων. Κύριο ρόλο στη διαδικασία του ανασυνδυασμού διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες RAG1 και RAG2 (recombination activating gene) οι οποίες αναγνωρίζουν τις RSS αλληλουχίες και συνεργάζονται με άλλα ένζυμα όπως η κινάση DNA-PK για την κατάλυση του μηχανισμού. Ο ανασυνδυασμός ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο με τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων RAG1/2 όσο και σε χρωμοσωμικό επίπεδο καθώς μέσω αποκλεισμό του αλληλομόρφου εκφράζονται μόνο τα γονίδια της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας του ενός χρωμοσώματος. Τέλος, πρώτα υφίσταται ο ανασυνδυασμός της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος και μετά εκείνος της ελαφριάς αλυσίδας ,πρώτα της κ και ύστερα της λ.^{9,10}

5. Β λεμφοκύτταρα

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα της χυμικής ανοσίας και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και έκκριση αντισωμάτων για την αναγνώριση και εξουδετέρωση αντιγονικών επιτόπων στην επιφάνεια παθογόνων.

5.1. Ωρίμανση και επιλογή Β λεμφοκυττάρων

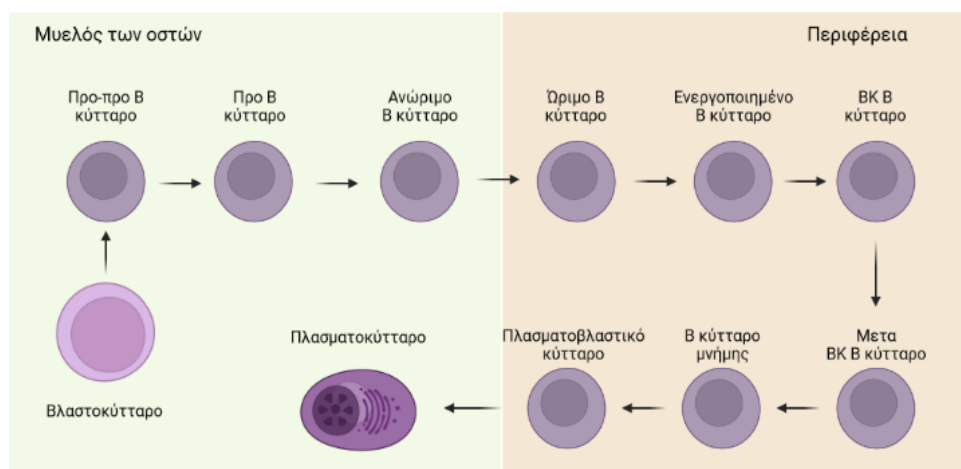
Η αναπτυξιακή πορεία των Β-κυττάρων είναι μια διαδικασία η οποία διεξάγεται στο ήπαρ (εμβρυϊκά) ή στον μυελό των οστών (μεταεμβρυϊκά) και καταλήγει στην παραγωγή ώριμων Β-κυττάρων (mature B-cells) από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι η σταδιακή εμφάνιση του Β κυτταρικού υποδοχέα, που αντικατοπτρίζει τον ανασυνδυασμό σε επίπεδο DNA των γενετικών τόπων IGH, IGK και IGL.

Τα HSCs περνούν από διάφορα στάδια διαφοροποίησης μέχρι να δεσμευθούν για τη Β-λεμφοειδή κυτταρική γενεαλογία. Ονομαστικά και με σειρά, τα HSCs αποδίδουν: πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (MultiPotent Progenitors, MPPs), λεμφοειδή πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Lymphoid-primed MultiPotent Progenitors, LMPPs), λεμφοειδή προγονικά κύτταρα με προδιάθεση για τη Β-λεμφοειδή κυτταρική σειρά (B-cell biased Lymphoid Progenitors, BLPs) και προγονικά Β-κύτταρα (progenitor B-

cells, pro-B-cells). Το μικροπεριβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται αυτά τα κύτταρα διαδραματίζει θεμέλιο ρόλο στην ανάπτυξή τους, παρέχοντας χημειοκίνες (CXCL-12), κυτοκίνες (IL-7) και διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Κατά το στάδιο του προγονικού B κυττάρου, ξεκινά να λαμβάνει χώρα η αναδιάταξη των ανοσοσφαιρινικών γονιδίων. Αρχικά, συμβαίνει μια αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων D_H και J_H της βαριάς αλυσίδας, η οποία ακολουθείται από τη σύνδεση ενός V_H τμήματος με το D_HJ_H . Στην περίπτωση που η πρώτη αναδιάταξη είναι μη παραγωγική, η αναδιάταξη $V_HD_HJ_H$ συνεχίζει στο άλλο χρωμόσωμα. Μόνο τα επιτυχώς αναδιατεταγμένα αντισώματα οδηγούν στη μετάβαση στο στάδιο των πρόδρομων B-κύτταρων (precursor B-cell, pre-B-cells). Η επιτυχής ολοκλήρωση των αναδιατάξεων οδηγεί στην εμφάνιση του B κυτταρικού υποδοχέα, με αντίσωμα μ ισοτύπου (sIgM), που χαρακτηρίζει το στάδιο του ανώριμου B-κυττάρου (immature B-cell). Τα ανώριμα κύτταρα εξέρχονται από τον μυελό των οστών στην περιφέρεια. Τέλος, η συνέκφραση υποδοχέων sIgM και sIgD στην επιφάνεια του κυττάρου αλλά και η απόκριση σε μιτογόνα όπως ο λιποπολυσακχαρίτης ορίζει το ώριμο B-κύτταρο (mature B-cell).

Η μετάβαση από αυτά τα παραπάνω στάδια συνιστά μια σειρά σημείων ελέγχου (checkpoints). Στα πρόδρομα B-κύτταρα, η ολοκληρωμένη αναδιάταξη του γενετικού τόπου IGH οδηγεί στην έκφραση της βαριάς αλυσίδας στην επιφάνεια του κυττάρου και στον σχηματισμό ενός συμπλόκου που ονομάζεται πρόδρομος B κυτταρικός υποδοχέας (pre-BCR). Αυτός αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα, την επικουρική ελαφριά αλυσίδα (Surrogate Light Chain, SLC) και από τα σηματοδοτικά μόρια Igα και Igβ. Στο σύμπλοκο αυτό ελέγχεται η ικανότητα της βαριάς αλυσίδας να ζευγαρώνει με ελαφριές αλυσίδες σχηματίζοντας λειτουργικούς υποδοχείς (πρώτο σημείο ελέγχου) αλλά και η ικανότητά της να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα (δεύτερο σημείο ελέγχου). Στο στάδιο των ανώριμων B-κυττάρων, ελέγχεται η ικανότητα του B κυτταρικού υποδοχέα να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα στο περιβάλλον του μυελού των οστών (τρίτο σημείο ελέγχου). Ανώριμα B-κύτταρα που αναγνωρίζουν ασθενώς ή καθόλου τα αυτοαντιγόνα, εξέρχονται στην περιφέρεια μέσω του αίματος ως B1 ή B2 τύπου B-κύτταρα, αντίστοιχα. Η υψηλή αυτοδραστικότητα άλλων κυττάρων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Τα ανώριμα κύτταρα της περιφέρειας μεταναστεύουν στον σπλήνα όπου υπόκεινται εκ νέου σε έλεγχο της αναγνώρισης αυτοαντιγόνων (τέταρτο σημείο ελέγχου) καθώς το περιβάλλον του μυελού των οστών και της περιφέρειας διαφέρουν.

Σε αυτό το σημείο η αναγνώριση αυτοαντιγόνων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ή ανέργια.^{2,11}



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων από το μυελό των οστών στην περιφέρεια.

5.2. Ενεργοποίηση Β-λεμφοκυττάρων

Η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των αντιγονοειδικών κυττάρων οδηγώντας τα σε κλωνική επέκταση και διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν τα αντισώματα. Παράλληλα γίνεται και η προετοιμασία τους για την αλληλεπίδραση με τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται λόγω αλληλεπίδρασής τους με αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα μεμβρανικά αντισώματα τους. Επομένως, τα αντισώματα που ενεργοποιούνται θα έχουν την ίδια αντιγονική ειδικότητα με αυτή των μεμβρανικών υποδοχέων. Από ένα πλέον ενεργοποιημένο Β λεμφοκύτταρο που εισέρχεται στον κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιάζεται προκύπτουν χιλιάδες πλασματοκύτταρα όπου καθένα παράγει και εκκρίνει με την σειρά του χιλιάδες αντισώματα ανά ώρα.^{2,11,12}

5.3. Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια

5.3.1. Β λεμφοζιδιακά κύτταρα

Τα λεμφοζιδιακά Β κύτταρα (follicular B cells, FO) έχουν φαινότυπο $slgM^{low}$ και $slgD^{high}$ και συμμετέχουν στις Τ-εξαρτώμενες χυμικές αποκρίσεις. Τα κύτταρα αυτά σε αντίθεση με τα πλασματοκύτταρα εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό στα πρωτογενή λεμφοζίδια και στην περιφέρεια όπου μετακινούνται ανάμεσα στην λέμφο και στο αίμα. Τα λεμφοζίδια ή θυλάκια είναι αρκετά κοντά σε ζώνες Τ κυττάρων επιτρέποντας

την αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων Β λεμφοζιδιακών κυττάρων με τα ενεργοποιημένα βοηθητικά Τ κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η έκκριση αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο μετά από μεταστροφή ισοτύπου. Τα Β λεμφοκύτταρα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και κύτταρα μνήμης. Κατά την Τ-εξαρτώμενη ανοσοαπόκριση τα ενεργοποιημένα Β λεμφοζιδιακά κύτταρα, στα βλαστικά κέντρα, μέσω CD40 σηματοδότησης ξεκινάει τη διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης ή της μεταστροφής ισοτύπου και, τέλος, της ωρίμανσης συγγένειας με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα ή σε Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Αν δεν ολοκληρώσουν τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο βλαστικό κέντρο τότε προκύπτουν Β λεμφοκύτταρα με χαμηλή συγγένεια για το αντιγόνο γεγονός που τα οδηγεί σε απόπτωση. Τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης ως μακροβιότερα κύτταρα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο δεν εκκρίνουν αντισώματα αλλά κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα ώστε όταν έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα για πιο άμεση ανοσολογική αντίδραση.^{11,13}

5.3.2. Β κύτταρα της οριακής ζώνης του σπλήνα (splenic marginal zone B cells)

Ο σπλήνας ως δευτερογενές λεμφικό όργανο έχει διπλό ρόλο στην υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Αναλυτικότερα, το σπληνικό παρέγχυμα χωρίζεται σε δύο διακριτές περιοχές το λευκό και τον ερυθρό πολφό. Ο λευκός πολφός είναι υπεύθυνος για την οργάνωση και το συντονισμό της πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης έναντι αντιγόνων στο αίμα. Από την άλλη, ο ερυθρός πολφός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του αίματος διηθώντας το ώστε να απομακρυνθούν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και οι διάφοροι μικροοργανισμοί. Μεταξύ των δύο πολφών εντοπίζεται η οριακή ζώνη του σπλήνα στην οποία βρίσκεται ένας ξεχωριστός πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων, τα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (MZ λεμφοκύτταρα). Αποτελούν το 5% των συνολικών Β λεμφοκυττάρων του σπλήνα και είναι σημαντικά για τις θυμοανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις. Παρουσιάζουν φαινότυπο IgM^{high}, CD21^{high}, CD1^{high}, CD9^{high} και IgD^{low}, ικανότητα αυτοανανέωσης και εντοπίζονται στις αμυγδαλές και στις πλάκες Peyer. Κύριος ρόλος τους είναι να δρουν ως γραμμή άμυνας απέναντι

σε αντιγόνα με επαναλαμβανόμενα μοτίβα, όπως οι μικροβιακοί πολυσακχαρίτες. Όπως και τα λεμφοζιδιακά, μόλις ενεργοποιηθούν διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα καθώς επίσης μπορούν να υποβληθούν τόσο σε ΣΥΜ όσο και μεταστροφή ιστύπου.^{11,12,14}

5.3.3. B-1 κύτταρα

Τα B-1 κύτταρα είναι αυτοανανεώσιμα με φαινότυπο IgM^{high}, IgD^{low}, CD5⁺ που συναντώνται στην περιτοναϊκή και την υπεζωκοτική κοιλότητα των ποντικών. Τα B-1 κύτταρα θεωρούνται ως πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον μικροβίων και παράγουν πολυαντιδραστικά ή φυσικά αντισώματα. Σπανίως συγκεντρώνουν μεταλλάξεις στα IGHV γονίδια ή αλλάζουν τον ισότυπο τους από IgM σε άλλους ιστύπους. Στον άνθρωπο, η ύπαρξη των B-1 κυττάρων είναι αμφιλεγόμενη, αν και σε πρόσφατες μελέτες χαρακτηρίστηκε ένας πληθυσμός B λεμφοκυττάρων με φαινότυπο CD20⁺, CD27⁺, CD43⁺, CD40⁺ ως τα ανθρώπινα ανάλογα B-1 κύτταρα.^{11,12,15}

6. Σηματοδότηση μέσω B κυτταρικού υποδοχέα

Η συνάθροιση των μεμβρανικών υποδοχέων (cross-linking) που επάγεται από το αντιγόνο πυροδοτεί βιοχημικά σήματα που μεταβιβάζονται από μόρια σηματοδότησης συνδεδεμένα με τον υποδοχέα. Το cross-linking συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα μόρια αντιγόνου προσδένονται σε γειτονικές μεμβρανικές Ig στην μεμβράνη των B κυττάρων. Οι υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι με το σηματοδοτικό ετεροδιμερές Igα/Igβ. Οι κυτταροπλασματικές επικράτειες του ετεροδιμερούς Igα/Igβ περιέχουν συντηρημένες αλληλουχίες ενεργοποίησης των ανοσοϋποδοχέων βασισμένων στην τυροσίνη (ITAM-immunoreceptor tyrosine activation motif). Όταν δύο ή περισσότεροι αντιγονικοί υποδοχείς συναθροιστούν, οι τυροσίνες στην ITAM περιοχή φωσφορυλιώνονται από κινάσες που συνδέονται με το B κυτταρικό υποδοχέα. Στα φωσφορυλιωμένα μοτίβα ITAM στρατολογείται και ενεργοποιείται η κινάση Syk. Η ενεργοποίηση της κινάσης Syk είναι καθοριστικής σημασίας για τη σύζευξη των αρχικών γεγονότων της διέγερσης του B κυτταρικού υποδοχέα με τα καθοδικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος καθώς στρατολογεί το μοριακό ικρίωμα BLNK. Αν και τα μοριακά ικρίωματα δεν εμφανίζουν ενζυμική ενεργότητα, δρουν

καταλυτικά στη σηματοδότηση τροποποιώντας την τοπολογία των μορίων τελεστών. Έτσι, το ικρίωμα BLNK αλληλεπιδρά και περιορίζει τις πρωτεΐνες BTK, PLCγ2, VAV και GRB2 στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.^{16,17}

7. Β λεμφώματα

Στο δυτικό κόσμο το 95% των λεμφωμάτων προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα και το υπόλοιπο ποσοστό αφορά κακοήθειες των Τ λεμφοκυττάρων. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει αναγνωρίσει και ταξινομήσει 15 είδη Β λεμφωμάτων. Μέσω αναλύσεων των λεμφωμάτων σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο έγινε η κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι Β κυτταρικοί υποδοχείς, τα μοτίβα έκφρασης διάφορων μορίων ενδιαφέροντος και οι δείκτες που αφορούσαν το στάδιο διαφοροποίησης των Β κύτταρων. Ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκε η πεποίθηση πως τα περισσότερα λεμφώματα αποτελούνταν από Β κύτταρα πριν και μετά την επεξεργασία τους στα βλαστικά κέντρα. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε πως σε αρκετά από τα Β λεμφώματα υπάρχει ένδειξη αντιγονικής επιλογής όπως στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία καθώς και ενδείξεις για τη σημασία του ίδιου του μικροπεριβάλλοντος στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών Β λεμφοκυττάρων.^{18,19}

7.1 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ)

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στο δυτικό κόσμο. Προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους και περισσότερο άνδρες (αναλογία ανδρών:γυναικών 2:1). Διακρίνεται από κλωνικό πολλαπλασιασμό και σταδιακή συσσώρευση νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών, στα περιφερειακά λεμφικά όργανα και στο σπλήνα. Η κλινική πορεία της ΧΛΛ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια: μερικοί ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία, ενώ άλλοι έχουν επιθετική νόσο και μικρή επιβίωση. Η κλινική ετερογένεια είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια που παρατηρείται σε γενετικό και φαινοτυπικό επίπεδο.²⁰⁻²³

7.1.1. Διάγνωση και Σταδιοποίηση

Η διάγνωση της ΧΛΛ τίθεται όταν τα επίπεδα των μονοκλωνικών Β λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα κυμαίνονται στα $\geq 5000/\mu\text{l}$ με συγκεκριμένους χαρακτηριστικούς μορφολογικούς και ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες (μονοκλωνικότητα της ελαφριάς αλυσίδας, συνέκφραση των δεικτών CD5 και CD19 με το δείκτη CD23, χαμηλά επίπεδα μεμβρανικών αντισωμάτων και χαμηλά επίπεδα έκφρασης ή απουσία των δεικτών CD79b και CD20). Για τη σταδιοποίηση της νόσου χρησιμοποιούνται δύο συστήματα, το Rai και το Binet. Τα συστήματα ταξινόμησης βασίζονται στη φυσική εξέταση, από την οποία καθορίζεται η παρουσία ή όχι ηπατοσπληνομεγαλίας και περιφερικής λεμφαδενοπάθειας και σε ορισμένες αιματολογικές εξετάσεις ρουτίνας που αναδεικνύουν την ύπαρξη ή όχι λεμφοκυττάρωσης, αναιμίας και θρομβοπενίας. Με βάση το σύστημα Rai οι ασθενείς με ήπια επίπεδα της ασθένειας καθορίζονται από με λεμφοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό των οστών (πρώην επίπεδο 0).^{23,24} Όταν οι ασθενείς παρουσιάζουν διογκωμένους λεμφαδένες, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία χαρακτηρίζονται ως μεσαίο επίπεδο κινδύνου (πρώην επίπεδο I ή II). Τέλος, το υψηλότερο επίπεδο κινδύνου χαρακτηρίζει ασθενείς με αναιμία που προκλήθηκε από την ασθένεια και θρομβοκυτταροπενία (πρώην επίπεδο IV). Το σύστημα Binet ταξινομεί τους ασθενείς σύμφωνα με τα σημεία του σώματος που εμπλέκονται στην ασθένεια και εμφανίζουν οργανομεγαλία, λεμφοκυττάρωση, αναιμία ή θρομβοκυτταροπενία. Τα εξεταζόμενα σημεία ενδιαφέροντος είναι το κεφάλι, ο λαιμός, η μασχάλη, ο σπλήνας, το ήπαρ και η βουβωνική χώρα. Το πρώτο στάδιο, στάδιο A, αφορά την εμπλοκή δύο από των παραπάνω περιοχών και τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης ξεπερνούν τα 10g/dL. Στη συνέχεια, στο στάδιο B κατατάσσονται ασθενείς με εμφανή οργανομεγαλία και τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης ξεπερνούν και πάλι τα 10g/dL. Τέλος, το στάδιο C περιγράφει ασθενείς με περισσότερες από τρεις προαναφερθείσες διογκωμένες περιοχές, ενώ η αιμοσφαιρίνη είναι χαμηλότερη από 10g/dL. Λόγω των εξελίξεων στη μελέτη της ΧΛΛ τα τελευταία χρόνια, τα δύο συστήματα έχουν κριθεί ανεπαρκή για την τωρινή ταξινόμηση των ασθενών με ΧΛΛ. Ως συνέπεια, ο πιο ικανός δείκτης για την προγνωστική εξέλιξη της ασθένειας είναι ο CLL-IPI (CLL International prognostic index). Για την περιγραφή της κατάστασης του ασθενούς χρησιμοποιούνται πέντε προγνωστικοί δείκτες στους οποίους συγκαταλέγονται: οι μεταλλάξεις στο γονίδιο

TP53, το φορτίο μεταλλάξεων στο γονίδιο της βαριάς αλυσίδας, η συγκέντρωση της β₂-μικροσφαιρίνης, η κλινική κατάσταση και η ηλικία του ασθενούς.^{21,23,25}

7.1.2. Γενετικές μεταλλάξεις

Η αλληλούχηση κατέστησε δυνατή την ανίχνευση ενός φάσματος γενετικών ανωμαλιών που σχετίζονται με την οντογένεση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας. Ειδικότερα σε επίπεδο χρωμοσώματος έχουν βρεθεί απαλοιφές στα χρωμοσώματα 6q, 11q, 13q και 17q καθώς και τρισωμία στο χρωμόσωμα 12. Παράλληλα σε γονιδιακό επίπεδο, μελέτες με τη χρήση της αλληλούχησης όλων των εξωνίων του γονιδιώματος έδειξαν ακόμα 44 μεταλλαγμένα γονίδια. Σε αυτά περιλαμβάνονται ενδεικτικά τα γονίδια NOTCH1, MYD88, TP53, ATM και SF3B1.^{23,26,27} Αυτά τα γονίδια φαίνεται ότι συμμετέχουν σε μονοπάτια επεξεργασίας του RNA, μονοπάτια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθώς και μονοπάτια επαγωγής της φλεγμονώδους αντίδρασης.

7.1.3. Προγνωστικοί δείκτες

Παρόλο που η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος σχετικά με την ανίχνευση βιοδεικτών για την αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου. Στον πίνακα παρουσιάζονται κάποιοι από τους βασικότερους βιοδείκτες που είναι γνωστοί μέχρι σήμερα. Παρακάτω θα επεξηγηθούν μερικοί από τους αυτούς.^{26,28}

Πίνακας 1: Βασικότεροι βιοδείκτες στη ΧΛΛ

Κατηγορία	Βιοδείκτες
Χαρακτηριστικά ασθενή	Ηλικία, Φύλο, Εθνικότητα
Δείκτες ασθένειας	Σπληνομεγαλία, Αριθμός λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, αναιμία
Έκφραση πρωτεϊνών	CD38, ZAP70, CD49d/VLA-4, β2M
Γενετικοί παράγοντες	del17p, μεταλλάξεις στην TP53, del11q, del13q, trisomy 12, μεταλλάξεις στο NOTCH1, πρότυπο μεθυλίωσης του DNA
Ανοσογενετική	Φορτίο μεταλλάξεων IGHV και δομή του BκY

7.1.3.1. Μεταλλάξεις στην TP53

Το γονίδιο TP53 βρίσκεται στη θέση 17p13.1 του χρωμοσώματος 17, κωδικοποιεί την p53, μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που σε περίπτωση δυσλειτουργίας εμπλέκεται στην ογκογένεση. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στο 8% των ασθενών με ΧΛΛ που δεν ακολουθούν κάποιο θεραπευτικό σχήμα και στο 21% των ασθενών υπό θεραπεία. Μπορεί να είναι είτε σημειακή και να οδηγεί σε αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης, είτε σε αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος, είτε σε αλλαγή που αφορά τη διαδικασία του ματίσματος. Συχνά, οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην καταστροφή της λειτουργικότητας της TP53 και της ογκοκατασταλτικής της δράσης, επομένως έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση της νόσου.²⁹

7.1.3.2. Φορτίο μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV

Από τις αρχές του 2000 έγινε εμφανές ότι το προκαλούμενο από σωματική υπερμεταλλαξιγένεση φορτίο των μεταλλάξεων του γονιδίου IGHV έχει προγνωστική ισχύ. Το φορτίο των μεταλλάξεων χωρίζει τους ασθενείς σε περιπτώσεις χαμηλού (αμετάλλακτη ΧΛΛ) και υψηλού (μεταλλαγμένη ΧΛΛ) φορτίου συγκρίνοντας την αλληλουχία του IGHV γονιδίου της παραγωγικής αναδιάταξης του λευχαιμικού κλώνου με το αντίστοιχο γονίδιο της βλαστικής σειράς (όριο ομοιότητας 98%). Η αμετάλλακτη ΧΛΛ, η οποία εμφανίζεται στο 40% των ασθενών, χαρακτηρίζεται από μικρότερη συνολική επιβίωση και δυσμενή ανταπόκριση σε χημειοθεραπευτικά σχήματα σε σχέση με τους ασθενείς με μεταλλαγμένη ΧΛΛ. Η κλινική αυτή ετερογένεια φαίνεται να σχετίζεται με τη βιολογία του Β-κυττάρου καθώς η μεταλλαγμένη ΧΛΛ προκύπτει από κύτταρα που έχουν περάσει από το βλαστικό κέντρο, με αποτέλεσμα να συσσωρεύσουν μεταλλαγές κάτι που δεν ισχύει για την αμετάλλακτη ΧΛΛ. Παρόλα αυτά, η ταξινόμηση των ασθενών με βάση το φορτίο των μεταλλάξεων δεν είναι απόλυτη, καθώς υπάρχουν μεταλλαγμένες ΧΛΛ περιπτώσεις που μπορεί να παρουσιάσουν πρόοδο νόσου, ανάγκη θεραπείας ή και ανθεκτικότητα στη θεραπεία και τελικά να καταλήξουν από το νόσημα³⁰⁻³²

7.1.3.3. Πρωτεΐνες CD38 και ZAP70

Ο δείκτης CD38 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που μέσω της σύνδεσής της με τον προσδέτη της (CD31) συμμετέχει σε μονοπάτια υπεύθυνα για την κυτταρική προσκόλληση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στη ΧΛΛ, οι CD38 θετικές περιπτώσεις έχουν ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρότερη συνολική επιβίωση.^{33,34}

Η ZAP70 είναι κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση σημάτων από τον T κυτταρικό υποδοχέα. Σε πολλές περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ, η ZAP70 έχει εντοπιστεί αυξημένη στην επιφάνεια καρκινικών Β λεμφοκυττάρων όπου τα περισσότερα εκφράζουν BκΥ με αμετάλλακτες βαριές αλυσίδες. Τα αυξημένα επίπεδά της (>20%) σχετίζονται με επιθετικότερη νόσο και μικρότερη επιβίωση.^{33,34}

7.1.3.4. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του NOTCH1

Σε ποσοστό περίπου 10% των ασθενών με ΧΛΛ φαίνεται πως εντοπίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο του NOTCH1 επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό την λειτουργικότητά του. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα και με την ενεργοποίησή του, η ενδοκυτταρική περιοχή του αποκόπτεται, ενσωματώνεται στον πυρήνα και μέσω αλληλεπίδρασής της με δευτερεύοντες τελεστές επάγει τη μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για αυξητικούς παράγοντες. Στα καρκινικά κύτταρα της ΧΛΛ υπερεκφράζεται και προωθεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους.²⁶⁻²⁸

7.1.4. Γενετικά χαρακτηριστικά της ΧΛΛ και Ανοσοφαινότυπος

Είναι δεδομένο πως η εμφάνιση της ασθένειας έχει σποραδικό χαρακτήρα, ωστόσο υπάρχουν αναφορές πως συγγενικά πρόσωπα ασθενών με ΧΛΛ έχουν αυξημένο ρίσκο εμφάνισης της ασθένειας και άλλων non-Hodgkin λεμφωμάτων. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες και γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί τα τελευταία χρόνια, οι οποίες ευθύνονται για την ανεξέλεγκτη λειτουργία των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων.

7.1.5. Στερεοτυπία

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου αποτελεί η παρουσία πανομοιότυπων ή σχεδόν όμοιων (quasi-identical) κλωνοτυπικών Β κυτταρικών υποδοχέων σε διαφορετικούς ασθενείς με ΧΛΛ. Ο όρος που εδραιώθηκε από το πεδίο

για την περιγραφή αυτού του φαινομένου είναι η «στερεοτυπία». Η ανάλυση της στερεοτυπίας εξελίσσεται τα τελευταία 20 χρόνια ανιχνεύοντας υποσύνολα (subsets) ασθενών με στερεότυπους υποδοχείς. Είναι αντιφατικό το γεγονός ότι ενώ ο αριθμός των δυνητικών B κυτταρικών υποδοχέων υπολογίζεται σε 1×10^{12} , το ποσοστό των ασθενών με ΧΛΛ που παρουσιάζουν όμοιους υποδοχείς στους λευχαιμικούς τους κλώνους ανέρχεται στο 41%. Η έρευνα ομαδοποίησης των υποδοχέων σε υποσύνολα ξεκίνησε με κριτήρια τα οποία αφορούσαν τη χρήση συγκεκριμένων V-D-J συνδυασμών και την ομοιότητα της HCDR3 περιοχής όμως σήμερα η ταυτοποίηση των υποσυνόλων πραγματοποιείται αλγοριθμικά χρησιμοποιώντας μοτίβα των HCDR3 περιοχών. Η χρήση του αλγορίθμου TEIRESIAS³⁵ μπορεί έτσι να αναδείξει την “κρυμμένη” ομοιότητα μεταξύ των HCDR3 περιοχών. Η σημασία της στερεοτυπίας και η αιτία όλων αυτών των προσπαθειών εκπορεύεται από τη συσχέτιση των υποσυνόλων με την κλινική πορεία της ασθένειας. Οι κλινικοί ιατροί, πλέον, μπορούν κατατάξουν τους ασθενείς τους σε 19 κύρια υποσύνολα (major subsets)³⁵ χρησιμοποιώντας την ανοιχτή διαδικτυακή εφαρμογή ARResT/AssignSubsets αντλώντας σημαντικές πληροφορίες για την “εξατομικευμένη” αντιμετώπιση της ασθένειας.³⁶⁻⁴¹

7.1.6. Αντιγόνα στη ΧΛΛ

Με την ανίχνευση των πρώτων δεδομένων που υποστήριζαν τον περιορισμό του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών των ασθενών με ΧΛΛ, τέθηκε το θέμα της “επιλογής” από αντιγόνο. Η θεωρία της επιλογής από το αντιγόνο επιπλέον ενισχύθηκε από τον προσδιορισμό των στερεότυπων υποσυνόλων τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν εξαρτώμενα από υποσύνολο πρότυπα σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης, μιας διαδικασίας που εξαρτάται από το αντιγόνο. Ένα πλήθος αυτοαντιγόνων, μικροβιακών/ικών αντιγόνων και επιτόπων προκαλούμενων από οξειδωση (νεοεπιτόπων, neoepitopes) αναγνωρίζεται από αυτά τα αντισώματα.^{42,43} Η απόπτωση διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην έκθεση αυτοαντιγόνων ή νεοεπιτόπων στην επιφάνεια των κυττάρων. Φαίνεται ότι τα κλωνοτυπικά αντισώματα ασθενών με ΧΛΛ μοιάζουν, όσον αφορά τη λειτουργία τους, με φυσικά αντισώματα, αναλαμβάνοντας έτσι έναν ενδιάμεσο ρόλο μεταξύ έμφυτης και επίκτητης ανοσίας. Τα κλωνοτυπικά αντισώματα πολλές φορές είναι πολυδραστικά με αποκορύφωμα τα

αντισώματα του υποσυνόλου #8 που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αυτοδραστικότητα. Πιθανολογείται ότι αυξημένη αυτοδραστικότητα, ακόμη και μεταξύ κλινικά επιθετικών υποσυνόλων, συμβάλλει σε ένα παθογενετικό μηχανισμό που οδηγεί σε σύνδρομο Richter.^{23,44-46}

7.1.7. Αυτόνομη σηματοδότηση στη ΧΛΛ

Μια σχετικά πρόσφατη και ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ανακάλυψη σχετικά με τη βιολογία της ΧΛΛ είναι ότι τα λευχαιμικά κύτταρα σηματοδοτούνται αυτόνομα, δηλαδή χωρίς τη μεσολάβηση αντιγόνου (antigen-independent cell-autonomous signaling). Για την ακρίβεια, η σηματοδότηση οφείλεται σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα σε δυο ίδιους Β κυτταρικούς υποδοχείς, μεταξύ του παρατόπου του ενός υποδοχέα και ενός εσωτερικού επιτόπου του άλλου. Η αυτόνομη σηματοδότηση δεν παρατηρείται σε φυσιολογικές καταστάσεις ούτε σε άλλες νεοπλασίες των Β κυττάρων (πολλαπλό μυέλωμα, λέμφωμα οριακής ζώνης, λέμφωμα μανδύα, οζώδες λέμφωμα). Το γεγονός αυτό υπαινίσσεται έναν παθογενετικό μηχανισμό που περιγράφει πρακτικώς όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ ανεξαρτήτως στερεοτυπίας, φορτίου μεταλλάξεων και πολυδραστικότητας και ο οποίος θα μπορούσε να στοχευθεί θεραπευτικά. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες, οι ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι ίδιες σε κάθε περίπτωση και πολλές φορές εξαρτώνται από τις διαδικασίες της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης και της εναλλαγής ισοτύπου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε περιπτώσεις ασθενών με ήπια ΧΛΛ, οι ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις είναι υψηλής συγγένειας, σε αντίθεση με περιπτώσεις επιθετικής ΧΛΛ, όπου οι ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις είναι χαμηλής συγγένειας. Έτσι, η ετερογένεια της ΧΛΛ σε κλινικοβιολογικό επίπεδο μπορεί να συσχετιστεί με την ετερογένεια των Β κυτταρικών υποδοχέων σε μοριακό επίπεδο. Η σημασία της αυτόνομης σηματοδότησης στην πρόγνωση και θεραπεία μόλις έχει αρχίσει να γίνεται αντιληπτή. Το κακής πρόγνωσης υποσύνολο #2 (IGHV3-21, IGLV3-21) φέρει μια μετάλλαξη στην ελαφριά αλυσίδα, IGLV3-21^{R110}. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε αυτόνομη σηματοδότηση και κακή πρόγνωση ακόμα και σε συνδυασμό με άλλες βαριές αλυσίδες.⁴⁷

7.2 Στερεότυπο Υποσύνολο #4

Το στερεότυπο υποσύνολο #4 αποτελείται από καρκινικά Β λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν Β κυτταρικούς υποδοχείς με IGHV4-34 και IGKV2-30, εκπροσωπεί ~1% της ΧΛΛ και είναι το πολυπληθέστερο μεταξύ των υποσυνόλων της μεταλλαγμένης ΧΛΛ. Παρουσιάζει συχνά del(13)(q14)⁴⁸⁻⁵⁰, που συσχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση⁵¹. Δε χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες (recurrent) μεταλλάξεις γονιδίων, τουλάχιστον όσον αφορά τα πιο συχνά μεταλλάσσόμενα γονίδια στη ΧΛΛ (NOTCH1, SF3B1 and TP53).³⁰ Ωστόσο, από ανοσογενετική σκοπιά το υποσύνολο #4 παρουσιάζει αξιοσημείωτες ιδιαιτερότητες. Συγκεκριμένα, οι κλωνοτυπικοί ΒκΥ: (i) παρουσιάζουν πάντοτε εναλλαγή ισotyπου (IgG-switched)⁵², φαινόμενο σπάνιο στη ΧΛΛ (5-8%), (ii) προκύπτουν από βαριές αλυσίδες με γονίδιο IGHV4-34 και ελαφριές αλυσίδες με γονίδιο IGKV2-30, σπάνιος συνδυασμός στο ρεπερτόριο των φυσιολογικών ώριμων Β λεμφοκυττάρων, και χαρακτηρίζονται από μακριά VH CDR3, πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα⁵³ που παραπέμπει σε αντισώματα με αντι-DNA ειδικότητα⁵⁴, (iii) παρουσιάζουν πρότυπα σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης που προσομοιάζουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης της αυτοαντιδραστικότητας (editing), π.χ. εισαγωγή αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων^{55,56}, και (iv) χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ενδοκλωνική ετερογένεια στα πλαίσια συνεχιζόμενης σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης^{36,57-59} παραπέμποντας σε παρατεταμένη αλληλεπίδραση με αντιγόνο(-α).

Αντικείμενο Μελέτης

Βασιζόμενοι σε αδημοσίευτη μελέτη της ομάδας του εργαστηρίου με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) βρέθηκε η ύπαρξη αμετάλλακτων υποκλώνων στο στερεότυπο υποσύνολο #4 της ΧΛΛ. Αυτή η ανακάλυψη έρχεται σε αντίθεση με τη μεταλλαγμένη φύση του υποσυνόλου γεγονός που προκάλεσε το ενδιαφέρον της ομάδας. Στόχος, της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήταν η μελέτη και η σύγκριση της αντιγονικής αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων του υποσυνόλου #4 που βρέθηκαν σε υποκλωνικό και κλωνικό επίπεδο αντίστοιχα. Για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και για τις μελέτες του ελέγχου της αντιδραστικότητας έγιναν πειράματα ELISA και κυτταρομετρίας ροής.

Μεθοδολογία

Για τη μελέτη των αμετάλλακτων υποκλώνων σχεδιάστηκαν πλασμίδια που έφεραν τις 100% αμετάλλακτες αλληλουχίες των γονιδίων IGHV4-34/IGHD5-18/IGHJ6 και IGKV2-30/IGKJ2 ασθενών του στερεότυπου υποσυνόλου #4. Οι αλληλουχίες αυτές αφού σχεδιάστηκαν, παράχθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pUCIDT^{amp} και στη συνέχεια, υποκλωνοποιήθηκαν σε νέους πλασμιδιακούς φορείς (ειδικούς για την παραγωγή των αντισωμάτων). Από την άλλη, η ενίσχυση του κύριου μεταλλαγμένου κλώνου έγινε με PCR χρησιμοποιώντας cDNA ως αρχικό υλικό. Πληροφορίες σχετικά με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε βρίσκονται παρακάτω.

1. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων

1.1. Περιγραφή των πλασμιδιακών φορέων

Τα πλασμίδια που προαναφέρθηκαν είχαν ανοδικά έναν ισχυρό υποκινητή, του κυτταρομεγαλοϊού του ανθρώπου (Human Cytomegalovirus, HCMV), ώστε να εξασφαλισθεί η μεταγραφή του γονιδίου ενδιαφέροντος. Όσον αφορά τη δυνατότητα του φορέα για ανεξάρτητη από τον ξενιστή αντιγραφή, τα πλασμίδια έφεραν ενσωματωμένες στο γονιδίωμά τους τις περιοχές έναρξης της αντιγραφής pUCori, SV40 ori και F1 ori. Τέλος, τα πλασμίδια έφεραν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

αντιδραστήρια, οι ποσότητες και οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR.^{62,63}

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και όγκοι για την αντίδραση ενίσχυσης των IGHV-IGHD-IGHJ, IGKV-IGKJ και IGLV-IGLJ αναδιατάξεων

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

Πίνακας 3: Συνθήκες της αντίδρασης ενίσχυσης των IGHV-IGHD-IGHJ, IGKV-IGKJ και IGLV-IGLJ αναδιατάξεων

Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή	
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 5'
Αποδιάταξη	94°C για 30''
Υβριδισμός	58°C για 30''
Επιμήκυνση	72°C για 1'
Τελική Επιμήκυνση	72°C για 5'
Αποθήκευση	4°C, ∞

1.3. Απομόνωση του DNA από τα PCR προϊόντα

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, το DNA κόπηκε από το gel αγαρόζης και τοποθετήθηκε σε Eppendorf tubes. Η απομόνωση των προϊόντων PCR έγινε με το Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, NEB) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- Προσθήκη Dissolving Buffer σε όγκο τέσσερις φορές μεγαλύτερο του βάρους του απομονωμένου gel
- Επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία 37-55°C για 5-10' μέχρι να διαλυθεί πλήρως το gel. Περιοδική ανακίνηση με Vortex.
- Μεταφορά του δείγματος σε στήλη απομόνωσης
- Φυγοκέντρηση σε 16.000xg για 1' για τη δέσμευση του DNA στη στήλη και την ταυτόχρονη απομάκρυνση του υπόλοιπου μείγματος με απόρριψη αφού περάσει στο δοχείο συλλογής
- Προσθήκη 200μl DNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 1', απόρριψη του διηθήματος και επανάληψη του βήματος

- Φυγοκέντρηση χωρίς την προσθήκη διαλύματος για την απόρριψη υπολειμμάτων
- Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο erpendorf και προσθήκη 30μl νερού ελεύθερου νουκλεασών
- Επώαση για 1' και έκλουση του DNA με φυγοκέντρηση σε 16.000xg για 1'

1.4. Πέψη του απομονωμένου DNA

Η πέψη του απομονωμένου DNA από τα προϊόντα της PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και Sall για την IgG βαριά αλυσίδα, τα AgeI και AfeI για την IgM βαριά αλυσίδα, τα AgeI, BsiWI για την κ ελαφριά και τα AgeI και XhoI για την λ ελαφριά αλυσίδα. Τα ίδια ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των αντίστοιχων φορέων. Χρησιμοποιήθηκαν 10 έως 20 μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας κάθε ενζύμου και 0,1 έως 2μg DNA. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1,5-3 ώρες. Η αντίδραση της πέψης τερματίστηκε με την προσθήκη ειδικής χρωστικής για την απενεργοποίηση των ενζύμων και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης με σκοπό τον επικείμενο καθαρισμό τους.

1.5. Σύνδεση του DNA με λιγάση

Η σύνδεση του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης μαζί με το DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός ενζύμου που σχηματίζει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, της T4 DNA λιγκάσης (New England Biolabs, NEB). Η αντίδραση περιείχε το ρυθμιστικό διάλυμα της T4 DNA λιγκάσης σε τελική συγκέντρωση 1x, 100-200ng του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης που έχει κοπεί με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, 10 μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας λιγκάσης ποσότητα DNA προς ένθεση τέτοια ώστε να επιτυγχάνεται 1:5 αναλογία πλασμιδιακού φορέα προς το ένθεμα και νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικό όγκο 10μl. Τέλος, ακολούθησε επώαση στους 16°C για 12-16 ώρες.⁶²

1.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του βακτηρίου *E.Coli* Top10, τα οποία είχαν υποστεί κατάλληλη χημική επεξεργασία με CaCl₂ ώστε να καταστούν

δεκτικά σε εισαγωγή ξένου DNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:⁶²

- Ανάμειξη 50μl από τα βακτήρια με 5μl από τα προϊόντα της λυγκάσης
- Επάωση του μείγματος για 20-30' στον πάγο
- Θερμικό σοκ στους 42°C για 30-40''
- Επαναφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5'
- Επίστρωση όλης της ποσότητας σε τρυβλία με άγαρ παρουσία αμπικιλίνης για ολονύχτια επάωση στους 37°C

Για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος στους πλασμιδιακούς φορείς, οι βακτηριακές αποικίες ελέγχθηκαν με PCR. Χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 5' Absense που υβριδίζεται ανοδικά του ενθέματος και οι καθοδικοί εκκινητές 3' CmCH1, 3' IgGinternal και 3' Ck494 για τους πλασμιδιακούς φορείς IgMu και rlgKappa. Παρακάτω στους πίνακες 4 και 5 βρίσκονται οι αλληλουχίες των εκκινητών με προσανατολισμό 5'-3' και οι συνθήκες της PCR.

Πίνακας 4: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Εκκινητές	Αλληλουχίες
5' Absense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC
3' CmCH1	GGGAATTCTCACAGGAGACGA
3' Ck494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
3' Cλ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGC

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια της PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
RB 10x	2
MgCl ₂	1
dNTPmix	1
Forward primer (5' Absence)	1
Reverse primer (3' Ck493/ CmCH1)	1
H ₂ O	14
Taq	0.2
Total volume	20

Πίνακας 6: Συνθήκες της PCR

Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή	
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 5'

Αποδιάταξη	94°C για 30''
Υβριδισμός	58°C για 30''
Επιμήκυνση	72°C για 1'
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10'
Αποθήκευση	4°C, ∞

Οι αποικίες με τα προϊόντα PCR του αναμενόμενου μεγέθους (650 bp για τη βαριά αλυσίδα γ1 και μ, 700 bp για την ελαφριά αλυσίδα κ) επιλέχθηκαν και ενισχύθηκαν σε καλλιέργειες βακτηρίων των 100mL (Lennox LB BrothBase- Invitrogen), παρουσία 100μg/ml αμπικιλίνης (Sigma). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37°C. Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit της ZymoResearch σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- Φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας για 10' σε 4000 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη 8mL του διαλύματος P1 (resuspension buffer) και επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος
- Προσθήκη 8mL του διαλύματος P2 (lysis buffer), ομαλή ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3'
- Προσθήκη 8mL του διαλύματος P3 (neutralizing buffer) και ανάδευση μέχρι ομογενοποίησης του μείγματος
- Τοποθέτηση του φίλτρου-σύριγγας, φόρτωση του μείγματος λύσης και επώαση για 5-8'
- Τοποθέτηση ενός εμβόλου και πίεση του διαλύματος μέσω του φίλτρου σε καθαρό falcon των 50mL μέχρι την απόκτηση περίπου 20mL ενός διαυγές διαλύματος
- Προσθήκη 8mL του διαλύματος binding buffer και ανάδευση για την ενίσχυση της συγγένειας του DNA με τη νέα στήλη
- Προσθήκη σε νέο falcon των 50mL μιας δεύτερης στήλης στην οποία προστίθενται διαδοχικά 10mL του προϊόντος λύσης και φυγοκεντρώνται για 2' σε 500g με απόρριψη του διηθήματος
- Προσθήκη 5mL ZymoPURE™ Wash 1, φυγοκέντρηση για 2' σε 500g και απόρριψη του διηθήματος
- Προσθήκη 5mL ZymoPURE™ Wash 2, φυγοκέντρηση για 2' σε 500g και απόρριψη του διηθήματος
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- Τοποθέτηση της στήλης σε erpendorf των 2mL και φυγοκέντρηση για 1' σε 16000g
- Μεταφορά της στήλης σε νέο erpendorf των 1,5mL

- Προσθήκη 200μl elution buffer ή H₂O ελεύθερο νουκλεασών και φυγοκέντρηση μετά από επώαση 1' στις ίδιες συνθήκες

1.7. Αλληλούχηση κατά Sanger του ενθέματος των πλασμιδίων

Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιείται με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων τόσο για την αντίδραση του τερματισμού αλυσίδας όσο και για την αντίδραση του καθαρισμού τους. Το αντιδραστήριο BigDye™ Terminator v3.1 ReadyReaction Mix που χρησιμοποιείται για την αντίδραση τερματισμού αλυσίδας περιέχει dNTPs, ddNTPs με φθορίζουσα χρωστική, DNA πολυμεράση, MgCl₂ και απαραίτητα άλατα. Το αντιδραστήριο BigDyeXTerminator™ Solution περιέχει σφαιρίδια που απομακρύνει άλατα και φθορίζοντα νουκλεοτίδια που δεν έχουν ενσωματωθεί κατά την επιμήκυνση των αλυσίδων. Η συγκέντρωση των πλασμιδίων προς αλληλούχηση ήταν 250ng. Τα αντιδραστήρια, οι όγκοι τους και οι συνθήκες της αντίδρασης αλληλούχησης αναφέρονται αναλυτικά στους Πίνακες 7 και 8 παρακάτω.⁶³

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και όγκοι για την αλληλούχηση κατά Sanger

Αντιδραστήρια	Όγκος
BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction mix	0,5
BigDye Terminator v1.1 & V3.1 5x Sequencing Buffer	1,7
Εκκινητής	0,32
H ₂ O	
Δείγμα	
Συνολικός όγκος	10

Πίνακας 8: Συνθήκες για την αλληλούχηση κατά Sanger

Παράμετροι	Στάδιο/Βήμα				
	25 κύκλοι				
	Επώαση	Αποδιάταξη	Υβριδισμός εκκινητών	Επιμήκυνση	Αποθήκευση
Ramp rate	1°C / δευτερόλεπτο				
Θερμοκρασία	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Χρόνος	01:00	00:10	00:05	04:00	∞

Μετά την αντίδραση της PCR ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων με την διαδικασία που αναγράφεται παρακάτω:

- Προσθήκη 30μl 100% αιθανόλης και 2,5μl διαλύματος 125mM EDTA
- Επώαση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 45' σε 4000 rpm
- Απόχυση του περιεχομένου με spin-down για 8''
- Προσθήκη 30μl 70% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 15' σε 4000 rpm
- Απόχυση του περιεχομένου με spin-down για 8''
- Επώαση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου για την εξάτμιση των υπολειμμάτων της αιθανόλης
- Επαναιώρηση σε 10μl Hi-Di™ Formamide

Ακολούθως, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κατάλληλη πλάκα αλληλούχησης και αλληλουχήθηκαν στον αναλυτή 3500 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems). Έγινε χρήση του εργαλείου IMG/CLUSTAL (http://www.imgt.org) με σκοπό την επιβεβαίωση της ταυτότητας της αλληλουχίας του ενθέματος.

2. Παραγωγή των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων

2.1. Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

Για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T. Πρόκειται για ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα με φαινότυπο επιθηλιακών κυττάρων που προσκολλώνται σε γυάλινο ή πλαστικό υπόστρωμα. Με την εισαγωγή δύο γονιδίων στο γονιδίωμά τους έγινε δυνατή η παρεμπόδιση του κυτταρικού τους κύκλου καθώς και η παρεμπόδιση της απόπτωσής τους. Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά HEK293T διαφέρει ως προς τη σειρά προέλευσής της διότι στο γονιδίωμά της περιέχει το μεγάλο T αντιγόνο του SV40. Αυτή η ιδιότητα τους είναι απαραίτητη για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τον SV40 υποκινητή. Τα HEK293T διατηρούνται προσκολλημένα σε καλλιέργειες χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS) και παρουσία 1% (v/v) υδατικού διαλύματος των αντιβιοτικών πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη (Gibco). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία των 100x20 mm και επώαστηκαν σε ειδικούς κλιβάνους στους 37°C σε 5% CO₂. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων με

επίδραση θρυψίνης (trypsin-EDTA, Biowest) πραγματοποιείται όταν παρατηρείται 70-90% κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου, περίπου ανά 48 ώρες. Επιπρόσθετα, για τον έλεγχο αντιδραστικότητας των αντισωμάτων με κυτταρομετρία ροής καλλιιεργήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η κυτταρική σειρά HEK293 και η Jurkat T. Η κυτταρική σειρά Jurkat T είναι ανθρώπινη λευχαιμική σειρά T λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της σηματοδότησης του TcR (T-cell receptor). Όσον αφορά τα κύτταρα Jurkat T διατηρούνται εναιωρημένα σε καλλιέργειες χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (with stable glutamine, Biowest) εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS) και παρουσία 1% (v/v) υδατικού διαλύματος των αντιβιοτικών πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη (Gibco).

Η πειραματική διαδικασία της ανακαλλιέργειας των προσκολλημένων στην επιφάνεια του τρυβλίου κυττάρων (HEK293T) υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες έχει ως εξής:

- Αφαίρεση του προηγούμενου θρεπτικού μέσου (~10mL) και πλύση με PBS 1x (~5mL) ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου
- Προσθήκη 1mL θρυψίνης και επώαση για 3-5' στους 37°C για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου
- Αδρανοποίηση της θρυψίνης με 10 όγκους (10mL) θρεπτικού μέσου DMEM supplemented
- Επαναιώρηση των κυττάρων με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας για αποκόλλησή τους από την επιφάνεια προσκόλλησης και την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων και μεταφορά σε νέα τρυβλία καλλιέργειας με νέο θρεπτικό μέσο.

Να σημειωθεί πως η αραίωση της αρχικής καλλιέργειας εξαρτάται από το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων και κυμαίνεται από 1:4 μέχρι 1:8 (συνήθως 1:6).

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων που βρίσκονται ως εναιώρημα (Jurkat T) η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων σε συνθήκες 2000 rpm για 5'
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 3-4mL PBS 1X και επαναιώρηση του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες

- Επαναίωρηση των κυττάρων με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέττας για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων και μεταφορά σε νέες φλάσκες καλλιέργειας με νέο θρεπτικό μέσο.

2.2. Διαμόλυνση HEK293T

Η διαμόλυνση με τη βοήθεια κατιονικού πολυμερούς (πολυαιθυενημίμη, PEI) γίνεται τόσο με το πλασμίδιο βαριάς όσο και ελαφριάς αλυσίδας ταυτόχρονα. Οι δύο αλυσίδες διαπλέκονται και το ανασυνδυασμένο αντίσωμα μεταφέρεται στον εξωκυττάριο χώρο (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) μέσω της εκκριτικής οδού από όπου και συλλέγεται. Το αντιδραστήριο PEI είναι ένα κατιονικό γραμμικό πολυμερές το οποίο σχηματίζει σύμπλοκα με το DNA. Τα σύμπλοκα του συνέχεια αλληλεπιδρούν με την ανιονική επιφάνεια των κυττάρων και εισέρχονται σε αυτά με ενδοκυττάρωση. Φαίνεται ότι η ρυθμιστική δράση του PEI, ως δέκτης πρωτονίων, οδηγεί σε οσμωτική λύση των ενδοσωμάτων και στην απελευθέρωση του DNA στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, αποφεύγεται η μετάβαση των συμπλόκων στα λυσοσώματα και άρα επιτυγχάνεται διαμόλυνση.

- Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μια μέρα πριν τη διαμόλυνση
- Λίγες ώρες πριν τη διαμόλυνση γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με 9ml DMEM supplemented
- Ανάμειξη 2ml Opti-MEM με 120μl PEI
- Ανάμειξη 2ml Opti-MEM με 10μg DNA από κάθε πλασμίδιο (10μg από ελαφριά και 10μg από βαριά αλυσίδα). Ο κατάλληλος όγκος από κάθε πλασμίδιο υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωσή του
- Ανάμειξη των μειγμάτων Opti-MEM/PEI και Opti-MEM/DNA. Η αναλογία του PEI προς το DNA είναι 3μl:1μg
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'
- Διαμοιράζεται σταγόνα-σταγόνα από 1ml σε κάθε ένα από τα 4 τρυβλία
- Δώδεκα με δεκαέξι ώρες μετά τη διαμόλυνση, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και αντικαθίσταται με DMEM εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά και 1x Nutridoma-SP (Roche). Το Nutridoma-SP χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα του θρεπτικού μέσου αντί του ορού εμβρύου βοός, έτσι ώστε να διευκολυνθεί ο επακόλουθος καθαρισμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων από το υπερκείμενο των καλλιέργειών. Η καλά καθορισμένη σύσταση του Nutridoma-SP τόσο σε οργανικό (ινσουλίνη, τρανσφερίνη, αλβουμίνη κ.α.) όσο και σε ανόργανο επίπεδο συμβάλλουν σε αυτό.⁶⁴

2.3. Συμπύκνωση των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων

Μετά το πέρας έξι με επτά ημερών από τη διαμόλυνση των κυττάρων HEK293T, έγινε συλλογή του υπερκειμένου των κυτταρικών καλλιεργειών. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 1000 rpm για 10' ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Για τη συμπύκνωση του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φίλτρα κυτταρίνης Millipore® Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Concentrators τα οποία οδηγούν σε μοριακό αποκλεισμό ουσιών μεγαλύτερου μοριακού βάρους από το αναγραφόμενο κατακρατώντας τα αντισώματα. Κατά το τέλος της συμπύκνωσης, προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών για την προστασία της ακεραιότητας των αντισωμάτων (ThermoFisher Scientific) και ο αντιβακτηριδιακός παράγοντας αζίδιο του νατρίου (NaN₃) σε τελική συγκέντρωση 0,05% (w/v). Τα αντισώματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C για περαιτέρω μελέτη.

2.4. Ποσοτικοποίηση των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων

Η ELISA (enzyme linked immunoassay) είναι μια ανοσοχημική μέθοδος, η οποία με τη χρήση αντισωμάτων μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά ή ποιοτικά διάφορα πρωτεϊνικής φύσεως μόρια, όπως τα αντιγόνα και τα αντισώματα σε βιολογικά δείγματα.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με εμπορικά διαθέσιμα σετ αντισωμάτων (Human IgM/IgG ELISA development kit (ALP)). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:⁶³

- Επικάλυψη πλακών ELISA υψηλής ικανότητας πρόσδεσης (Costar) με 100μl mouse anti-Human IgM (MT11/12)/mouse anti-Human IgG (MT145) αντισώματος σε συγκέντρωση 2μg/mL σε PBS 1x και ολονύχτια επώαση στους 4-8°C
- Πλύση 2 φορές με PBS 1x (200 μl σε κάθε βοθρίο)
- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με 200μl 0.1% BSA (Bovine Serum Albumin) σε PBS-Tween (0.05% Tween 20 σε PBS 1x) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Πλύση 5 φορές με PBS-Tween (200μl σε κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη 100μl από τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση και τους θετικούς μάρτυρες για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, αραιωμένα κατάλληλα σε 0.1% BSA (Bovine Serum Albumin) σε PBS-Tween και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση 5 φορές με PBS-Tween (200μl σε κάθε πηγαδάκι)

- Επώαση 100μl αντισώματος calf anti-Human IgM ALP conjugated (MT22-ALP)/ calf anti-Human IgG ALP conjugated (MT78-ALP), αραιωμένο 1/1000 με 0.1% BSA σε PBS-Tween σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Πλύσεις 5 φορές με PBS 1x –Tween 0,01% (200μl σε κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη 100μl του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης (p-Nitrophenyl Phosphate, pNPP)
- Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (405 nm) σε συσκευή μέτρησης Tecan-Spark microplate reader ύστερα από κατάλληλο χρόνο επώασης και υπολογισμός της συγκέντρωσης με τη βοήθεια του λογισμικού Graphpad/Prism

3. Έλεγχος αντιγονικής ειδικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων

3.1. Αντιδραστικότητα έναντι δίκλωνου DNA και λιποπολυσακχαριτών (LPS)

Τα ανασυνδυασμένα αντισώματα ελέγχθηκαν ως προς την αναγνώριση κοινών αυτοαντιγόνων. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ELISA στις οποίες τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που παράχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτογενή αντισώματα σε πειράματα ELISA.

- Επικάλυψη πλακών ELISA υψηλής ικανότητας σύνδεσης (Costar) με 100μl από το αντιγόνο σε συγκέντρωση 5μg/ml σε PBS-0,1% Tween-1% BSA και ολονύχτια επώαση στους 4-8°C
- Πλύση 5 φορές με PBS-0,1% Tween
- Κάλυψη των κενών θέσεων στα wells με 200μl PBS, 1,5% BSA και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση 5 φορές με PBS-0,1% Tween
- Προσθήκη 100μl από τα εξεταζόμενα μονοκλωνικά αντισώματα σε συγκέντρωση 20μg/ml και ολονύχτια επώαση στους 4-8°C
- Πλύση 5 φορές με PBS-0,1% Tween
- Προσθήκη 100μl από το δευτερογενές αντίσωμα ανίχνευσης των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών IgM ή IgG ή Igκ συζευγμένων με αλκαλική φωσφατάση (ALP) ή υπεροξειδάση ρεπανίου (HRP) σε κατάλληλη αραιώση, σε PBS-0,1% Tween-1% BSA και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση 5 φορές με PBS-0,1% Tween
- Προσθήκη 50μl υποστρώματος υπεροξειδάσης (3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνη, TMB) ή της αλκαλικής φωσφατάσης (pNitrophenyl Phosphate, pNPP, Sigma) και επώαση για 10-30' στο σκοτάδι. Στην περίπτωση χρήσης δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένων με υπεροξειδάση ρεπανίου πραγματοποιήθηκε τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη 50 μl 0,18M H₂SO₄ (διάλυμα αναστολής)
- Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OD) στα 450 nm ή στα 405 nm χρησιμοποιώντας τη συσκευή Tecan-Spark microplate reader

3.2. Έλεγχος αντιδραστικότητας έναντι παθογόνων με ELISA

Η αναγνώριση μικροβιακών αντιγόνων ελέγχθηκε με τη χρήση εμπορικών ELISA kit (IBL International kit). Για τον έλεγχο της εγκυρότητας των δοκιμασιών ELISA, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ανασυνδυασμένα αντισώματα προερχόμενα από άλλου τύπου λεμφώματα. Αυτά τα αντισώματα έχουν παραχθεί στο πλαίσιο άλλων μελετών στο εργαστήριο και έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζουν ένα ή περισσότερα από τα αντιγόνα του πάνελ. Τα strip της ELISA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ήδη επικαλυμμένα με το αντίστοιχο αντιγόνο προς εξέταση.

- Επώαση της επικαλυμμένης με το αντιγόνο πλάκας ELISA σε θερμοκρασία δωματίου για 30'
- Προσθήκη 100μl από τα εξεταζόμενα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα σε συγκέντρωση 30μg/ml αραιωμένα με το διάλυμα αραιώσης που παρέχεται από το kit και 100μl από το κάθε control που παρέχεται από το kit. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C
- Πλύση 3 φορές με 300μl από το διάλυμα πλύσης του kit
- Προσθήκη 100μl δευτερογενούς anti-human IgM αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση χρένου (HRP) και επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση 3 φορές με 300μl από το διάλυμα πλύσης του kit
- Προσθήκη 100μl υποστρώματος υπεροξειδάσης (TMB) και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι
- Προσθήκη 100μl διαλύματος αναστολής
- Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450nm σε συσκευή Tecan-Spark microplate reader

3.3. Κυτταρομετρία ροής

Με την κυτταρομετρία ροής έγινε δυνατή η μελέτη της αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων με επιφανειακούς και κυτταρικούς αντιγονικούς επιτόπους στην επιφάνεια ζωντανών κυττάρων.⁶¹

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Συλλογή 25x 10⁴ κυττάρων σε κάθε flow tube
- Φυγοκέντρηση σε 2100 rpm για 5' και απομάκρυνση του θρεπτικού
- Πλύση με 500μl 1% FBS σε PBS 1x φυγοκέντρηση σε 2100 rpm για 5' και απομάκρυνση του υπερκείμενου

- Προσθήκη του ανασυνδυασμένου μονοκλωνικού αντισώματος τελικού όγκου 100μl και συγκέντρωσης 30μg/mL. Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση με 500μl 1% FBS σε PBS 1x φυγοκέντρηση σε 2100 rpm για 5' και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Προσθήκη του αντισώματος PE Mouse Anti-Human Igκ Light chain ή PE Mouse Anti-Human Igλ Light chain, ανάλογα με τον ισότυπο που εκφράζεται από το ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα και επώαση για 30' στο σκοτάδι
- Πλύση με 500μl 1% FBS σε PBS 1x φυγοκέντρηση σε 2100 rpm για 5' και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 500μl PBS 1x
- Η μέτρηση των PE⁺ κυττάρων σε κυτταρόμετρο Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer.

4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Excel 2010 της Microsoft και του λογισμικού Graphpad Prism9.0 (LaJolla, CA, USA). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FlowJo, LLC. Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν έγινε ο υπολογισμός της τυπικής απόκλισης και του μέσου όρου των τιμών τους. Τέλος όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%.

Αποτελέσματα

1. Παραγωγή ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων

Παράχθηκαν πλασμίδια με ενσωματωμένες τις μεταβλητές περιοχές των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων από 32 περιπτώσεις. Αναλυτικότερα, τα 29 ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα έφεραν αλληλουχίες με 100% ταυτότητα με το IGHV/IGHD/IGHJ και IGKV/IGKJ γονίδιο της βλαστικής σειράς και τα 3 ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα (στο εξής θα αναφέρονται ως wild type) έφεραν τις αλληλουχίες που εκφράζονταν από τον κλωνοτυπικό ΒκΥ των ασθενών. Στο πλαίσιο αυτής της πτυχιακής επιλέχθηκαν 3 ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #4, οι patient 2/5/6. Για την επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης των γονιδίων των αντισωμάτων στους πλασμιδιακούς φορείς πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger των πλασμιδίων και ανάλυση της αλληλουχίας τους με το εργαλείο IMGT/V-QUEST (Εικόνα 6).

A	Result summary: 1	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV4-34*01 F	score = 1425	identity = 100.00% (285/285 nt)	
J-GENE and allele	Homsap IGHJ6*02 F	score = 265	identity = 91.94% (57/62 nt)	
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHJ2-15*01 F	D-REGION is in reading frame 2		
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.11]	[8.7.20]	CARGYADSDVIRRYYYYGMDVW	
JUNCTION length (in nt) and decryption	66 nt = (11)+1(8)-9(8)-14(11)-5(27)	(3'V)3'(N1)5'(D)3'(N2)5'(5'J)		

B	Result summary: 2	Productive IGK rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGKV2-30*02 [F]	score = 1470	identity = 100.00% (294/294 nt)	
J-GENE and allele	Homsap IGKJ2*01 F	score = 190	identity = 100.00% (38/38 nt)	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[26.17.36.10]	[11.3.10]	CMQGTHWPPYTF	
JUNCTION length (in nt) and decryption	36 nt = (26)0(0)-1(10)	(3'V)3'(N)5'(5'J)		

Εικόνα 6: Επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του επιθυμητού γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα. με τη χρήση του εργαλείου IMGT/V-QUEST για επιβεβαίωση ενσωμάτωσης του γονιδίου για τη (Α) βαριά και (Β) ελαφριά αλυσίδα της περίπτωσης PT2PR1.

Πίνακας 9: Στον πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των CDR3 περιοχών των μεταβλητών περιοχών της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που παράχθηκαν. Παρουσιάζονται αναλυτικά και τα γονίδια των βαριών και ελαφριών αλυσίδων καθώς και η ταυτότητά τους.

ID	IGHV	IGHV ταυτότητα	Αμινοξική αλληλουχία-CDR3	IGKV	IGKV ταυτότητα	Αμινοξική αλληλουχία KCDR3
PT2	4-34*01	95.79%	CARGYPDTPVRRYYYYGMDVW	2-30*02	97.62%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR1	4-34*01	100.00%	CARGYGDSPDIKRYYYYYGLDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR2	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR3	4-34*01	100.00%	CARVYPDTPVRRYYYYGTDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR4	4-34*01	100.00%	CARGYGDSPDIKRYYYYYGLDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR5	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR6	4-34*01	100.00%	CARVYPDTPVRRYYYYGTDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR7	4-34*01	100.00%	CARGYPDTPVRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT2PR8	4-34*01	100.00%	CARGYPDTPVRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT5	4-34*01	89.77%	CARGYADSDVIRRRYYYYGMDVW	2-30*02	96.94%	CMQGTHWPPYTF
PT5PR1	4-34*01	100.00%	CARGSATSIAARRSYYYGMDVW	2-30*01	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR2	4-34*01	100.00%	CARGSATSIAARRSYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR3	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGIDVW	2-30*01	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR4	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGIDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR5	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGMDVW	2-30*01	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR6	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR7	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVRRYYYYGMDVW	2-30*01	100.00%	CMQGTHWPPWTF
PT5PR8	4-34*01	100.00%	CARGSATSIAARRSYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT5PR9	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGIDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT5PR10	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVIRRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT5PR11	4-34*01	100.00%	CARGYADSDVRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT5PR12	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTWPPYTF
PT6	4-34*02	93.33%	CARCYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	97.24%	CMQGTWPPYTF
PT6PR1	4-34*01	97.54%	CARCYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	81.29%	CMQGTWPPYTF
PT6PR2	4-34*01	97.54%	CARGYGTSAAKRYYYYYGMDVW	2-30*02	99.66%	CMQGTWPPYTF
PT6PR3	4-34*01	100.00%	CARGYGTSAAKRYYYYYGMDVW	2-30*02	81.29%	CMQGTWPPYTF
PT6PR4	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYCYGMDVW	2-30*02	99.66%	CMQGTWPPYTF
PT6PR5	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYCYGMDVW	2-30*02	81.29%	CMQGTWPPYTF
PT6PR6	4-34*01	100.00%	CARCYGTSATTKRYYYYYGMDVW	2-30*02	99.66%	CMQGTHWPPYTF
PT6PR9	4-34*01	97.54%	CARGYGTSAAKRYYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT6PR10	4-34*01	100.00%	CARGYGTSATTKRYCYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF
PT6PR11	4-34*01	100.00%	CARGYPDTPVRRYYYYGMDVW	2-30*02	100.00%	CMQGTHWPPYTF

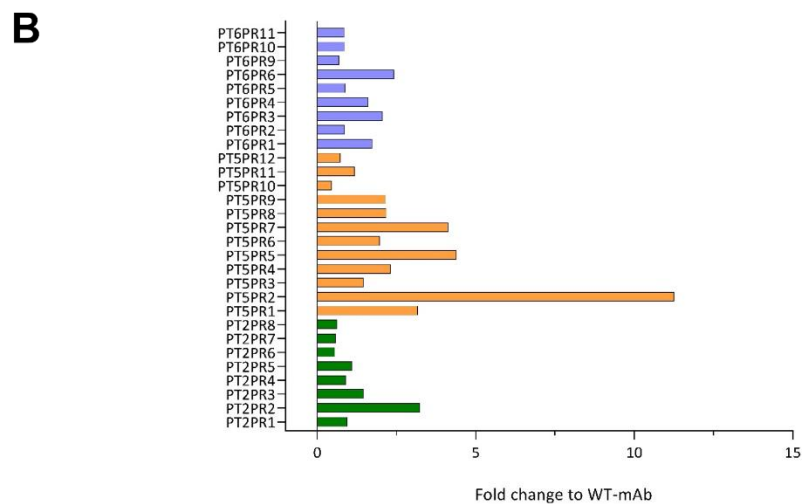
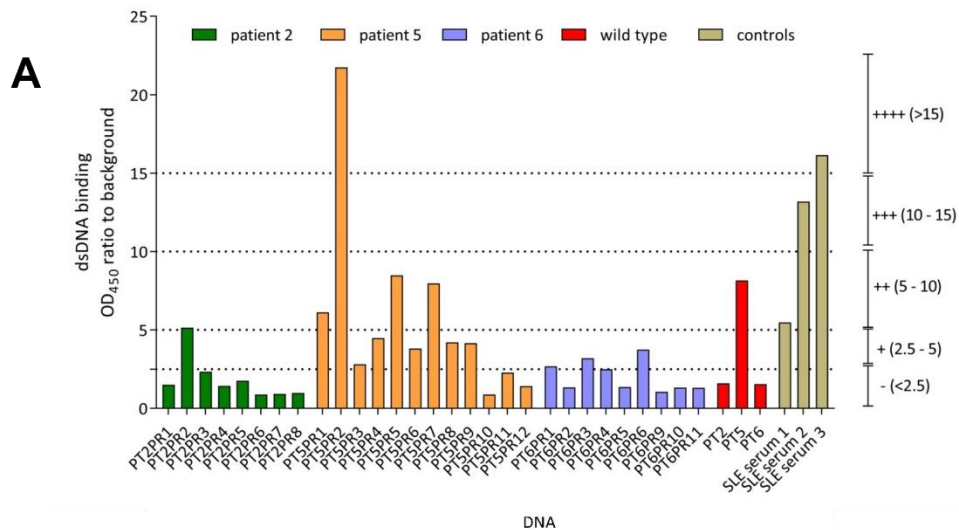
2. Έλεγχος της αντιγονικής ειδικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων

Σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία αντισώματα των στερεότυπων υποσυνόλων της ΧΛΛ αποτελούν στόχους για αρκετά αυτοαντιγόνα και επιφανειακά αντιγόνα διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών.⁶⁵⁻⁶⁷ Με τις παρακάτω αναλύσεις ELISA, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την αντιδραστικότητα των ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ποικίλων αντιγόνων. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ELISA έναντι των παθογόνων *Mycoplasma pneumoniae*, Cytomegalovirus και Influenza A και έναντι αυτοαντιγόνων όπως το dsDNA και οι λιποπολυσακχαρίτες, χρησιμοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα ως πρωτογενή αντισώματα.⁶⁶

Στόχος είναι η σύγκριση της αντιδραστικότητας των 29 υποκλωνικών αμετάλλακτων αντισωμάτων σε σχέση με αυτήν των 3 αντισωμάτων του κύριου μεταλλαγμένου κλώνου.

2.1. Αντιδραστικότητα έναντι δίκλωνου DNA (anti-dsDNA)

Στη δοκιμασία της ELISA ελέγχθηκαν για την αντιδραστικότητά τους 32 mAbs ενάντια στο δίκλωνο DNA μαζί με 3 θετικά κοντρόλ ορών από ασθενείς με ερυθματώδη λύκο.^{68,69} Δεκατέσσερα από τα 32 mAbs που εξετάστηκαν πέρασαν το κατώτερο κατώφλι θετικότητας (Εικόνα 7A). Αναλυτικότερα, από τα 14 αντισώματα που ξεπέρασαν το όριο θετικότητας, τα αντισώματα PT5, PT5PR2, PT5PR5 και PTR5PR7 εμφάνισαν την ισχυρότερη σύνδεση από τα υπόλοιπα, ενώ τα PT6PR1, PT6PR3 και PT5PR3 εμφάνισαν οριακά θετικές τιμές (Εικόνα 7A). Ένα επιπλέον αξιοπρόσεκτο γεγονός είναι πως σχεδόν όλα τα ανασυνδυασμένα, αμετάλλακτα, υποκλωνικά αντισώματα του ασθενή 5, όπως και τα αντισώματα του κύριου μεταλλαγμένου κλώνου του ασθενή, εμφάνισαν διαφορετικής έντασης σύνδεση με το dsDNA. Τέλος να σημειωθεί ότι η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων mAbs δεν παρουσίασαν αξιόλογη αντι-dsDNA δράση.^{54,70}

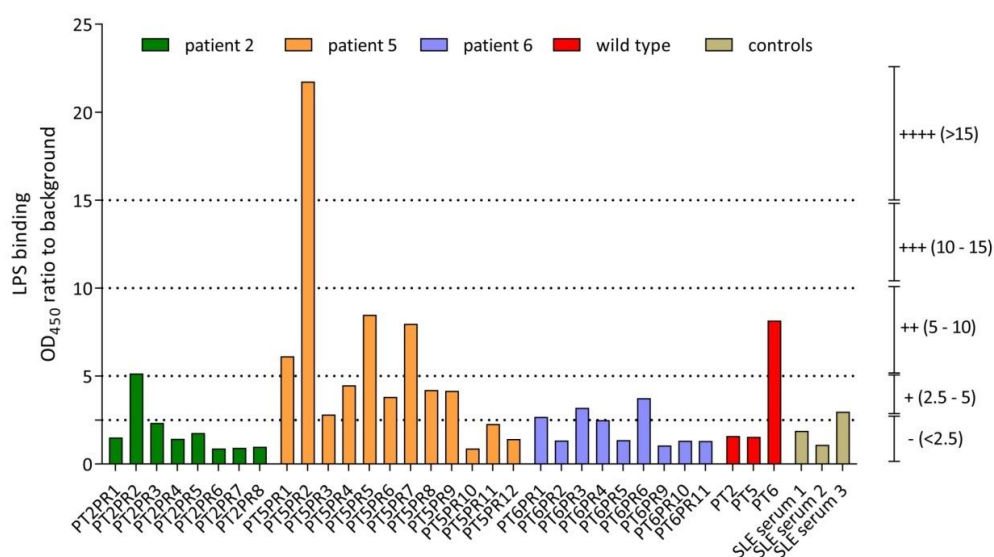


Εικόνα 7: Α. Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι dsDNA με ELISA. Β. Με τη χρήση ενός γραφήματος (bar graph), έγινε η σύγκριση μεταξύ των wild type mAbs και των ανασυνδυασμένων mAbs ανά περίπτωση. Συγκρίθηκαν 3 wild type mAbs με 29 ανασυνδυασμένα mAbs. Ο λόγος αλλαγής (fold change) βασίστηκε στην ποσοτική σύγκριση της αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων σε υποκλωνικό επίπεδο, με την αντιδραστικότητα των αντίστοιχων αντισωμάτων των κυρίαρχων κλώνων (PT2/PT5/PT6) έναντι του dsDNA.

2.2. Αντιδραστικότητα έναντι λιποπολυσακχαριτών (LPS)

Δεκαπέντε από τα 32 mAbs που μελετήθηκαν για την αντιδραστικότητά τους έναντι σε λιποπολυσακχαρίτες ξεπέρασαν το κατώφλι της θετικότητας. Πιο συγκεκριμένα, 7 περιπτώσεις εμφάνισαν ισχυρή σύνδεση, ενώ 5 πέρασαν οριακά το κατώφλι της θετικότητας (Εικόνα 8). Από τις επτά περιπτώσεις με την ισχυρή σύνδεση, η περίπτωση PT5PR2 παρουσίασε την υψηλότερη τιμή αντιδραστικότητας σε αντίθεση με την αντίστοιχη wild type περίπτωση. Παράλληλα η wild type περίπτωση του ασθενή 6

εμφάνισε ισχυρή σύνδεση με τον λιποπολυσακχαρίτη σε αντίθεση με τις περιπτώσεις που αφορούσαν τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα υποκλωνικά αντισώματα, οι οποίες εμφάνισαν ελάχιστη αντιδραστικότητα. Τέλος, δεκαεπτά από τα 32 mAbs δεν παρουσίασαν αξιόλογη αναγνώριση, τα 12 εκ των οποίων ήταν αμετάλλακτα αντισώματα που εντοπίστηκαν ενδοκλωνικά στους ασθενείς 2 και 6(Εικόνα 8).^{71,72}

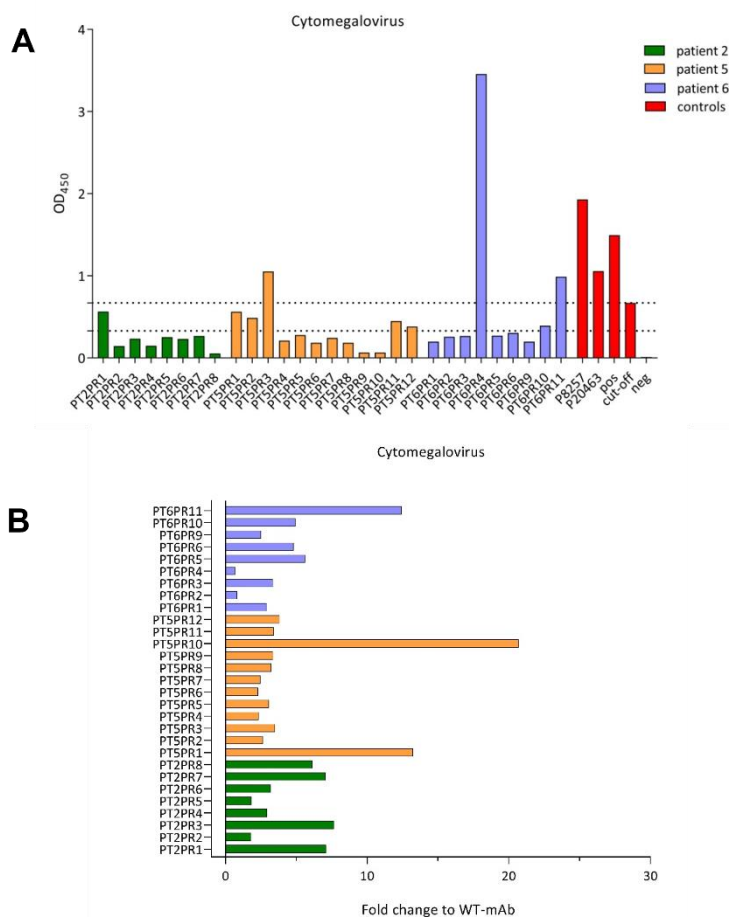


Εικόνα 8: Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι λιποπολυσακχαριτών με ELISA.

2.3. Αντιδραστικότητα έναντι παθογόνων

2.3.1. Αντιδραστικότητα έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV)

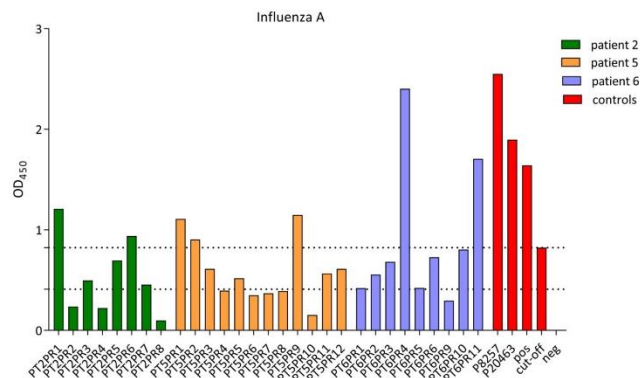
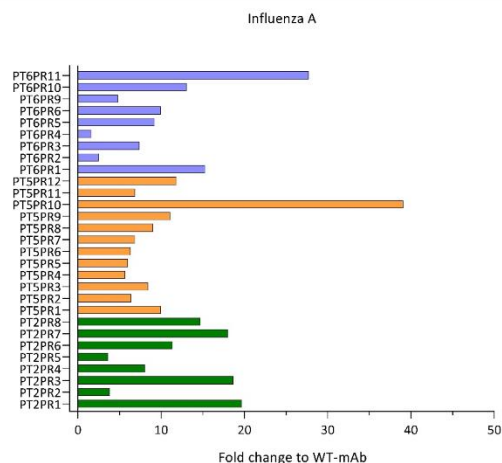
Από τα 32 mAbs που εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν αντιγόνα του ιού CMV μόνο τα εννέα πέρασαν το κατώτερο όριο της θετικότητας, με τρία από αυτά να παρουσιάζουν την εντονότερη σύνδεση. Στην πλειονότητά τους (13/32) τα υπό μελέτη αντισώματα δεν παρουσίασαν σημαντική αντιδραστικότητα έναντι του CMV. Εκτός από τα θετικά control του kit χρησιμοποιήθηκαν και ασθενείς με σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης που είχαν παρουσιάσει έντονη αντιδραστικότητα έναντι μιας ποικιλίας αντιγόνων (Εικόνα 9A).^{73,74}



Εικόνα 9: Α. Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι του παθογόνου CMV με ELISA. Β. Με την χρήση ενός γραφήματος (bar graph), έγινε η σύγκριση μεταξύ των wild type mAbs και των ανασυνδυασμένων mAbs ανά περίπτωση. Συγκρίθηκαν 3 wild type mAbs με 29 ανασυνδυασμένα mAbs. Ο λόγος αλλαγής (fold change) βασίστηκε στην ποσοτική σύγκριση της αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων σε υποκλωνικό επίπεδο, με την αντιδραστικότητα των αντίστοιχων αντισωμάτων των κύριων κλώνων (PT2/PT5/PT6) έναντι του CMV.

2.3.2 Αντιδραστικότητα έναντι του Influenza A

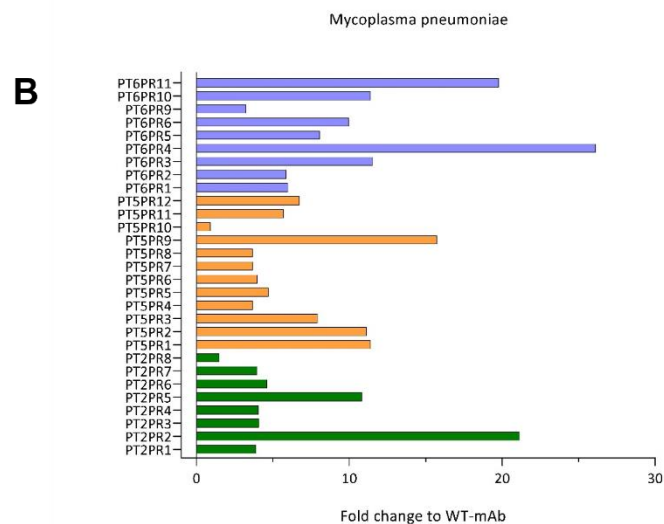
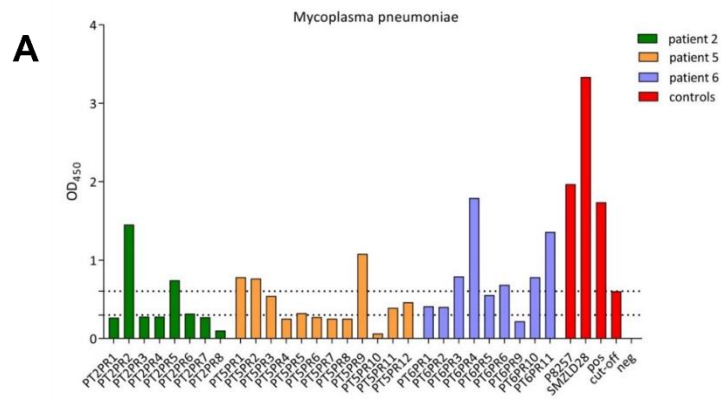
Για την εξέταση της αντιδραστικότητας των αντισωμάτων έναντι του ιού Influenza A, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τριάντα δύο mAbs. Πιο συγκεκριμένα, τα είκοσι από τα 32 αντισώματα ξεπέρασαν το κατώφλι θετικότητας με τα 9/20 να εμφανίζουν αρκετά ισχυρή σύνδεση με τα αντιγόνα επιφανείας του ιού (Εικόνα 10Α). Σε αντίθεση με την ELISA που πραγματοποιήθηκε για τον ιό CMV, στο συγκεκριμένο πείραμα η μειονότητα των αντισωμάτων ήταν εκείνη χωρίς αξιόλογη δράση εναντίον των αντιγονικών επιτόπων του ιού Influenza A.⁷⁵

A**B**

Εικόνα 10: Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι του παθογόνου Influenza A με ELISA. Β. Με την χρήση ενός γραφήματος (bar graph), έγινε η σύγκριση μεταξύ των wild type mAbs και των ανασυνδυασμένων mAbs ανά περίπτωση. Συγκρίθηκαν 3 wild type mAbs με 29 ανασυνδυασμένα mAbs. Ο λόγος αλλαγής (fold change) βασίστηκε στην ποσοτική σύγκριση της αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων σε υποκλωνικό επίπεδο, με την αντιδραστικότητα των αντίστοιχων αντισωμάτων των κύριων κλώνων (PT2/PT5/PT6) έναντι του ιού Influenza A.

2.3.3 Αντιδραστικότητα έναντι του *Mycoplasma pneumoniae*

Και σε αυτήν τη μέθοδο ELISA μελετήθηκαν και τα τριάντα δύο παραγμένα αντισώματα ως προς την ικανότητα σύνδεσής τους με το μυκόπλασμα της πνευμονίας. Δεκαεπτά από τις 32 περιπτώσεις ξεπέρασαν το κατώτερο όριο θετικότητας (Εικόνα 11A). Αναλυτικότερα, τα εννέα από τα 17 αντισώματα παρουσίασαν αξιόλογη αντιδραστικότητα έναντι του μυκοπλάσματος ενώ αρκετά 15/32 ήταν και εκείνα που δεν εμφάνισαν κανένα ίχνος αναγνώρισης του.^{76,77}



Εικόνα 11: Α. Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι του παθογόνου *Mycoplasma pneumoniae* με ELISA. Β. Με τη χρήση ενός γραφήματος (bar graph), έγινε η σύγκριση μεταξύ των wild type mAbs και των ανασυνδυασμένων mAbs ανά περίπτωση. Συγκρίθηκαν 3 wild type mAbs με 30 ανασυνδυασμένα mAbs. Ο λόγος αλλαγής (fold change) βασίστηκε στην ποσοτική σύγκριση της αντιδραστικότητας των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων σε υποκλωνικό επίπεδο, με την αντιδραστικότητα των αντίστοιχων αντισωμάτων των κύριων κλώνων (PT2/PT5/PT6) έναντι του παθογόνου *Mycoplasma pneumoniae*.

Πίνακας 10: Παρουσίαση των συνολικών αποτελεσμάτων από τον έλεγχο της σύνδεσης των mAbs σε αντιγονικούς επιτόπους διάφορων παθογόνων.

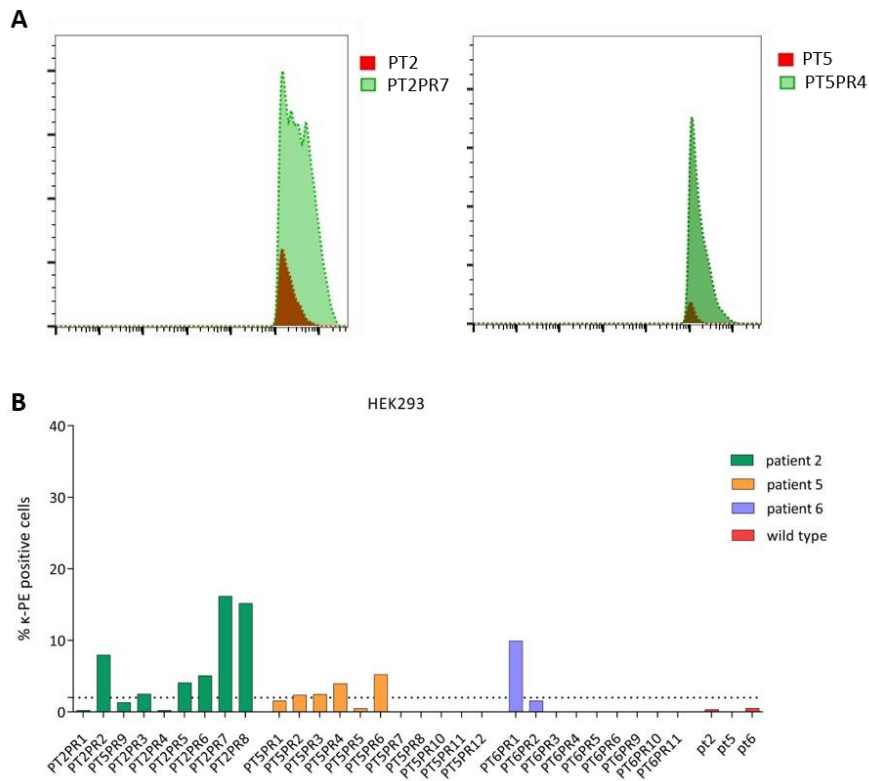
mAb	dsDNA	LPS	CMV	Influenza A	M. pneumoniae
PT2	-	-	-	-	-
PT2PR1	-	-	+	+	-
PT2PR2	+	+	-	-	+
PT2PR3	-	-	-	+	-
PT2PR4	-	-	-	-	-
PT2PR5	-	-	-	+	+
PT2PR6	-	-	-	+	-
PT2PR7	-	-	-	+	-
PT2PR8	-	-	-	-	-
PT5	+	-	-	-	-
PT5PR1	+	+	+	+	+
PT5PR2	+	+	+	+	+
PT5PR3	+	+	+	+	+
PT5PR4	+	+	-	-	-
PT5PR5	+	+	-	+	-
PT5PR6	+	+	-	-	-
PT5PR7	+	+	-	-	-
PT5PR8	+	+	-	-	-
PT5PR9	+	+	-	+	+
PT5PR10	-	-	-	-	-
PT5PR11	-	-	+	+	+
PT5PR12	-	-	+	+	+
PT6	-	+	-	-	-
PT6PR1	+	+	-	-	+
PT6PR2	-	-	-	+	+
PT6PR3	+	+	-	+	+
PT6PR4	-	+	+	+	+
PT6PR5	-	-	-	+	+
PT6PR6	+	+	-	+	+
PT6PR9	-	-	-	-	-
PT6PR10	-	-	+	+	+
PT6PR11	-	-	+	+	+

3. Πειράματα μελέτης αντιδραστικότητας των ανασυνδυσασμένων αντισωμάτων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής (FACS)

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ορισμένα στερεότυπα υποσύνολα της ΧΛΛ φαίνεται να αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους στην επιφάνεια ζωντανών και αποπτωτικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων κάποιων κυτταρικών σειρών όπως η HEK293. Επομένως, εξετάστηκε η αντιδραστικότητα των 32 mAbs έναντι επιτόπων στις κυτταρικές σειρές HEK293 και Jurkat T. Ως αρνητικά κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν και για τις δύο κυτταρικές σειρές τα HEK293-unstained και Jurkat T-unstained τα οποία δεν σημάνθηκαν με κάποιο αντίσωμα που έφερε φθορόχρωμα. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν καλά μελετημένα mAbs προερχόμενα από ασθενείς με ΧΛΛ, τα οποία δεν χαρακτηρίζονταν από αντιδραστικότητα έναντι των εξεταζόμενων κυτταρικών σειρών.

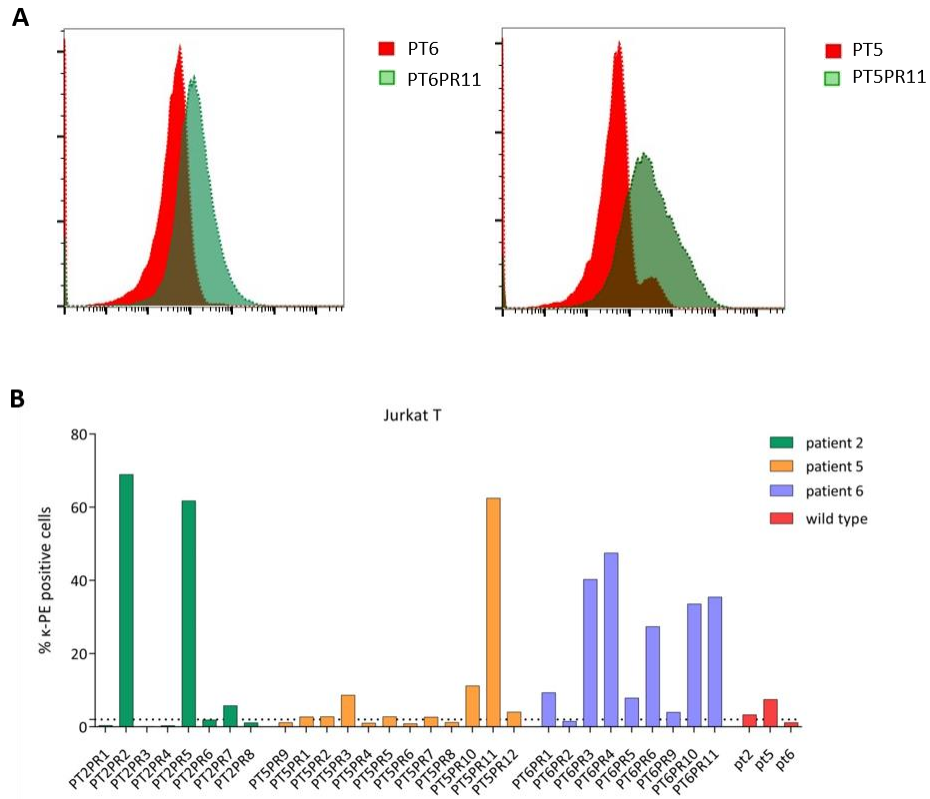
3.1. Έλεγχος αντιδραστικότητας έναντι επιφανειακών αντιγόνων κυτταρικών σειρών

Ξεκινώντας με την κυτταρική σειρά HEK293, μόνο εννέα από τα 32 αντισώματα ξεπέρασαν το κατώφλι θετικότητας ενώ τα υπόλοιπα αντισώματα δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη αντιδραστικότητα. Από αυτά, την πιο έντονη σύνδεση παρουσίασαν τα ανασυνδυσασμένα αντισώματα του ασθενή 2 (PT2PR2, PT2PR7, PT2PR8) (Εικόνα 12A, B).



Εικόνα 12: Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι αντιγονικών επιτόπων της κυτταρικής σειράς HEK293T με κυτταρομετρία ροής. Α. Παράδειγμα ανάλυσης της σύνδεσης των mAbs (PT2 vs PT2PR7 και PT5 vs PT5PR4) με τα HEK293 κύτταρα. Β. Σύνδεση των mAbs με τα HEK293 κύτταρα.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα έναντι των αντιγονικών επιτόπων των HEK293 κυττάρων, δεκαπέντε από τις 32 περιπτώσεις εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιδραστικότητα έναντι των επιτόπων των κυττάρων Jurkat T. Ειδικότερα 8 από τα 15 αντισώματα παρουσίασαν ισχυρή σύνδεση με τα αντιγόνα των Jurkat T, η οποία ξεπερνούσε κατά πολύ το όριο θετικότητας (Εικόνα 13A).⁷¹



Εικόνα 13: Έλεγχος της αντιδραστικότητας των mAbs έναντι αντιγονικών επιτόπων της κυτταρικής σειράς Jurkat με κυτταρομετρία ροής. Α. Παράδειγμα ανάλυσης της σύνδεσης των mAbs (PT6 vs PT6PR11 και PT5 vs PT5PR11) με τα Jurkat T κύτταρα. Β. Σύνδεση των mAbs με τα Jurkat T κύτταρα.

Πίνακας 11: Παρουσίαση των συνολικών αποτελεσμάτων από τον έλεγχο της σύνδεσης των mAbs σε αντιγονικούς επιτόπους κυτταρικών σειρών HEK293 και Jurkat T.

mAb	HEK293	Jurkat T
PT2	-	-
PT2PR1	-	-
PT2PR2	+	+
PT2PR3	-	-
PT2PR4	-	-
PT2PR5	+	+
PT2PR6	+	-
PT2PR7	+	+
PT2PR8	+	-
PT5	-	+
PT5PR1	-	-
PT5PR2	+	-
PT5PR3	+	+
PT5PR4	+	-
PT5PR5	-	-
PT5PR6	+	-
PT5PR7	-	-
PT5PR8	-	-
PT5PR9	-	-
PT5PR10	-	+
PT5PR11	-	+
PT5PR12	-	+
PT6	-	-
PT6PR1	+	+
PT6PR2	-	-
PT6PR3	-	+
PT6PR4	-	+
PT6PR5	-	+
PT6PR6	-	+
PT6PR9	-	-
PT6PR10	-	+
PT6PR11	-	+

Συνολικά, από τα παραχθέντα αντισώματα που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία οι 100% αμετάλλακτες περιπτώσεις παρουσίασαν ένα εντελώς διαφορετικό πρότυπο αντιδραστικότητας σε σχέση με τα κλωνοτυπικά. Πιο συγκεκριμένα, στις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν και στις μετέπειτα αναλύσεις έντονη αντιδραστικότητα παρουσίασαν μόνο τα αμετάλλακτα mAbs σε αντίθεση με εκείνα του κύριου κλώνου που σε ελάχιστες περιπτώσεις είχαν αντιγονική σύνδεση.

Συζήτηση

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχτεί πως ο ΒκΥ διαδραματίζει μείζονα ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων της ΧΛΛ με το μικροπεριβάλλον τους. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το μεταλλακτικό φορτίο των IGHV γονιδίων το οποίο καθορίζει ως ένα βαθμό την έκβαση της ασθένειας. Με βάση την υφιστάμενη βιβλιογραφία, οι ΒκΥ που προέρχονται από αμετάλλακτες περιπτώσεις παρουσιάζουν έντονη πολυαντιδραστικότητα αναγνωρίζοντας αρκετούς παθογονικούς επιτόπους και ποικίλα αυτοαντιγόνα. Σε αντίθεση με τις περιπτώσεις αυτές, αντισώματα προερχόμενα από μεταλλαγμένους κλώνους, στους οποίους έχει συμβεί σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, εμφανίζουν περιορισμένη αντιγονική σύνδεση. Σύμφωνα με τα παραπάνω η επεξεργασία του ΒκΥ μέσω της ΣΥΜ φαίνεται να είναι η αιτία για την αλλαγή του αντιδραστικού προφίλ των αντισωμάτων που τα αποτρέπει από μια εικόνα παρόμοια με αυτή των φυσικών αντισωμάτων του οργανισμού.

Η αναγνώριση ευρέος φάσματος αυτοαντιγόνων όπως τα κυτταρικά συστατικά των αποπτωτικών κυττάρων είναι χαρακτηριστικό των φυσικών αντισωμάτων. Σύμφωνα με προηγούμενες αναλύσεις των αντισωμάτων που εντοπίζονται στην κυκλοφορία ενός υγιούς οργανισμού, εκείνα στα οποία η βαριά αλυσίδα κωδικοποιείται από το γονίδιο IGHV4-34 χαρακτηρίζονται από πολυαντιδραστικότητα και αυτοαντιδραστικότητα. Πιο αναλυτικά, διακρίνονται από έντονη αντιδραστικότητα έναντι των I/i αντιγόνων των ερυθροκυττάρων τα οποία με την σειρά τους αποτελούν συχνό αντιγονικό στόχο αυτοαντισωμάτων στη νόσο των ψυχροσυγκολλητινών. Έτσι είναι πιθανόν, η αυτοαντιδραστικότητά τους μειώνεται μέσω μηχανισμών όπως η αλλαγή ισοτύπου και η επεξεργασία του ΒκΥ (receptor editing) κατά τη διάρκεια ωρίμανσης και επιλογής των Β λεμφοκυττάρων.

Το στερεότυπο υποσύνολο #4 της ΧΛΛ αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα και τα πιο εκτενώς μελετημένα υποσύνολα και πρότυπο ήπιας έκβασης της ασθένειας. Αναλυτικότερα, η CDR3 περιοχή των βαριών αλυσίδων του υποδοχέα είναι εμπλουτισμένη με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων (K/R)YY που συναντώνται συχνά σε παθολογικής φύσεως αντι-DNA ειδικότητα. Επιπλέον, και οι δύο αλυσίδες

έχουν υψηλό φορτίο ΣΥΜ, με διακριτό πρότυπο κατανομής, ειδικό για το υποσύνολο #4. Το πρότυπο αυτό παραπέμπει σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης της αυτοαντιδραστικότητας, π.χ. εισαγωγή αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων τόσο στην βαριά όσο και στην ελαφριά αλυσίδα. Στην πλειοψηφία του το υποσύνολο φαίνεται πως συχνό φαινόμενο είναι η εναλλαγή ισοτύπου των αντισωμάτων σε ισότυπο IgG (σπάνιο γεγονός στα κύτταρα της ΧΛΛ, <10% των περιπτώσεων ΧΛΛ).

Ευρήματα από προηγούμενη μελέτη για το στερεότυπο υποσύνολο #4 έδειξαν πως η IGHV4-34 βαριά αλυσίδα σε συνδυασμό με την IGKV2-30 ελαφριά εμφανίζει έντονη σύνδεση με επιτόπους των HEK293 κυττάρων, γεγονός που εν μέρει επαληθεύεται και στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που ανήκαν στον κύριο μεταλλαγμένο κλώνο της ασθένειας δεν εμφάνισαν αντιδραστικότητα με αντιγόνα επιφανείας των κυττάρων HEK293 σε αντίθεση με μια ομάδα αμετάλλακτων αντισωμάτων (8 περιπτώσεις) που βρίσκονται σε υποκλωνικό επίπεδο. Για την κυτταρική σειρά Jurkat T η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι το 1/3 των μεταλλαγμένων mAbs και περισσότερο από το 1/2 των αμετάλλακτων mAbs αναγνώριζαν αντιγονικούς επιτόπους στην επιφάνεια της. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για διαφορετικά υποσύνολα της ΧΛΛ συμπεριλαμβανομένου και του υποσυνόλου #4. Είναι γεγονός πως αντισώματα που φέρουν το γονίδιο IGHV4-34 σχετίζονται με την αναγνώριση αυτοαντιγόνων συμπεριλαμβανομένων του dsDNA και των LPS. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά την αναγνώριση των LPS μόνο το 1/3 των αντισωμάτων του κύριου μεταλλαγμένου κλώνου ξεπέρασε το κατώφλι θετικότητας ενώ αρκετές αμετάλλακτες περιπτώσεις (n=15) που συναντιόνταν υποκλωνικά παρουσίασαν έντονη σύνδεση με τους LPS. Σε αντίστοιχο πείραμα ELISA για τον έλεγχο της αναγνώρισης του dsDNA, και πάλι το 1/3 των περιπτώσεων του κύριου κλώνου, ενώ παρατηρήθηκε έντονη αντίδραση από τα αμετάλλακτα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Τέλος, στα πειράματα της ELISA που αφορούσαν τον έλεγχο αντιδραστικότητας έναντι των παθογόνων CMV, Influenza A και *Mycoplasma pneumoniae* από τα αντισώματα που εξετάστηκαν, αντιγονική σύνδεση εμφάνισαν μόνο τα ανασυνδυασμένα 100% αμετάλλακτα mAbs. Ειδικότερα, στον έλεγχο

αντιγονικής σύνδεσης έναντι του κυτταρομεγαλοϊού, ελάχιστα ήταν τα mAbs (9/32) που ξεπέρασαν το κατώφλι της θετικότητας. Αντίθετα, στην δοκιμασία αναγνώρισης και σύνδεσης για τα παθογόνα Influenza A και *Mycoplasma pneumoniae* περισσότερα από τα μισά (50%) παραγμένα αντισώματα έδειξαν ισχυρή σύνδεση με τα αντιγόνα των παθογόνων.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται νέα δεδομένα που αφορούν σε πιθανούς μηχανισμούς παθογένειας του υποσυνόλου #4. Αναλυτικότερα με βάση τα παραπάνω ευρήματα, αποδεικνύεται πως ασθενείς που ανήκουν στο συγκεκριμένο υποσύνολο συνεχίζουν να συσσωρεύουν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την βαριά αλυσίδα του ΒκΥ μέσω μηχανισμών κλωνικής επιλογής για την αποφυγή ενός πολυαντιδραστικού προφίλ που συνδέεται με πιο επιθετική νόσο. Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως, υπάρχουν ενδείξεις για αρνητική επιλογή των 100% αμετάλλακτων κλώνων από αντιγόνα του μικροπεριβάλλοντος και τελική κλωνική έκπτυξη ενός σχετικά ανεργικού ΒκΥ.

Βιβλιογραφία

1. McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L. & Stark, F. Introduction to the Immune System. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2024 1–24 (Humana Press Inc., 2019).
2. Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. *Basic immunology: Functions and disorders of the immune system*. (Elsevier).
3. Avrameas, S., Alexopoulos, H. & Moutsopoulos, H. M. Natural autoantibodies: An undersung hero of the immune system and autoimmune disorders-A point of view. *Frontiers in Immunology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01320> (2018).
4. LeBien, T. W., Thomas, * & Tedder, F. B lymphocytes: how they develop and function. (2008) doi:10.1182/blood.
5. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunobiology, 5th ed.*
6. Ndoja, S. & Lima, H. Monoclonal Antibodies. in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications* 71–95 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63660-7.00004-8.
7. Malcolm, S. et al. Localization of human immunoglobulin K light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization (human K genes/gene mapping/chromosome translocation/Burkdt lymphoma). *Proc. NatL Acad. Sci. USA* vol. 79 (1982).
8. Croce, C. M. et al. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains (mouse-human hybrids/gene regulation/human chromosomes/human isozymes). *Genetics* vol. 76 (1979).
9. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* vol. 71 101–132 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203> (2002).
10. Jones, J. M. & Gellert, M. The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system. *Immunological Reviews* vol. 200 233–248 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00168.x> (2004).
11. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 131 959–971 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046> (2013).
12. LeBien, T. W. *Fates of human B-cell precursors*.
13. Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L. & Toellner, K.-M. *Regulation of germinal center B-cell differentiation*. (2016).
14. Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S. T. Marginal zone B cells. *Annual Review of Immunology* vol. 23 161–196 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728> (2005).

15. Griffin, D. O., Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 67–80 (2011).
16. Ng, A. & Chiorazzi, N. Potential Relevance of B-cell Maturation Pathways in Defining the Cell(s) of Origin for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 35 665–685 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.03.002> (2021).
17. Woyach, J. A., Johnson, A. J. & Byrd, J. C. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* vol. 120 1175–1184 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-362624> (2012).
18. Küppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* vol. 5 251–262 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc1589> (2005).
19. Ghia, P., Nadel, B., Sander, B., Stamatopoulos, K. & Stevenson, F. K. Early stages in the ontogeny of small B-cell lymphomas: genetics and microenvironment. in *Journal of Internal Medicine* vol. 282 395–414 (Blackwell Publishing Ltd, 2017).
20. Bewarder, M., Stilgenbauer, S., Thurner, L. & Kaddu-Mulindwa, D. Current treatment options in cl. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13102468> (2021).
21. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* **3**, (2017).
22. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Chronic Lymphocytic Leukemia. **94**, 1848–1854 (1999).
23. Hallek, M. & Al-Sawaf, O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol* **96**, 1679–1705 (2021).
24. Agathangelidis, A. *et al.* Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia* vol. 36 1961–1968 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01604-2> (2022).
25. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* **94**, 1266–1287 (2019).
26. Lee, J. & Wang, Y. L. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics* vol. 22 1114–1125 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.06.004> (2020).
27. Puiggros, A., Blanco, G. & Espinet, B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: Where we are and where we go. *BioMed Research International* vol. 2014 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2014/435983> (2014).
28. Cohen, J. A. *et al.* An updated perspective on current prognostic and predictive biomarkers in chronic lymphocytic leukemia in the context of chemoimmunotherapy and novel targeted therapy. *Cancers* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12040894> (2020).

29. Ding, W. The Ongoing Unmet Needs in Chronic Lymphocytic Leukemia: TP53 Disruption, Richter, and Beyond. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 35 739–759 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.04.001> (2021).
30. Sutton, L. A. *et al.* Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica* **101**, 959–967 (2016).
31. Hoogeboom, R. *et al.* A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 59–70 (2013).
32. Vinciguerra, V. P. *et al.* Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic. **94**, 1840–1847 (1999).
33. Deaglio, S. *et al.* CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* **110**, 4012–4021 (2007).
34. Cruse, J. M., Lewis, R. E., Webb, R. N., Sanders, C. M. & Suggs, J. L. Zap-70 and CD38 as predictors of IgVH mutation in CLL. *Exp Mol Pathol* **83**, 459–461 (2007).
35. Bystry, V. *et al.* ARResT/AssignSubsets: A novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics* **31**, 3844–3846 (2015).
36. Sutton, L. A. *et al.* Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: Longitudinal immunogenetic evidence. *Molecular Medicine* **19**, 230–236 (2013).
37. Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R. & Ghia, P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* vol. 31 282–291 Preprint at <https://doi.org/10.1038/leu.2016.322> (2017).
38. Vlachonikola, E., Sofou, E., Chatzidimitriou, A., Stamatopoulos, K. & Agathangelidis, A. The Significance of B-cell Receptor Stereotypy in Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological and Clinical Implications. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 35 687–702 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.03.003> (2021).
39. Jaramillo, S. *et al.* Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: Analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group. *Haematologica* **105**, 2598–2607 (2020).
40. Agathangelidis, A. *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* **119**, 4467–4475 (2012).
41. Murray, F. *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* **111**, 1524–1533 (2008).
42. Gounari, M. *et al.* Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8 Key Points. (2015) doi:10.1182/blood-2014-09.

43. Ghia, P., Chiorazzi, N. & Stamatopoulos, K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: The role of antigen stimulation. in *Journal of Internal Medicine* vol. 264 549–562 (2008).
44. CATERA, R. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Molecular Medicine* **14**, 665–674 (2008).
45. Rosén, A., Murray, F., Evaldsson, C. & Rosenquist, R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia-Implications for cell origin and leukemogenesis. *Seminars in Cancer Biology* vol. 20 400–409 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.09.004> (2010).
46. Tobin, G., Rosén, A. & Rosenquist, R. What is the current evidence for antigen involvement in the development of chronic lymphocytic leukemia? *Hematological Oncology* vol. 24 7–13 Preprint at <https://doi.org/10.1002/hon.760> (2006).
47. Minden, M. D. von *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309–312 (2012).
48. Marincevic, M. *et al.* High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with ‘stereotyped’ IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* **95**, 1519–1525 (2010).
49. Baliakas, P. *et al.* Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: A retrospective multicentre study. *Lancet Haematol* **1**, e74–e84 (2014).
50. Athanasiadou, A. *et al.* Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica* **93**, 473–474 (2008).
51. Armut, H. *et al.* *The New England Journal of Medicine* GENOMIC ABERRATIONS AND SURVIVAL IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA A BSTRACT Background Fluorescence *in situ* hybridization has. (2000).
52. Vardi, A. *et al.* IgG-Switched cll has a distinct immunogenetic signature from the common md variant: Ontogenetic implications. *Clinical Cancer Research* **20**, 323–330 (2014).
53. Stamatopoulos, K. *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. **109**, 259–270 (2007).
54. Jang, Y. J. & Stollar, B. D. *Review Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. CMLS, Cell. Mol. Life Sci* vol. 60 <http://www.bioinf.org.uk/abs/> (2003).
55. Murray, F. *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* **111**, 1524–1533 (2008).
56. Hadzidimitriou, A. *et al.* Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 403–411 (2009).

57. Sutton, L. A. *et al.* An entity evolving into a community: defining the common ancestor and evolutionary trajectory of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #4. *Mol Med* **20**, 720–728 (2014).
58. Kostareli, E. *et al.* Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia* **24**, 1317–1324 (2010).
59. Sutton, L.-A. *et al.* LYMPHOID NEOPLASIA Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. (2009) doi:10.1182/blood-2009.
60. James, K. & Bell, G. T. *Human monoclonal antibody production Current status and future prospects. Journal of Immunological Methods* vol. 100 (1987).
61. Walker, J. M. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™ Series Editor.* <http://www.springer.com/series/7651>.
62. *Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. Click here for more information or to buy the book.* www.cshlpress.org (2012).
63. Tiller, T. *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* **329**, 112–124 (2008).
64. Tiller, T. *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* **329**, 112–124 (2008).
65. Hatzi, K. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia immunoglobulins display bacterial reactivity that converges and diverges from auto-/poly-reactivity and IGHV mutation status. *Clinical Immunology* **172**, 44–51 (2016).
66. Kostareli, E. *et al.* Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia* **23**, 919–924 (2009).
67. Mockridge, C. I. *et al.* Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection. *Autoimmunity* **37**, 9–15 (2004).
68. Winkler, T. H., Jahn, S. & Kalden, J. R. *IgG human monoclonal anti-DNA autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. Clin. exp. Immunol* vol. 85 (1991).
69. Silverman, G. J. *et al.* Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* **153**, 102–116 (2008).
70. Wang, X. & Xia, Y. Anti-double stranded DNA antibodies: Origin, pathogenicity, and targeted therapies. *Front Immunol* **10**, (2019).

71. Reed, J. H., Jackson, J., Christ, D. & Goodnow, C. C. Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 1255–1265 (2016).
72. Sabouri, Z. *et al.* Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, (2014).
73. Olszewski, A. J. & Castillo, J. J. Survival of patients with marginal zone lymphoma: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* **119**, 629–638 (2013).
74. Arcaini, L., Rossi, D. & Paulli, M. Review Series INDOLENT B-CELL LYMPHOMA Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. (2016) doi:10.1182/blood-2015-11.
75. Hwang, K. K. *et al.* IGHV1-69 B cell chronic lymphocytic leukemia antibodies cross-react with HIV-1 and hepatitis C virus antigens as well as intestinal commensal bacteria. *PLoS One* **9**, (2014).
76. Korona-Glowniak, I. *et al.* Bacterial colonization in patients with chronic lymphocytic leukemia and factors associated with infections and colonization. *J Clin Med* **8**, (2019).
77. Hatzi, K. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia immunoglobulins display bacterial reactivity that converges and diverges from auto-/poly-reactivity and IGHV mutation status. *Clinical Immunology* **172**, 44–51 (2016).