

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ  
ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

---

**Μελέτη των μηχανισμών ωρίμανσης συγγένειας του  
αντιγονικού υποδοχέα των Β κυττάρων στη χρόνια  
λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

**Όνοματεπώνυμο:** Μάλλου Αικατερίνη

**Πατρώνυμο:** Νικόλαος

**Τριμελής επιτροπή**

Χατζηδημητρίου Αναστασία, Διευθύντρια ερευνών INEB | ΕΚΕΤΑ  
Ψαρρά Άννα Μαρία, Αναπληρώτρια καθηγήτρια | Τμήμα Βιοχημείας  
Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής | Τμήμα Βιοχημείας



INSTITUTE OF APPLIED  
BIOSCIENCES



**CERTH**  
CENTRE FOR RESEARCH & TECHNOLOGY HELLAS



# IMMUNOGENETIC ANALYSIS IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

---

## B cell receptor affinity maturation in Chronic Lymphocytic Leukemia

**Name:** Mallou Aikaterini

**Father's name:** Nikolaos

### Advisory committee

Chatzidimitriou Anastasia, Senior Researcher, INAB|CERTH

Psarra Anna Maria, Associate Professor | Department of Biochemistry

Giakountis Antonios, Assistant Professor | Department of Biochemistry

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	8
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Ανοσοποιητικό σύστημα.....</b>	<b>9</b>
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία .....	9
1.2 Αιμοποίηση.....	10
1.3 Έμφυτη ανοσία .....	11
1.4 Προσαρμοστική ανοσία.....	11
2. Β λεμφοκύτταρα .....	13
2.1 Οντογένεση Β λεμφοκυττάρων .....	13
2.2 Βλαστικά κέντρα.....	15
2.3 Β-κυτταρικός Υποδοχέας: Δομή και σηματοδότηση.....	16
3. Ανοσοσφαιρίνες.....	17
3.1 Δομή των ανοσοσφαιρινών .....	17
3.2 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας ανοσοσφαιρινών .....	20
4. Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.....	26
4.1 Γενικές πληροφορίες.....	26
4.2 Προγνωστικοί δείκτες.....	27
4.3 Στερεοτυπία του Β-κυτταρικού Υποδοχέα στη ΧΛΛ.....	29
4.4 Ενδείξεις για <i>in vivo</i> εναλλαγή ιστύπου στη ΧΛΛ και σκοπός της μελέτης.....	30
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>32</b>
1. Ομάδα μελέτης.....	32
2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγματα περιφερικού αίματος (PBMCs).....	32
3. Απομόνωση ολικού RNA – Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός .....	34
3.1 Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου.....	34
3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός εκχυλισμένου RNA.....	34
3.3 Ποιοτικός έλεγχος του εκχυλισμένου RNA .....	35
4. Αντίστροφη μεταγραφή προς σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	36
4.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	36
4.2 Ποιοτικός έλεγχος νεοσυντιθέμενου cDNA.....	37
5. <i>In vitro</i> επαγωγή της AID σε πρωτογενή κύτταρα ασθενών ΧΛΛ .....	39
5.1 Διέγερση κυττάρων με CD40L και Ιντερλευκίνη-4.....	39
5.2 Έλεγχος επιτυχίας διέγερσης με κυτταρομετρία ροής .....	39

5.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης της AID με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).....	40
6. Ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του Β-κυτταρικού Υποδοχέα.....	42
6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	42
6.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR .....	44
7. Προετοιμασία γενετικών βιβλιοθηκών προς αλληλούχηση μεγάλης κλίμακας .....	44
7.1 Προετοιμασία άκρων .....	46
7.2 Ενσωμάτωση του προσαρμογέα της Illumina.....	46
7.3 Καθαρισμός των προϊόντων που έχουν προσλάβει τον προσαρμογέα .....	47
7.4 Προσθήκη μοριακών δεικτών και εμπλουτισμός των βιβλιοθηκών με PCR .....	48
7.5 Καθαρισμός της αντίδρασης PCR.....	48
8. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών .....	49
9. Παρασκευή ισομοριακού μίγματος και ποσοτικοποίηση με qPCR.....	49
9.1 Ποσοτικοποίηση με qRT-PCR .....	50
9.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR .....	51
10. Αλληλούχηση μεγάλης κλίμακας .....	52
11. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	52
11.1 Ποιοτικός έλεγχος και σύνθεση των αντιπαράλληλων reads.....	53
11.2 IMGT / High V-Quest .....	54
11.3 TRIP-tool (T cell Receptor/Immunoglobulin Profiler).....	54
11.4 IgIDivA (Immunoglobulin Intracloal Diversification Analysis) .....	55
12. Ορισμοί.....	56
13. Στατιστική ανάλυση .....	57
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	58
1. Ανοσογενετικές ενδείξεις μεγάλης κλίμακας για <i>in vivo</i> εναλλαγή ισοτύπου στη ΧΛΛ .....	58
1.1 Διαφορετικά πρότυπα έκφρασης εναλλακτικών Ig-μεταγράφων μεταξύ ασθενών Α-ΧΛΛ/Μ-ΧΛΛ.....	58
1.2 Ασθενείς που εκφράζουν γονίδια των υποομάδων IGHV1/5/7 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα εναλλακτικών μεταγράφων .....	61
1.3 Ασθενείς που ανήκουν στα υποσύνολα #1, #99 παρουσιάζουν εντονότερα φαινόμενο <i>in vivo</i> εναλλαγής ισοτύπου.....	62
2. Επαγωγή έκφρασης AID σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας .....	63
2.1 Η διέγερση κυττάρων ΧΛΛ μέσω του υποδοχέα CD40 οδηγεί σε ενεργοποίηση των ΧΛΛ κυττάρων.....	63
2.2 Η έκφραση της AID, παρουσιάζει διαφορές στις ομάδες ασθενών μετά από διέγερση με CD40L και IL-4 σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια .....	64

3. Τα εναλλακτικά μετάγραφα παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα ενδοκλωνικής ετερογένειας.....	66
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), σε συνεργασία με το τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Αναστασία Χατζηδημητρίου, διευθύντρια ερευνών του INEB|ΕΚΕΤΑ, και επιβλέπουσα της εργασίας, καθώς και τον κ. Κώστα Σταματόπουλο, διευθυντή του INEB|ΕΚΕΤΑ για την ευκαιρία που μου προσέφεραν να εκπονήσω την εργασία μου στο INEB, αλλά και για την υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ακόμη, ευχαριστώ την κ. Άννα Μαρία Ψαρρά, αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για τη συμμετοχή της στη συνεπίβλεψη της εργασίας αλλά και τον κ. Αντώνιο Γιακουντή, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Ηλέκτρα Σοφού, η συμβολή της οποίας ήταν καταλυτική για την εκπαίδευση μου και την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Το ενδιαφέρον της, η πολύπλευρη στήριξη της, αλλά και η ενεργή συμμετοχή της αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της εργασίας μου και την ευχαριστώ ιδιαιτέρως για αυτό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλα τα μέλη του INEB|ΕΚΕΤΑ για τη εξαιρετική συνεργασία, τις γνώσεις και την εμπειρία που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστώ τον κ. Κώστα Πασέντση, τεχνικό επιστήμονα του INEB|ΕΚΕΤΑ, για τη συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, αλλά και την Αντωνιάδου Αντιγόνη για την πολύτιμη βοήθειά της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω σε όλους του ανθρώπους που είναι δίπλα μου και κυρίως στην οικογένειά μου για την αμέριστη αγάπη, την πολύπλευρη στήριξη και αλλά και τη συνεχή ενθάρρυνσή τους, σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, και όχι μόνο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο δυτικό ημισφαίριο και χαρακτηρίζεται από μεγάλη βιολογική και κλινική ετερογένεια. Όσον αφορά στην παθογένεση αλλά και την κλωνική εξέλιξη της ΧΛΛ, έχει βρεθεί πως η δομή του Β κυτταρικού υποδοχέα (ΒκΥ) αποτελεί σημαντικό μοριακό δείκτη, αφού με βάση το φορτίο της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ) στη μεταβλητή περιοχή οι ασθενείς μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες, την αμετάλλακτη ΧΛΛ (Α-ΧΛΛ) και τη μεταλλαγμένη ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ) με διακριτά πρότυπα κλινικής συμπεριφοράς και πρόγνωσης. Ακόμη, η ανακάλυψη του φαινομένου της στερεοτυπίας του ΒκΥ ανέδειξε ακόμα περισσότερο τη σημαντικότητα αυτή της δομής της μεμβρανικής ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ, αφού 41% ασθενών με ΧΛΛ μπορούν να ταξινομηθούν σε στερεότυπα υποσύνολα με βάση τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά τους, βελτιώνοντας έτσι την ικανότητα πρόγνωσης, καθώς ασθενείς που ανήκουν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο παρουσιάζουν όμοιο γενετικό και κλινικό υπόβαθρο.

Σε αυτό το πλαίσιο, οι μηχανισμοί ωρίμανσης συγγένειας δεδομένης της συμβολής τους στη διαμόρφωση της δομής του ΒκΥ αξίζει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βάθος, ιδιαίτερα υπό το πρίσμα της παθογένεσης της ΧΛΛ. Έτσι, στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μία μεθοδολογία αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με ΧΛΛ με σκοπό να εξεταστεί λεπτομερώς τόσο η ΣΥΜ όσο και τα φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου που έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν στη ΧΛΛ, αλλά έχουν μελετηθεί πολύ πιο περιορισμένα. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν πως οι ασθενείς των δύο μεγάλων ομάδων Α-ΧΛΛ, Μ-ΧΛΛ παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου και ενδοκλωνικής ετερογένειας μεταξύ των μεταγράφων μ, γ, α με σημαντικές οντογενετικές προεκτάσεις ιδιαίτερα αναφορικά με το χρονικό πλαίσιο που λαμβάνουν χώρα οι διαφορετικοί μηχανισμοί ωρίμανσης συγγένειας.

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the West and is characterized by great biological and clinical heterogeneity. Regarding the pathogenesis, as well as the clonal evolution of CLL, multiple reports have documented the significance of the structure of the B cell receptor Immunoglobulin (BcR IG). That said, one of the most pivotal findings in CLL research has been the discovery that the status of somatic hypermutation (SHM) in the variable region (98% germline identity threshold) can be used to classify patients into two major subgroups, namely unmutated CLL (U-CLL) and mutated CLL (M-CLL), with distinctive patterns of clinical behavior and prognosis. Additionally, the discovery of B cell receptor stereotypy in CLL, further highlighted the importance of the BcR IG structure, since 41% of patients with CLL can be classified into smaller groups (stereotyped subsets) based on their immunogenetic characteristics. Along these lines, this phenomenon has led to significant improvement of the prognostic ability, since patients assigned to the same subset, present with a similar biological and clinical profile.

In this context, the mechanisms of affinity maturation of the BcR IG, considering their involvement in the shaping of the BCR structure are worth of further exploration, especially in the context of CLL ontogeny. That said, in the present study we applied Next Generation Sequencing (NGS) to CLL patients in order to examine in detail both SHM and *in vivo* Class Switching events which have previously been observed in CLL but had been much less studied. The results of the study show that patients of the two major groups U-CLL, M-CLL present different patterns of *in vivo* class switching and intraclonal diversification between the  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  transcripts with significant ontogenetic implications, especially regarding the time frame in which the two different mechanisms take place.



# A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Ανοσοποιητικό σύστημα

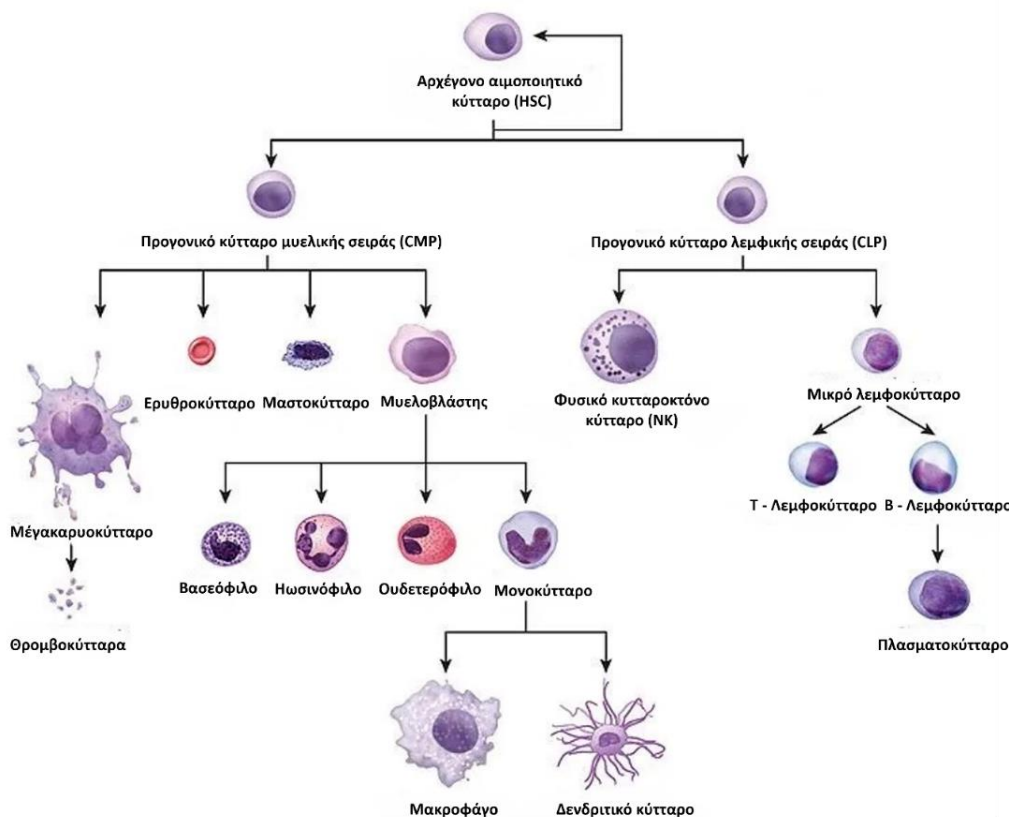
### 1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα υψηλά οργανωμένο σύστημα ιστών και οργάνων που μεσολαβεί της προστασίας των πολυκύτταρων οργανισμών από παθογόνα, με τη βοήθεια κυττάρων και μορίων που δρουν παράλληλα και συνεργατικά. Αυτά έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν και να εξουδετερώνουν ξένους εισβολείς με στόχο την προστασία του οργανισμού και τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Το ανοσοποιητικό σύστημα προστατεύει τον οργανισμό τόσο από εξωγενείς, δυνητικά επιβλαβείς παράγοντες, όπως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, όσο και από ενδογενείς, όπως παθολογικά κύτταρα (νεοπλασματικά) ή κύτταρα που αποπίπτουν.<sup>1</sup>

Ως αντιγόνο ορίζεται κάθε μόριο ή συστατικό των ενδογενών και εξωγενών, αυτών παραγόντων, που μπορεί να επάγει άνοση απάντηση, δηλαδή την αναγνώριση ενός κινδύνου και την απόκριση του οργανισμού, ώστε ο εκάστοτε κίνδυνος να αντιμετωπιστεί.<sup>1</sup> Υπάρχουν δύο κατηγορίες άνοσων απαντήσεων, αυτές που ανήκουν στην έμφυτη και αυτές που ανήκουν στην προσαρμοστική άνοση. Η πρώτη αφορά στη μη ειδική γραμμή άμυνας του οργανισμού και ο βασικός της ρόλος είναι η άμεση απόκριση έναντι οποιουδήποτε παθογόνου. Η φυσική άνοση επιτελεί τις λειτουργίες της με τη συμβολή φυσικών και χημικών φραγμών αλλά και κυττάρων που αναγνωρίζουν συντηρημένες δομές πάνω στο εκάστοτε παθογόνο.<sup>1,2</sup> Αντίθετα, η προσαρμοστική άνοση αποτελεί ένα πιο εξειδικευμένο σύστημα άμυνας που συμμετέχει στη δευτερογενή απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.<sup>1</sup> Τα βασικά χαρακτηριστικά της προσαρμοστικής άνοσας είναι η εξειδίκευση έναντι σε συγκεκριμένα αντιγόνα, η μνήμη έναντι σε αυτά, καθώς και η διάκριση του «ιδίου από το μη ίδιο». Η δράση της, διαμεσολαβείται από τα Β,Τ λεμφοκύτταρα και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK cells - Natural Killer cells).<sup>1,2</sup> Η παραγωγή και η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων πραγματοποιούνται σε συγκεκριμένα όργανα του ανοσοποιητικού, που ονομάζονται λεμφικά, τα οποία διακρίνονται με βάση τη λειτουργία τους σε δύο κατηγορίες, τα πρωτογενή και τα δευτερογενή. Στα μεν πρωτογενή (μυελός των οστών, θύμος αδένας, εμβρυϊκό ήπαρ), παρέχονται τα ερεθίσματα και το κατάλληλο περιβάλλον για την παραγωγή και την ωρίμανση των κυττάρων του αίματος, ενώ στα δευτερογενή, τα λεμφοκύτταρα έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο και επάγουν την άνοση απάντηση.<sup>1,3</sup> Διαταραχή σε κάποια από αυτές τις φυσιολογικές λειτουργίες μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση αυτο-άνοσων νοσημάτων ή διαφόρων νεοπλασμάτων.<sup>3</sup>

## 1.2 Αιμοποίηση

Ο όρος αιμοποίηση αναφέρεται στη διαδικασία παραγωγής και διαφοροποίησης των κυττάρων του αίματος. Ο μηχανισμός αυτός διαδραματίζεται στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, ξεκινώντας από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs).<sup>4</sup> Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα, καθώς έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης προς διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων, αλλά και πολλαπλασιασμού, όταν υπάρχει ανάγκη για αύξηση των επιπέδων τους.<sup>1,4</sup> Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης, μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε σε μυελικά προγονικά κύτταρα (Common myeloid progenitors, CMPs), είτε σε λεμφικά προγονικά κύτταρα (Common lymphoid progenitors, CLPs). Μετά από αυτό το στάδιο διαφοροποίησης, τα κύτταρα που προκύπτουν παύουν να αυτο-ανανεώνονται και η δυναμική τους περιορίζεται σημαντικά, καθώς πλέον έχουν δεσμευτεί προς συγκεκριμένη πορεία διαφοροποίησης (μυελική ή λεμφική σειρά).<sup>4,5</sup> Στη συνέχεια, τα προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς, μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα), μυελοβλάστες, μαστοκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα. Από τους μυελοβλάστες προκύπτουν τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα) και τα μονοκύτταρα, που στη συνέχεια διαφοροποιούνται προς μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Τα προγονικά κύτταρα της λεμφικής σειράς, διαφοροποιούνται, με τη σειρά τους, σε Β και Τ-λεμφοκύτταρα ή σε φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK).<sup>4,5</sup> (Εικόνα 1)



Εικόνα 1 Απεικόνιση της διαδικασίας διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

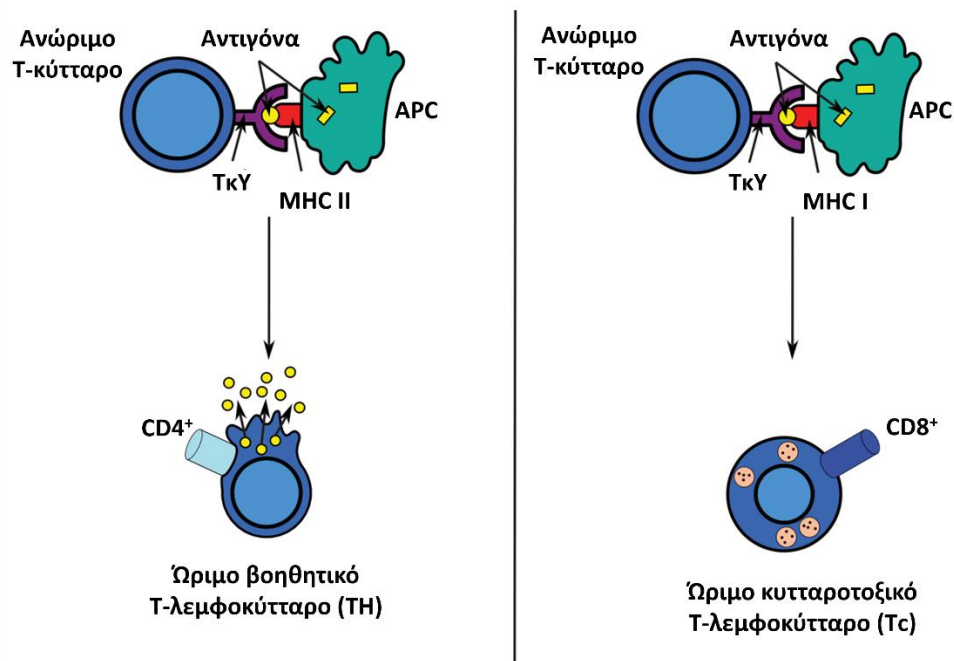
### 1.3 Έμφυτη ανοσία

Όπως προαναφέρθηκε, η έμφυτη ανοσία είναι η πρώτη και μη ειδική γραμμή άμυνας του οργανισμού. Απαρτίζεται τόσο από μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την είσοδο των παθογόνων στον οργανισμό, όσο και από μηχανισμούς που τους αντιμετωπίζουν, αν αυτοί τελικά καταφέρουν να εισέλθουν.<sup>1</sup> Η είσοδος των παθογόνων στον οργανισμό αρχικά αναχαιτίζεται από εξωτερικούς φυσικούς φραγμούς, όπως το δέρμα και οι βλεννογόνοι, οι οποίοι επενδύουν τον επιθηλιακό ιστό της αναπνευστικής οδού και του γαστρεντερικού σωλήνα.<sup>1,2</sup> Εκτός αυτών, υπάρχουν βιοχημικοί φραγμοί, όπως το υδροχλωρικό οξύ (γαστρικό υγρό στο στομάχι), το γαλακτικό οξύ (σμήγμα) αλλά και η λυσοζύμη (ένζυμο με αντιμικροβιακές ιδιότητες που βρίσκεται στη σίελο και στα δάκρυα).<sup>1,2</sup> Ωστόσο, αν ένα παθογόνο περάσει τους φραγμούς αυτούς, ενεργοποιείται μια σειρά μη ειδικών άνοσων απαντήσεων για την παρεμπόδιση της εγκατάστασης του παθογόνου στον οργανισμό. Η δράση τους επιτελείται μέσω αναγνώρισης συντηρημένων μοτίβων στα παθογόνα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό ρεπερτόριο υποδοχέων, που ονομάζονται «υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων» (Pattern Recognition Receptors, PRRs)<sup>6</sup>, οι οποίοι αναγνωρίζουν ειδικές, συντηρημένες μοριακές δομές, γνωστές ως «Μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα» (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs)<sup>7</sup>. Τα μοριακά πρότυπα αυτά μπορεί να είναι γλυκάνες, λιποπολυσακχαρίτες ή και υδατάνθρακες. Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου μπορεί να είναι είτε οι υποδοχείς τύπου Nod (Nod like Receptors, NLRs)<sup>8</sup> ή και οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll like Receptors, TLRs),<sup>9</sup> οι οποίοι εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα φαγοκύτταρα. Έτσι, τα φαγοκύτταρα μπορούν και μέσω των TLRs αναγνωρίζουν παθογόνα, τα εγκολπώνουν, και τα αποδομούν.<sup>1</sup>

### 1.4 Προσαρμοστική ανοσία

Η προσαρμοστική ανοσία αποτελεί τη δεύτερη και πιο εξειδικευμένη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι στους παθογόνους εισβολείς.<sup>1</sup> Η προσαρμοστική ανοσία βασίζεται στη δράση Β και Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία μπορούν και αναγνωρίζουν αντιγόνα, καθώς εκφράζουν στην επιφάνειά τους ειδικούς αντιγονικούς υποδοχείς, που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία<sup>1</sup> (Οι υποδοχείς αυτοί, αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές του αντιγόνου, που ονομάζονται αντιγονικοί επίτοποι). Έτσι, μπορούν και αναγνωρίζουν, αντίστοιχα τεράστια ποικιλία αντιγονικών επιτόπων, επιτρέποντας ακόμα και τον διαχωρισμό αντιγόνων, σημαντικά όμοιων μεταξύ τους. Πέρα από την εξειδίκευση, ένα ακόμα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της προσαρμοστικής ανοσίας, είναι η μνήμη, η οποία προσφέρει τη δυνατότητα άμεσης απόκρισης του οργανισμού, εάν αυτός συναντήσει το ίδιο αντιγόνο δεύτερη φορά.<sup>1</sup> Επιπλέον, τα λεμφοκύτταρα, μπορούν να διακρίνουν τα αυτό-αντιγόνα από τα ξένα και να επιλέγουν να απαντούν μόνο στα δεύτερα.<sup>1,10</sup> Η προσαρμοστική ανοσία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο επιμέρους κλάδους, την κυτταρική και τη χυμική.

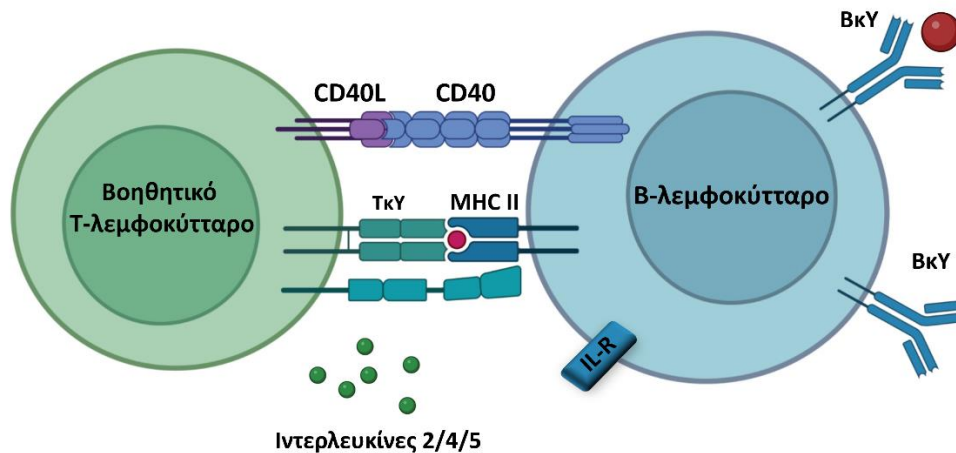
Η κυτταρική ανοσία διαμεσολαβείται από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Η αναγνώριση ενός αντιγόνου από τον Τ-κυτταρικό υποδοχέα (ΤκΥ) δεν γίνεται απευθείας, αλλά με τη βοήθεια κυττάρων (μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα). Τα κύτταρα αυτά, ονομάζονται αντιγονοπαρουσιαστικά (Antigen Presenting cells, APCs) και δρουν εγκολπώνοντας τα αντιγόνα και παρουσιάζοντας μέρος αυτών στα Τ-λεμφοκύτταρα, μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC)<sup>11</sup>. Τα Τ-λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T-Helper, T<sub>H</sub>) και σε κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (T-Cytotoxic, T<sub>c</sub>). Υπάρχουν δύο τάξεις μορίων MHC (MHC τάξης I, MHC τάξης II), τα οποία πλαισιώνουν τα αντιγόνα, ώστε να παρουσιαστούν από τα APCs στα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα που πλαισιώνονται από MHC τάξης II, ενώ τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα που συνοδεύονται από MHC τάξης I (Εικόνα 2). Έτσι, κατά την κυτταρική άνοση απάντηση, τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τον ΤκΥ του βοηθητικού Τ-κυττάρου επάγουν την ενεργοποίησή του, πυροδοτώντας έτσι την έκκριση κυτταροκινών που υποβοηθούν την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, αλλά και των κυτταροτοξικών Τ-κυττάρων, τα οποία αναπτύσσουν κυτταροτοξική δράση έναντι παθογόνων (και όχι μόνο).<sup>1,10</sup>



Εικόνα 2 Απεικόνιση παρουσίασης αντιγόνου στα Τ κύτταρα από τα APCs, μέσω των MHCs, για ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων

Η χυμική ανοσία μεσολαβείται από τα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία αλληλεπιδρούν απευθείας με τα αντιγόνα, ύστερα από αναγνώρισή τους μέσω του ΒκΥ, ο οποίος εκφράζεται επιφανειακά. Τα Β-λεμφοκύτταρα, αφού αναγνωρίσουν και αλληλεπιδράσουν με το αντιγόνο, διαφοροποιούνται με τη συμβολή και των κυτταροκινών από τα βοηθητικά Τ, σε πλασματοκύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα, παράγουν αντισώματα, εξειδικευμένα για το εκάστοτε αντιγόνο. Έτσι, μετά τη σύνδεση του αντιγόνου με τον ΒκΥ, το αντιγόνο ενδοκυτταρώνεται, υφίσταται πρωτεόλυση και παρουσιάζεται στα Τ μέσω των MHC.<sup>1,10</sup> (Εικόνα 3) Τέλος, από τη διαφοροποίηση τόσο των Τ όσο και των Β λεμφοκυττάρων, προκύπτουν και Β και Τ

κύτταρα μνήμης<sup>12,13</sup>, τα οποία εξασφαλίζουν την «ετοιμότητα» του οργανισμού στην περίπτωση επαναλοίμωξης από το ίδιο παθογόνο.<sup>1,10,13</sup>



Εικόνα 3 Απεικόνιση ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων, μέσω T-βοηθητικών κυττάρων, μέσω έκκρισης ιντερλευκινών και αλληλεπίδρασης CD40-CD40L ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

## 2. Β λεμφοκύτταρα

### 2.1 Οντογένεση Β λεμφοκυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε, τα Β λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται στο μυελό των οστών από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) και στη συνέχεια ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται περαιτέρω στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, ως απόκριση στη παρουσία αντιγόνου(Εικόνα 4)<sup>1</sup> Η διαδικασία αυτή μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτές φάσεις, την ανεξάρτητη και την εξαρτώμενη από το αντιγόνο. Παρότι τα Β-λεμφοκύτταρα διαθέτουν στο γονιδίωμά τους δύο αλληλόμορφα τόσο για τους γενετικούς τόπους της βαριάς όσο και των ελαφριών αλυσίδων, τελικά προκύπτει ένα μοναδικό μόριο ανοσοσφαιρίνης, χάρη στη διαδικασία αποκλεισμού αλληλομόρφου (allelic exclusion). Εξαιτίας του φαινομένου αυτού, αν πραγματοποιηθεί ο ανασυνδυασμός του ενός αλληλομόρφου, και προκύψει παραγωγική αναδιάταξη, τότε το προϊόν οδηγεί σε αναστολή του ανασυνδυασμού στο άλλο. Ιεραρχικά, πρώτα συμβαίνει ο ανασυνδυασμός στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας και ακολουθεί ανασυνδυασμός στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων.

### Φάση διαφοροποίησης ανεξάρτητη από το αντιγόνο

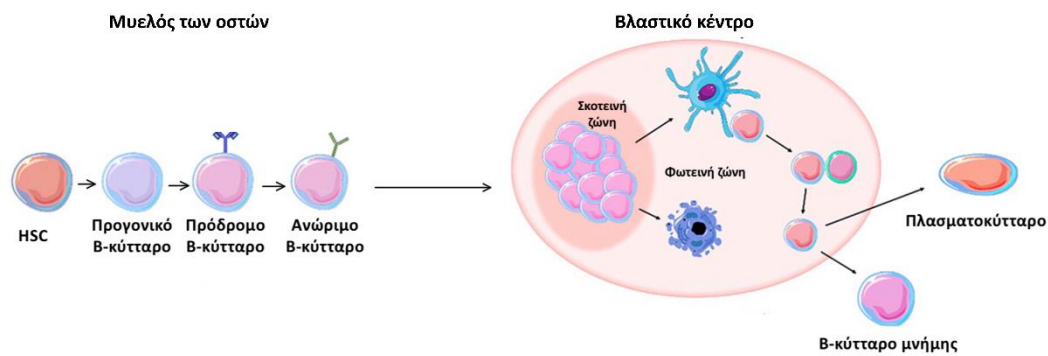
Από ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο προκύπτει ένα πολυδύναμο προγονικό κύτταρο, το οποίο στη συνέχεια διαφοροποιείται στον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (Common Lymphoid Progenitor, CLP). Στο στάδιο αυτό ξεκινά ο ανασυνδυασμός στο

γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας. Αρχικά, γίνεται η διαφοροποίηση του CLP σε πρώιμο προ-προ Β-λεμφοκύτταρο, κατά την οποία γίνεται ο ανασυνδυασμός των γονιδίων IGHD και IGHJ. Στη συνέχεια συμβαίνει η αναδιάταξη ενός γονιδίου IGHV με το σύμπλοκο IGHD-IGHJ, η οποία σηματοδοτεί τη διαφοροποίηση προς όψιμο προ-προ Β-λεμφοκύτταρο.<sup>1,14</sup> Εφόσον η αναδιάταξη που προκύπτει είναι παραγωγική, το κύτταρο μεταβαίνει στο στάδιο του μεγάλου προ-Β-λεμφοκυττάρου, το οποίο χαρακτηρίζει η επιφανειακή έκφραση του οικουμενικού δείκτη CD19<sup>15</sup>. Στο στάδιο αυτό εκφράζεται ένας πρώιμος ΒκΥ, (προ-ΒκΥ), ο οποίος αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα που παράχθηκε, και μία «υποκατάστατη» ελαφριά αλυσίδα (Surrogate Light Chain, SLC). Τα κύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα αυτό, διαφοροποιούνται προς μικρά προ-Β-λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί η αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας. Αρχικά, γίνεται ανασυνδυασμός στο γενετικό τόπο της κ αλυσίδας και αν δεν προκύψει παραγωγική αναδιάταξη, επιχειρείται ο ανασυνδυασμός στη λ. Όποια παραγωγική αναδιάταξη προκύψει, συνδέεται με την αναδιάταξη της βαριάς αλυσίδας και το σύμπλοκο που προκύπτει αποτελεί τον ΒκΥ, γεγονός που οδηγεί στο επόμενο στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου, το ανώριμο Β λεμφοκύτταρο.<sup>1</sup> Τα περισσότερα από τα ανώριμα Β κύτταρα που έχουν προκύψει, δεν μπορούν να διαχωρίσουν τα αυτοαντιγόνα. Για το λόγο αυτό πρέπει να αναπτύξουν αυτοανοχή, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω τριών διαφορετικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί εξασφαλίζουν ότι τα ανώριμα Β κύτταρα που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα που υπάρχουν σε μεγάλη συγκέντρωση στο μυελό, θα αποπίπτουν (εξάλειψη κλώνων, clonal deletion)<sup>16</sup>, ότι θα γίνουν νέοι ανασυνδυασμοί με αποτέλεσμα να προκύψει διαφορετικός ΒκΥ (διόρθωση υποδοχέα, receptor editing)<sup>17,18</sup> και ότι όσα Β κύτταρα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα με χαμηλή συγγένεια θα καθίστανται ανίκανα να ανταποκρίνονται (ανέργια, anergy)<sup>19</sup>. Από τη στιγμή που ολοκληρωθεί και η διαδικασία αυτή, τα κύτταρα εγκαταλείπουν τον μυελό και περνούν μέσω της κυκλοφορίας στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, ως παρθένα Β κύτταρα.

### Φάση διαφοροποίησης εξαρτώμενη από το αντιγόνο

Αν τα Β λεμφοκύτταρα έρθουν σε επαφή με κάποιο αντιγόνο, και παράλληλα λάβουν τα κατάλληλα σήματα από το μικροπεριβάλλον ενεργοποιούνται, διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν ειδικές δομές, τα βλαστικά κέντρα<sup>1</sup>.

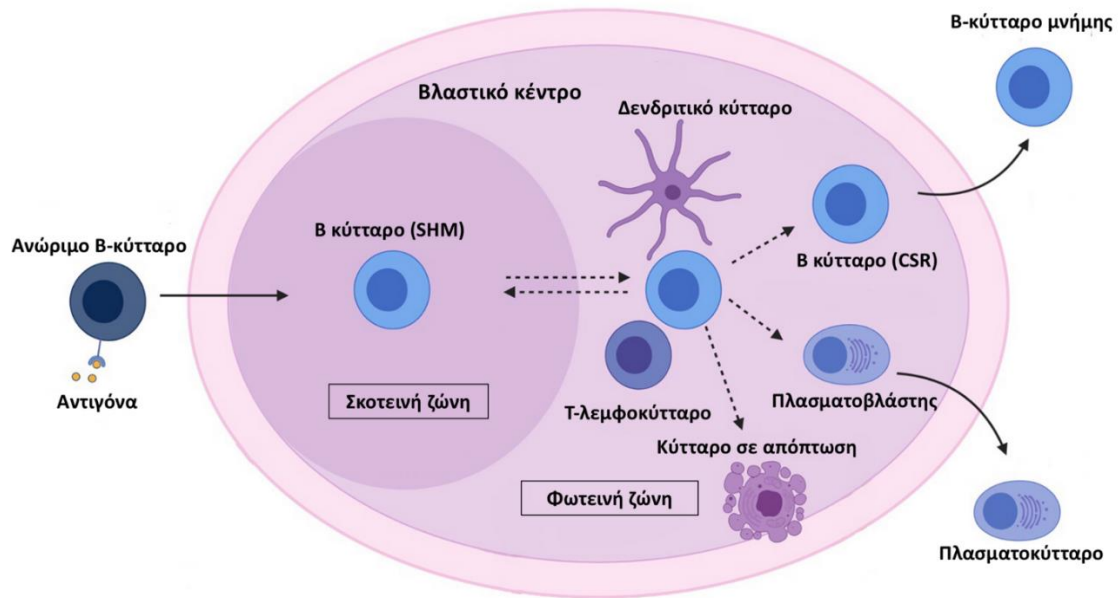




Εικόνα 4 Διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης Β-λεμφοκυττάρων (Τροποποιημένη από 'The role of B-cells in Adult and Paediatric Liver injury', Arzoo M., et al, *Frontiers Immunology*)

## 2.2 Βλαστικά κέντρα

Τα βλαστικά κέντρα αποτελούν μία προσωρινή δομή στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, η οποία δημιουργείται 7-10 μέρες μετά από την έκθεση σε κάποιο αντιγόνο και προσφέρει το κατάλληλο περιβάλλον για την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων.<sup>20,21</sup> Τα βλαστικά κέντρα αποτελούνται από δύο πόλους, τη σκοτεινή και τη φωτεινή ζώνη, σε κάθε μία από τις οποίες συντελούνται διακριτές διεργασίες (Εικόνα 5). Από τη στιγμή που διεγερθούν τα Β-λεμφοκύτταρα από ένα αντιγόνο, μεταναστεύουν στα βλαστικά κέντρα. Στη σκοτεινή ζώνη διαφοροποιούνται σε κεντροβλάστες, υφίστανται πολλαπλές κυτταρικές διαιρέσεις και σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, δηλαδή εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχών των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Όταν ολοκληρωθεί η κυτταρική διαίρεση των κεντροβλαστών, μεταναστεύουν στη φωτεινή ζώνη όπου έρχονται σε επαφή με δενδριτικά και T<sub>H</sub> κύτταρα. Τα κύτταρα εκείνα που εκφράζουν μεμβρανικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο επιλέγονται έναντι των υπολοίπων.<sup>20,22,23</sup> Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία ωρίμανσης πραγματοποιούνται διαδοχικοί κύκλοι εναλλαγής μεταξύ σκοτεινής και φωτεινής ζώνης ώστε τελικά να μπορέσουν να αποκτήσουν υποδοχείς υψηλά διαφοροποιημένους και με μεγάλη συγγένεια για το αντιγόνο.<sup>24-27</sup> Μετά το πέρας και της διαδικασίας αυτής, τα κύτταρα που επιλέχτηκαν από το έλεγχο συγγένειας εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο, ενώ τα υπόλοιπα αποπίπτουν.



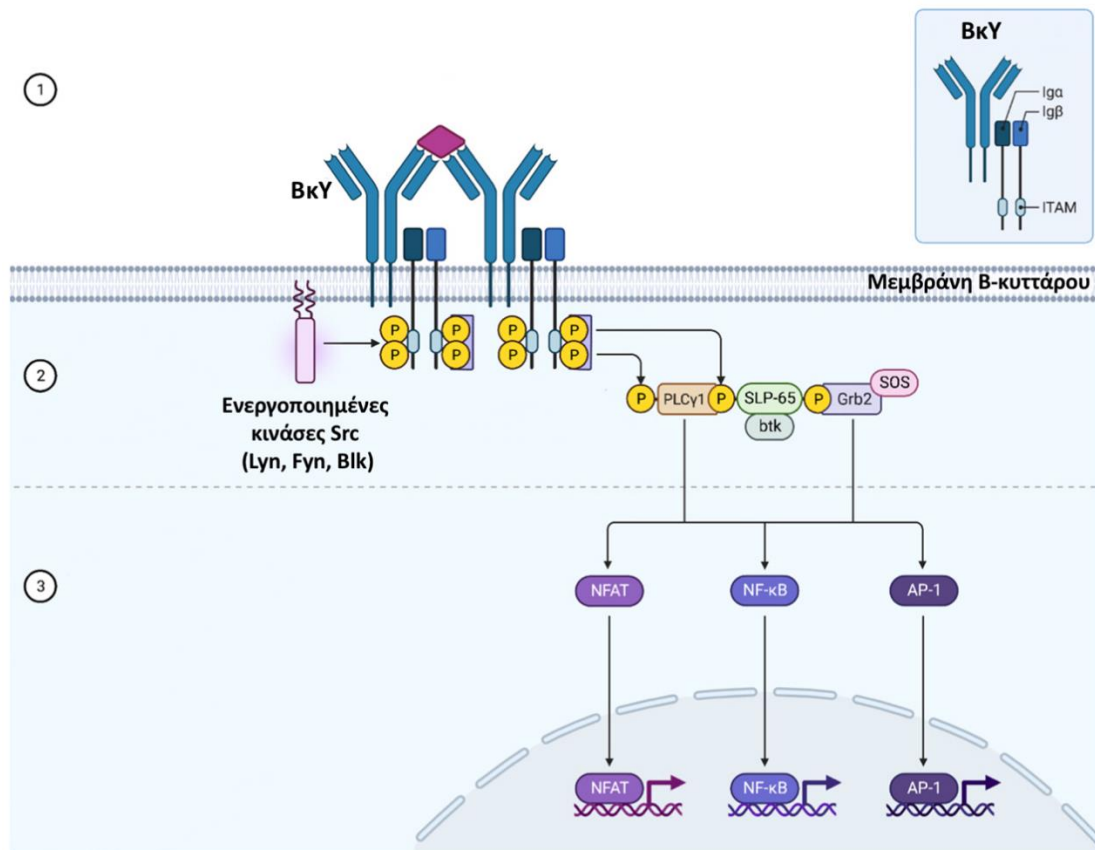
Εικόνα 5 Απεικόνιση της δομής του θλαστικού κέντρου, καθώς και των διεργασιών που διαδραματίζονται σε αυτό ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

### 2.3 Β-κυτταρικός Υποδοχέας: Δομή και σηματοδότηση

Σημαντικό χαρακτηριστικό των Β λεμφοκυττάρων είναι η έκφραση ενός υποδοχέα αντιγονικής αναγνώρισης. Ο αντιγονικός αυτός υποδοχέας των Β λεμφοκυττάρων, η αλλιώς 'Β κυτταρικός υποδοχέας' (ΒκΥ) είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο στη μεμβράνη των Β λεμφοκυττάρων, που αποτελείται από ένα μόριο μεμβρανικής ανοσοσφαιρίνης συνοδευόμενο από τους συνυποδοχείς Igα, Igβ, που παίζουν σημαντικό ρόλο για την έκφραση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια και τη μεταγωγή του σήματος.<sup>1</sup> Οι δύο αυτές διακριτές μονάδες που συνιστούν το σύμπλοκο του ΒκΥ έχουν και διαφορετικό ρόλο. Από τη μία η ανοσοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση του αντιγόνου, ενώ το ετεροδιμερές Igα-Igβ, που δεν έχει καμία εξειδίκευση όσον αφορά το αντιγόνο, είναι υπεύθυνο για τη μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου, προς ενεργοποίησή του.<sup>1,28</sup> Τη λειτουργία αυτή, την επιτελούν χάρη σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία που διαθέτουν στην άκρη κάθε μίας εκ των δύο κυτταροπλασματικών ουρών, η οποία ονομάζεται μοτίβο ενεργοποίησης του ανοσοϋποδοχέα (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM)<sup>29</sup>. Στο μοτίβο αυτό, κομβικό ρόλο έχει ένα κατάλοιπο τυροσίνης, του οποίου η φωσφορυλίωση πυροδοτεί την εκκίνηση πληθώρας μονοπατιών σηματοδότησης μέσω του ΒκΥ (Εικόνα 6).<sup>30</sup> Συνοπτικά, μετά την πρόσδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα, επάγεται η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης των ITAMs από πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinases, PTKs), όπως Lyn, Blk, Lck, κ.α., με στόχο τη δημιουργία θέσεων πρόσδεσης για τη κινάση Syk (Spleen Tyrosine Kinase)<sup>31</sup>. Η κινάση Syk με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη BLNK (B cell Linker protein), η οποία αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί την κινάση BTK, η οποία, επίσης, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την φωσφολιπάση γ (PLCγ). Το αποτέλεσμα



είναι να αυξηθεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>) και διακυλογλυκερόλης (DAG), και ιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>), μόρια-διαμεσολαβητές, τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση άλλων κινάσων και μεταγραφικών παραγόντων προς επιμέρους μονοπάτια σηματοδότησης, με τελικό στόχο τη διαφοροποίηση του Β-κυττάρου (Εικόνα 6). Πιθανές παρεκκλίσεις από το φυσιολογικό πρότυπο σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσουν σε αιματολογικές κακοήθειες για αυτό και μόρια των μονοπατιών αυτών αποτελούν στόχους θεραπείας για πολλές από τις ασθένειες αυτές.<sup>32,33</sup>



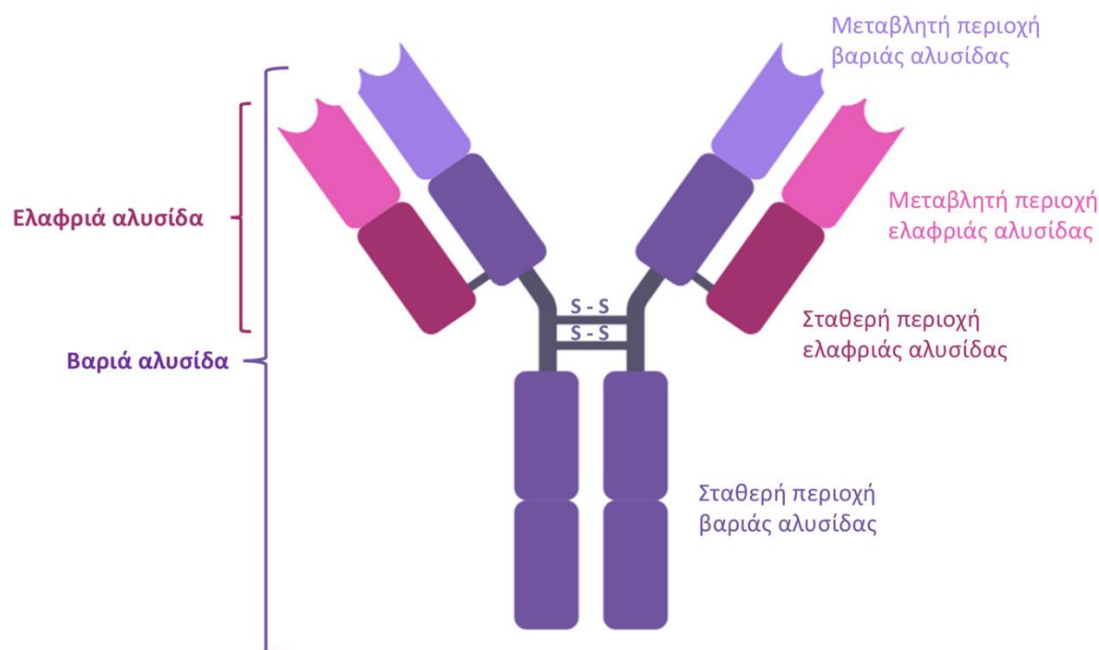
Εικόνα 6 Απεικόνιση μονοπατιού σηματοδότησης ΒκΥ (www.biorender.com)

### 3. Ανοσοσφαιρίνες

#### 3.1 Δομή των ανοσοσφαιρινών

Ως ανοσοσφαιρίνες ορίζονται γλυκοπρωτεϊνικά μόρια που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και απαντώνται σε δύο μορφές, είτε ως μεμβρανικά (ανοσοσφαιρίνη του ΒκΥ), είτε ως διαλυτά, εκκρινόμενα μόρια (αντισώματα).<sup>1</sup> Και στις δύο περιπτώσεις, η δομή τους είναι χαρακτηριστική (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο ζεύγη όμοιων μεταξύ τους, πολυπεπτιδικών αλυσίδων, τις βαριές (heavy, H) και τις ελαφριές (light, L). Η σύζευξη μεταξύ των

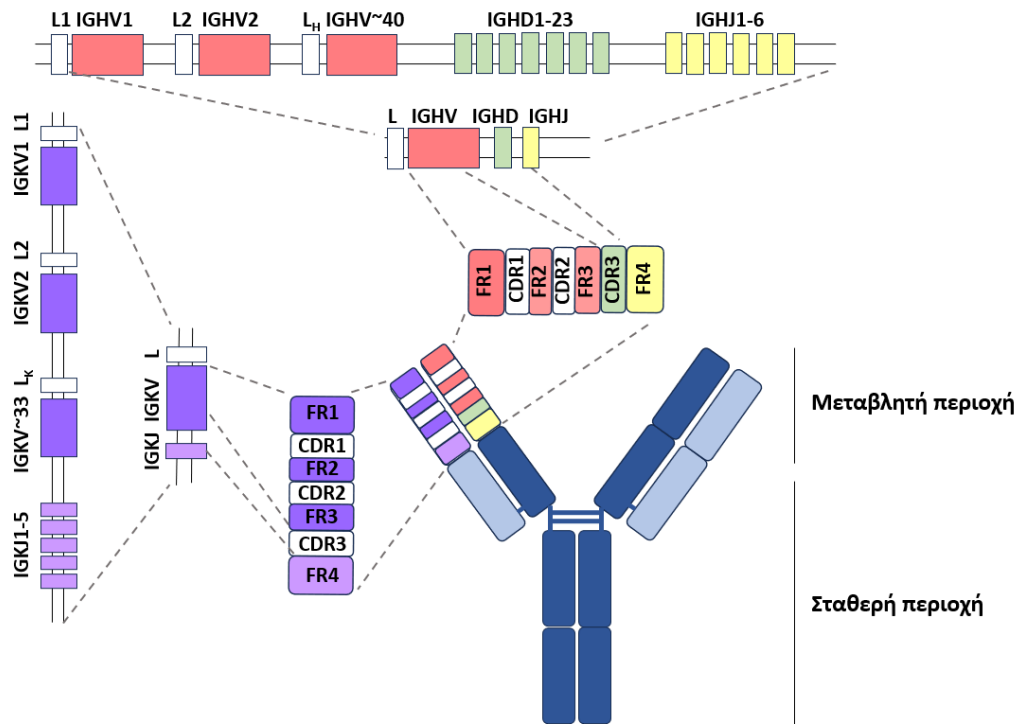
αλυσίδων γίνεται με το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών.<sup>1,34</sup> Κάθε μία από τις αλυσίδες διαθέτει μία σταθερή και μία μεταβλητή περιοχή. Στο αμινοτελικό άκρο τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας υπάρχει η μεταβλητή περιοχή, η οποία σχετίζεται με την αντιγονική αναγνώριση, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο απαντάται η σταθερή περιοχή των αλυσίδων, η οποία αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη δομή, που καθορίζει την τάξη και τις δραστικές λειτουργίες του εκάστοτε αντισώματος (Εικόνα 7).<sup>1,34</sup>



Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση δομής ανοσοσφαιρίνης ([www.biorender.com](http://www.biorender.com))

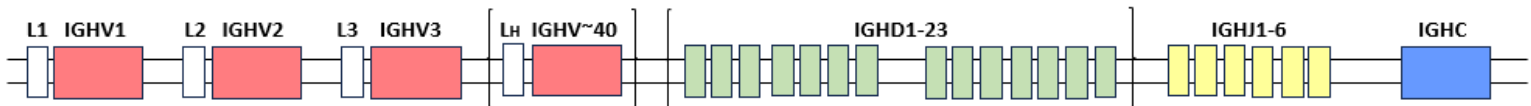
### 3.1.1 Βαριές αλυσίδες ανοσοσφαιρινών

Όπως προαναφέρθηκε, οι βαριές αλυσίδες διαθέτουν μία μεταβλητή και μία σταθερή περιοχή στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα. Η μεταβλητή περιοχή χωρίζεται σε επτά επιμέρους περιοχές. Οι τρεις από αυτές είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με το αντιγόνο και χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη ποικιλομορφία. Ονομάζονται περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (complementary determining regions, CDR1-3), με την τρίτη (VH CDR3) να παρουσιάζει την υψηλότερη μεταβλητότητα. Εκατέρωθεν κάθε μιας από τις τρεις αυτές περιοχές υπάρχουν οι τέσσερις περιοχές πλαισίου (Framework Regions, FR1-4), οι οποίες σε αντίθεση με τις περιοχές CDR, είναι αρκετά συντηρημένες, ώστε να διατηρείται η δομή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης (Εικόνα 8).<sup>1</sup>



Εικόνα 8 Δομή ανοσοσφαιρίνης, όπου απεικονίζονται οι περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας, οι περιοχές πλακίσου και οι θέσεις αυτών στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς και της κ ελαφριάς αλυσίδας

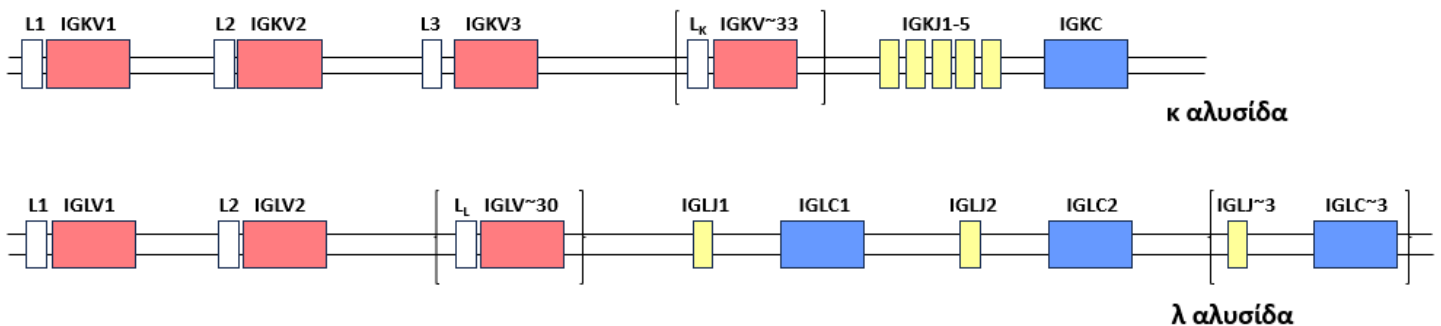
Τόσο η σταθερή, όσο και η μεταβλητή περιοχή κωδικοποιούνται από ομάδες γονιδίων, τα οποία απαντώνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι βαριές αλυσίδες κωδικοποιούνται από 4 ειδών γονίδια, τα IGHV (Variable), IGHD (Diversity), IGJ (Joining) και IGHC (Constant), οι γενετικοί τύποι των οποίων εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 14 (Εικόνα 9).<sup>35,36</sup> Στα γονίδια IGHV συγκαταλέγονται 44 λειτουργικά γονίδια, τα οποία ταξινομούνται σε 7 υποομάδες (IGHV1-7) και 3 φυλογενετικές ομάδες (Φυλογενετική ομάδα 1: γονίδια IGHV1/5/7, Φυλογενετική ομάδα 2: γονίδια IGHV2/4/6, Φυλογενετική ομάδα 3: γονίδια IGHV3). Τα γονίδια IGHD είναι 27, 23 εκ των οποίων είναι τα λειτουργικά και χωρίζονται και αυτά σε 7 υποομάδες (IGHD1-7). Η ομάδα των γονιδίων IGJ περιλαμβάνει μόλις 6 λειτουργικά γονίδια. Αναδιατάξεις των 3 αυτών γονιδίων δίνουν τη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Πρώτα γίνεται ο ανασυνδυασμός γονιδίων IGHD και IGJ και στη συνέχεια, ακολουθεί και ο ανασυνδυασμός και με το γονίδιο IGHV.<sup>1</sup> Για τη σταθερή περιοχή, που κωδικοποιείται από τα γονίδια IGHC, υπάρχουν 11 λειτουργικά γονίδια, ανάλογα με την έκφραση των οποίων μπορούν να προκύψουν 5 διαφορετικοί ισότυποι ανοσοσφαιρινών (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD).<sup>1</sup>



Εικόνα 9 Διάταξη γονιδίων ανοσοσφαιρινών στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας

### 3.1.2 Ελαφριές αλυσίδες ανοσοσφαιρινών

Όπως και στις βαριές, έτσι και στις ελαφριές αλυσίδες υπάρχει η σταθερή και η μεταβλητή περιοχή, με τη δεύτερη να χωρίζεται επίσης στις ίδιες επτά περιοχές (FR1-4/CDR1-3). Τα γονίδια, όμως που κωδικοποιούν τη μεταβλητή περιοχή, στη περίπτωση των ελαφριών αλυσίδων είναι 2 και όχι 3. Συγκεκριμένα στις ελαφριές αλυσίδες εκφράζονται μόνο τα γονίδια IGHV, IGHJ και η σταθερή περιοχή από την οικογένεια των γονιδίων IGHC (Εικόνα 10).<sup>1,37</sup>Υπάρχουν δύο είδη ελαφριών αλυσίδων, οι κάππα και οι λάμβδα, χωρίς γνωστές λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο. Τα γονίδια IGKV που κωδικοποιούν την κάππα αλυσίδα εδράζονται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 2 και χωρίζονται σε 7 υποομάδες και 3 φυλογενετικές οικογένειες, με το σύνολο των λειτουργικών γονιδίων IGKV να μην υπερβαίνει τα 36 γονίδια. Όσον αφορά τα γονίδια IGKJ, υπάρχουν 5, ενώ για τη σταθερή περιοχή, μόλις ένα λειτουργικό IGKC γονίδιο. Ο γενετικός τόπος των λάμβδα ελαφριών αλυσίδων απαντώνται στο χρωμόσωμα 22. Η συστοιχία των IGLV γονιδίων περιλαμβάνει 56-57 λειτουργικά γονίδια, τα οποία ταξινομούνται σε 11 υποομάδες και 5 φυλογενετικές οικογένειες. Τέλος, υπάρχουν 7-11 διαθέσιμα γονίδια τόσο για το γονίδιο IGLJ, όσο και για το γονίδιο IGLC.<sup>38-40</sup>



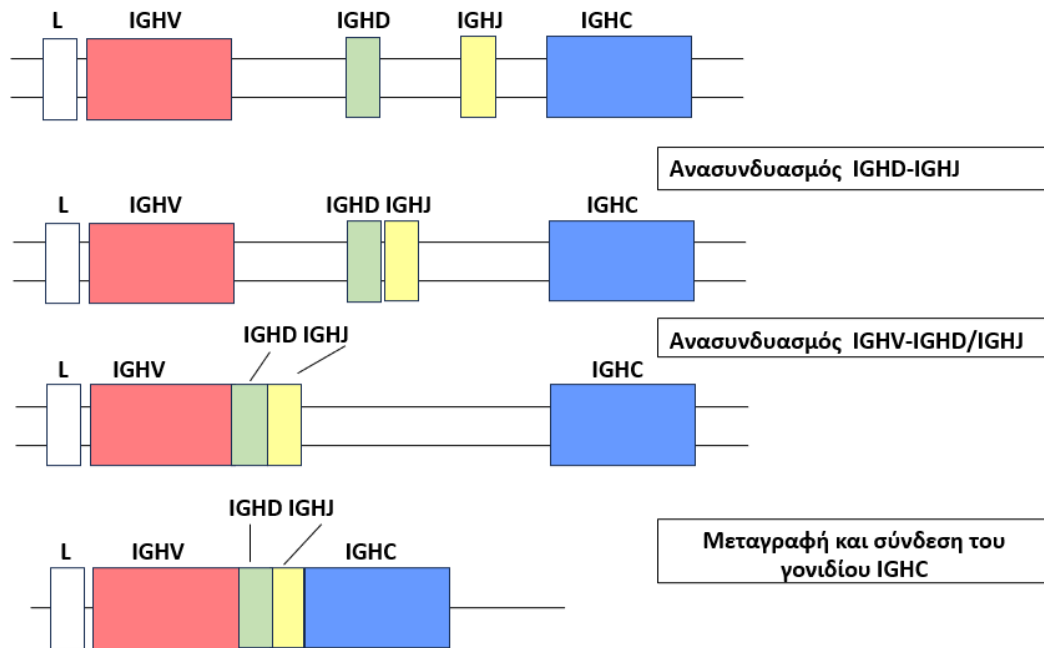
Εικόνα 10 Διάταξη γονιδίων ανοσοσφαιρινών στο γενετικό τόπο των λ και κ ελαφριών αλυσίδων

## 3.2 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας ανοσοσφαιρινών

### 3.2.1 Συνδυαστική ποικιλότητα

Το ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών οφείλεται στην ύπαρξη πληθώρας μηχανισμών που συμβάλλουν στην δημιουργία της ποικιλομορφίας τους. Αρχικά, γίνεται η αναδιάταξη των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ για τις βαριές και IGKV-IGKJ/IGLV-IGLJ για τις ελαφριές αλυσίδες, μέσω ενός υψηλά οργανωμένου μηχανισμού, που ονομάζεται 'Ανασυνδυασμός V(D)J'. Δεδομένης της μεγάλης ποικιλίας διαθέσιμων γονιδίων V(D)J, μπορούν να προκύψουν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί αναδιατάξεων (Εικόνα 11).<sup>41</sup> Όπως προαναφέρθηκε, ακολουθείται συγκεκριμένη

ιεραρχία. Στις βαριές αλυσίδες, πρώτα γίνεται ο ανασυνδυασμός ενός γονιδίου IGHD με ένα γονίδιο IGHJ και έπειτα, συνδέεται το σύμπλοκο IGHD-IGHJ με ένα γονίδιο IGHV. Στο τέλος, μετά από μεταγραφή και συρραφή του mRNA γίνεται και η σύνδεση του γονιδίου IGHC. Την ίδια πορεία ακολουθεί και ο ανασυνδυασμός στις ελαφριές αλυσίδες, με τη μόνη διαφοροποίηση ότι δημιουργείται εξαρχής σύμπλοκο IGKV-IGKJ/IGLV-IGLJ.



Εικόνα 11 Αναπαράσταση της αναδιάταξης των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ-IGHC στις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών

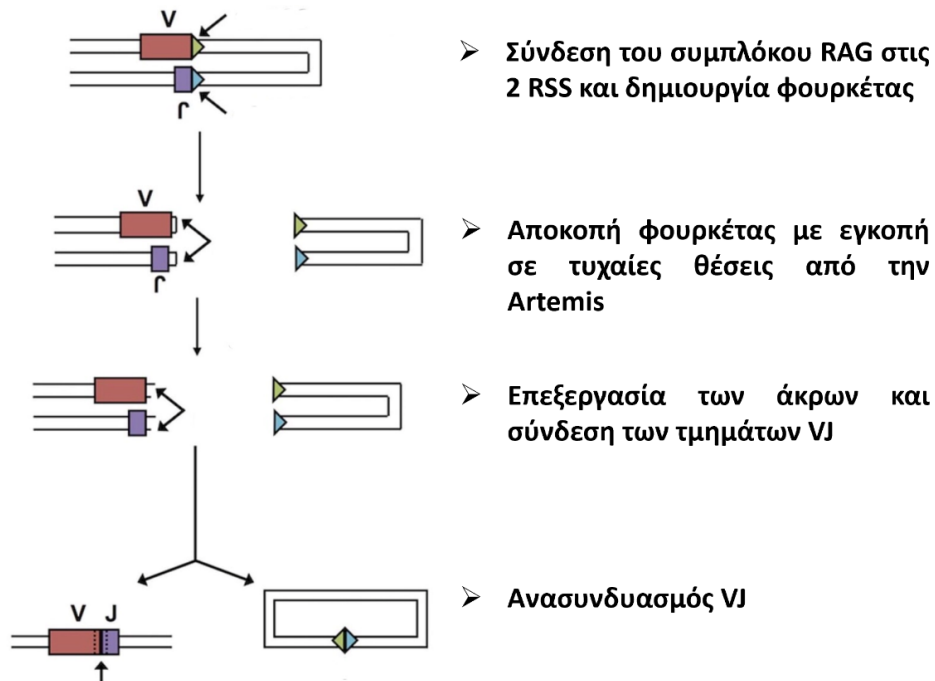
Η διαδικασία ανασυνδυασμού καθοδηγείται από συγκεκριμένες σηματοδοτικές αλληλουχίες στο DNA που αποκαλούνται αλληλουχίες σηματοδότησης του ανασυνδυασμού (Recombination Signal Sequences, RSSs). Οι αλληλουχίες αυτές εντοπίζονται στα δύο άκρα των IGHD γονιδίων, στο 3' άκρο του IGHV και στο 5' άκρο του IGHJ<sup>42,43</sup>. Περιλαμβάνουν ένα συντηρημένο παλίνδρομο επτανουκλεοτίδιο (5'-CACAGTG-3') και άλλο ένα συντηρημένο παλίνδρομο εννιανουκλεοτίδιο (5' ACAAACC 3'), τα οποία χωρίζονται με μια ενδιάμεση αλληλουχία (spacer region), μήκους 12 ή 23 νουκλεοτιδίων.<sup>44</sup> Γονίδια της ίδιας ομάδας έχουν ίδιο τύπο RSS, και για αυτό, ανασυνδυασμός γίνεται μόνο μεταξύ γονιδίων με διαφορετική ενδιάμεση αλληλουχία και άρα και τύπο RSS. Το μήκος ενδιάμεσης αλληλουχίας είναι αυστηρά 12 ή 23 νουκλεοτίδια, καθώς 12 και 23 ζεύγη βάσεων παραπέμπουν σε μία ή δύο στροφές της έλικας του DNA αντίστοιχα. Ο κανόνας αυτός είναι γνωστός ως κανόνας 12/23 και εξασφαλίζει πως οι 2 συντηρημένες περιοχές στα άκρα θα έχουν σωστό προσανατολισμό και θα μπορέσουν οι αλληλουχίες RSS να αναγνωριστούν από τα ένζυμα ανασυνδυασμού.<sup>41,43,44</sup> Στη διαδικασία ανασυνδυασμού καταλυτικό ρόλο κατέχει ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών της λεμφικής σειράς, το σύμπλοκο RAG-1/RAG-2 (Recombination Activating Genes), το οποίο μπορεί και αναγνωρίζει τις RSS,

προσδένεται ειδικά σε αυτές και κόβει το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, ώστε με τη βοήθεια ειδικών λιγασών να γίνει η σύνδεση των γονιδίων.<sup>44,45</sup>

Η συνδυαστική ποικιλότητα ενισχύεται περαιτέρω και από τους διαφορετικούς συνδυασμούς βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας. Υπάρχουν, έτσι, θεωρητικά  $\sim 3 \times 10^6$  πιθανοί διαφορετικοί συνδυασμοί, οι οποίοι συσχετίζονται και με διαφορετική εξειδίκευση του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Έχει, όμως, παρατηρηθεί, πως συγκεκριμένοι συνδυασμοί βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας επιλέγονται θετικά έναντι άλλων, γεγονός που αποδίδεται, πιθανώς, σε μεγαλύτερη δομική σταθερότητα του μορίου.

### 3.2.2 Συνδυαστική ποικιλότητα

Όπως προαναφέρθηκε, η περιοχή CDR3 αποτελεί περιοχή ιδιαίτερης μεταβλητότητας. Το χαρακτηριστικό της σε αντίθεση με τις CDR1 και CDR2 είναι ότι αποτελεί περιοχή συμβολής τωνIGHV-IGHD-IGHJ γονιδίων (για βαριές αλυσίδες) ή τωνIGKV-IGKJ/IGLV-IGLJ (για τις ελαφριές αλυσίδες). Στην αύξηση της ποικιλότητας των CDR3-περιοχών συμβάλει και η προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων κατά τη δημιουργία των συμβολών αυτών, φαινόμενο, το οποίο ονομάζεται «Συνδυαστική ποικιλότητα». Κατά την επεξεργασία από το σύμπλοκο RAG-1/RAG-2, δημιουργούνται στα άκρα των γονιδίων φουρκέτες. Τη δομή της φουρκέτας την αναγνωρίζει ένα ειδικό σύμπλοκο, που απαρτίζεται από την πρωτεΐνη «Artemis»<sup>46</sup> και την DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση. Το σύμπλοκο αυτό, λειτουργεί ως ενδονουκλεάση, προκαλεί μια εγκοπή σε τυχαίο σημείο στη φουρκέτα, οδηγώντας στην παραγωγή παλίνδρομων αλληλουχιών, που ονομάζονται P-νουκλεοτίδια (Palindromic nucleotides). Στο σημείο αυτό έχει βρεθεί πως ένα άλλο ένζυμο, η δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Tdt) προσθέτει επιπλέον νουκλεοτίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως N-νουκλεοτίδια (Non templated nucleotides). Τέλος, δραστηριοποιούνται εξωνουκλεάσες, οι οποίες αφαιρούν τις αταίριαστες βάσεις, αλλά και πολυμεράσες που καλύπτουν τα κενά που προέκυψαν (Εικόνα 12).<sup>43,45,46</sup>



Εικόνα 12 Απεικόνιση διαδικασίας ανασυνδυασμού μεταξύ των γονιδίων IGKV και IGKJ της κ αλυσίδας (Τροποποιημένη από 'Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: PKcs complex', Howard H.Y. Chang, Nucleic Acids Research)

### 3.2.3 Μηχανισμοί ωρίμανσης συγγένειας

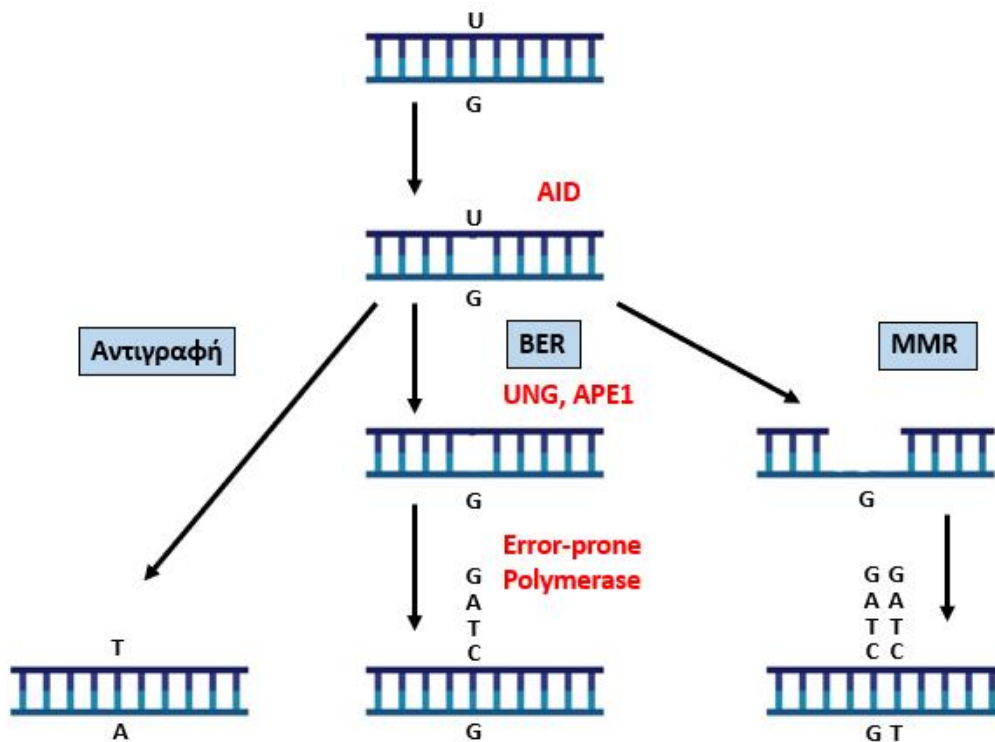
Από τη στιγμή που έχει γίνει η αναγνώριση του αντιγόνου από το B κύτταρο και αυτό έχει ενεργοποιηθεί, ακολουθεί ένα επιπλέον επίπεδο διαμόρφωσης της ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών, κατά το οποίο πραγματοποιείται ωρίμανση της συγγένειας των Β-λεμφοκυττάρων, μέσω των μηχανισμών της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης και εναλλαγής ισotyπου. Σκοπός είναι η επιλογή και παραγωγή Β λεμφοκυττάρων που θα εκφράζουν ΒκΥ, με βέλτιστη συγγένεια και κατά συνέπεια ειδικότητα για το αντιγόνο.<sup>1</sup>

#### Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Η υψηλή εξειδίκευση του ΒκΥ έναντι σε συγκεκριμένα αντιγόνα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ)(Εικόνα 13). Με τη διαδικασία αυτή, τα αναδιαταγμένα γονίδια των ανοσοσφαιρινών αποκτούν μεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή με στόχο την αύξηση της ετερογένειας. Η εισαγωγή μεταλλάξεων γίνεται κυρίως στις 3 περιοχές CDR των μεταβλητών περιοχών, τόσο της βαριάς, όσο και της ελαφριάς αλυσίδας.<sup>47,48</sup> Ο ρυθμός που εισάγονται οι μεταλλάξεις είναι πολύ υψηλός, της τάξης  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  μεταλλάξεις ανά ζεύγος βάσεων ανά νουκλεοτιδική γενιά. Ο ρυθμός αυτός είναι πολύ υψηλότερος ( $10^6$ Χ) από το ρυθμό με τον οποίο εισάγονται μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια.<sup>49</sup> Όταν η

ωρίμανση συγγένειας συμβαίνει στα βλαστικά κέντρα, ο μηχανισμός της ΣΥΜ διαδραματίζεται στη σκοτεινή ζώνη και συνοδεύεται από πολλαπλασιασμό των κεντροβλαστών. Οι μεταλλάξεις που εισάγονται είναι, κυρίως, σημειακές αντικαταστάσεις βάσεων και σε μικρότερη συχνότητα ενθέσεις και απαλοιφές. Στις περιοχές CDR η πιθανότητες να συμβούν μεταλλάξεις είναι αυξημένες, λόγω της ύπαρξης συγκεκριμένων κωδικονίων που λειτουργούν ως επίκεντρα (hotspots) για την εισαγωγή μεταλλάξεων. Τα επίκεντρα αυτά, συναντώνται κατά πλειοψηφία στις CDR περιοχές, για αυτό και σε αυτές η συχνότητα μεταλλαξιγένεσης είναι πολύ πιο αυξημένη σε σχέση με τις FR-περιοχές.<sup>50,51</sup> Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί, πως ο μηχανισμός σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στοχεύει περισσότερο σε νουκλεοτίδια G,C σε σχέση με τα A,T και πως υπάρχει προτίμηση σε μεταπτώσεις απ' ότι σε μεταστροφές.<sup>24,51</sup> Καθοριστικό ρόλο για τη διεξαγωγή της ΣΥΜ έχει η πρωτεΐνη δεαμινάση της κυτιδίνης (AID). Αρχικά η AID στοχεύει νουκλεοτιδικά κατάλοιπα κυτιδίνης (C) του μορίου και τα μετατρέπει σε ουρακίλη (U), με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα αταίριαστο ζεύγος (U)/(G).<sup>52</sup> Από τη στιγμή που δημιουργηθεί το ζεύγος βάσεων αυτό, τρεις είναι οι πιθανές εκβάσεις. Αρχικά, μπορεί η ουρακίλη να διαβαστεί ως θυμίνη και άρα κατά τον διπλασιασμό να προκύψει νέα μετάλλαξη. Η ουρακίλη μπορεί, επίσης, να αφαιρεθεί μέσω δράσης του μονοπατιού BER (Base Excision Repair) - οδός εκτεταμένης επιδιόρθωσης.<sup>53</sup> Το σύστημα BER αξιοποιεί τη δράση του ενζύμου N-γλυκοζυλάση της ουρακίλης (uracil N-glycosylase, UNG), το οποίο μπορεί και δημιουργεί μια θέση, όπου δεν υπάρχει κάποια βάση. Στη συνέχεια επιστρατεύεται η απουρινική/απυριμιδική ενδονουκλεάση 1 (apurinic/apyrimidic endonuclease 1, APE1), η οποία δημιουργεί μονόκλωνες εντομές. Το κενό επιδιορθώνεται μέσω πολυμερασών χαμηλής ποιότητας, οι οποίες είναι επιρρεπείς σε λάθη. Τέλος, η τρίτη πιθανή έκβαση αφορά την αναγνώριση του αταίριαστου ζεύγους βάσεων από το σύμπλεγμα ενζύμων MSH2/MSH6 (MutS homolog 2/6), με αποτέλεσμα να απομακρυνθούν από το ένζυμο εξωνουκλεάση 1 τόσο η ουρακίλη, όσο και τα γειτονικά σε αυτή νουκλεοτίδια. Και σε αυτή την περίπτωση, το κενό επιδιορθώνεται μέσω των πολυμερασών χαμηλής ποιότητας (Εικόνα 13).



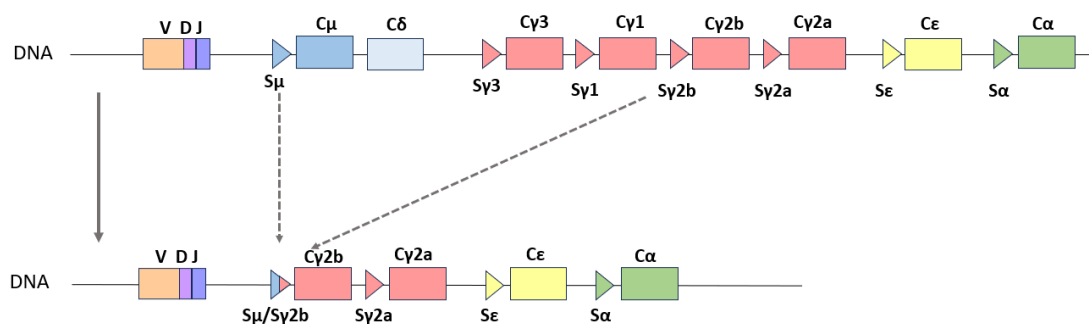


Εικόνα 13 Απεικόνιση του μηχανισμού σωματικής υπερμεταλλαγμένησης ([www.biorender.gr](http://www.biorender.gr))

### Εναλλαγή ισοτύπου

Η εναλλαγή ισοτύπου (CSR, Class Switch Recombination) αποτελεί ακόμα έναν μηχανισμό που συμβάλλει στην ωρίμανση συγγένειας των B- λεμφοκυττάρων με το εκάστοτε αντιγόνο και όταν συμβαίνει στα βλαστικά κέντρα, πραγματοποιείται κατά τη φάση που το B-κύτταρο περνάει από τη σκοτεινή στη φωτεινή ζώνη, ενώ ο αντίκτυπος που έχει ο μηχανισμός αυτός στο μόριο της ανοσοσφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της τάξης στην οποία ανήκει ένα αντίσωμα (ισότυπος ανοσοσφαιρίνης). Αξίζει να σημειωθεί πως σε αυτή την περίπτωση δεν αλλάζει η αντιγονική ειδικότητα του μορίου ανοσοσφαιρίνης, αφού αυτή καθορίζεται από τη μεταβλητή περιοχή, αλλά αλλάζουν οι λειτουργικές ιδιότητες. Μέσω του μηχανισμού CSR γίνεται αντικατάσταση της σταθερής C<sub>μ</sub> ή C<sub>δ</sub> περιοχής από κάποια σταθερή περιοχή άλλης τάξης ανοσοσφαιρίνης (C<sub>γ</sub>, C<sub>α</sub>, C<sub>ε</sub>) και αντίστοιχα προκύπτουν οι ισότυποι IgG, IgA, IgE (Εικόνα 14). Δημιουργούνται δηλαδή BκΥ με νέες λειτουργικές ιδιότητες, αλλά ίδια αντιγονική ειδικότητα, ενισχύοντας έτσι την ποικιλότητα του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών. Ο μηχανισμός που ευθύνεται για το φαινόμενο εναλλαγής ισοτύπου καταλύεται επίσης (όπως και η ΣΥΜ), χάρη στη δράση της AID. Ο μηχανισμός δράσης της σε αυτή την περίπτωση αφορά στον ανασυνδυασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών ανοδικά της σταθερής περιοχής που αποκαλούνται αλληλουχίες εναλλαγής (switch regions, S).<sup>35,54</sup> Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ της αλληλουχίας εναλλαγής της IgM ή IgD ανοσοσφαιρίνης ενδιαφέροντος και της αλληλουχίας εναλλαγής μία άλλης ανοσοσφαιρίνης (διαφορετικής τάξης) (Εικόνα 14). Εκεί, εντοπίζεται και η δράση της AID, καθώς είναι

υπεύθυνη για τη ρήξη του DNA, δημιουργώντας μονόκλωνα άκρα ώστε στη συνέχεια να γίνει ο ανασυνδυασμός μέσω του μηχανισμού NHEJ (Non-homologous end joining). Η νέα σταθερή περιοχή συνδέεται, έπειτα, με την αναδιάταξη VDJ, μέσω συρραφής. Το ποιος ισότυπος θα επιλεγεί, για την εναλλαγή, εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των B-κυττάρων με τα T<sub>H</sub>-κύτταρα.<sup>55-59</sup>



Εικόνα 14 Απεικόνιση του μηχανισμού εναλλαγής ισότυπου

## 4. Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

### 4.1 Γενικές πληροφορίες

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι μία κακοήθεια ώριμων B λεμφοκυττάρων και είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο δυτικό κόσμο. Η ασθένεια αυτή διαγιγνώσκεται με διπλάσια συχνότητα στους άντρες απ' ό,τι στις γυναίκες και κυρίως μετά την ηλικία των 55 ετών.<sup>60,61</sup> Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από την κλωνική έκπτυξη και συσσώρευση B λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών, αλλά και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και συχνά συνοδεύεται από λεμφοκυττάρωση, ηπατομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια. Ο μονοκλωνικός αυτός πληθυσμός των B-λεμφοκυττάρων που εκπτύσσεται ανεξέλεγκτα έχει συγκεκριμένο και χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο.<sup>62</sup> Συγκεκριμένα, τα κακοήθη B-κύτταρα εκφράζουν κυρίως τους επιφανειακούς δείκτες CD5, CD19 και CD23, ενώ παρουσιάζουν ασθενή έκφραση της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης και του CD20, επιτρέποντας έτσι τη διάκρισή τους από τα υγιή B κύτταρα.<sup>63,64</sup> Σε πολλές περιπτώσεις η νόσος είναι ασυμπτωματική, γι' αυτό και η διάγνωση συνήθως γίνεται μετά από γενική εξέταση αίματος. Σπανιότερα υπάρχουν κάποια συμπτώματα, όπως αυξημένος πυρετός, απώλεια βάρους ή νυχτερινές εφιδρώσεις, τα οποία όμως είναι μη ειδικά και άρα δεν αποτελούν χαρακτηριστικό σημάδι της νόσου. Για αυτό και είναι απαραίτητη η αιματολογική εξέταση. Για τη διάγνωση είναι απαραίτητη η καταγραφή περισσότερων από  $5 \times 10^6$  κλωνικών B λεμφοκυττάρων/mL αίματος, τα οποία διαθέτουν και συγκεκριμένη μορφολογία. Πρόκειται, δηλαδή, για κύτταρα μικρά σε μέγεθος, με στρόγγυλο πυρήνα και περιορισμένο κυτταρόπλασμα.<sup>65,66</sup> Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί περιβαλλοντικός παράγοντας, όπως πχ η ακτινοβολία,

που να σχετίζεται με τη νόσο.<sup>67</sup> Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί πως υπάρχει προδιάθεση για τη νόσο σε συγγενείς πρώτου βαθμού. Έχει βρεθεί πως μεταξύ υγιών ατόμων, εκείνοι με πρώτου βαθμού συγγένεια με άτομο που πάσχει, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά Β λεμφοκυττάρων με τον χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο που αντιστοιχεί στη ΧΛΛ, συγκριτικά με τους υπόλοιπους.<sup>68</sup> Όσον αφορά την οντογένεση της νόσου, μελέτες έχουν δείξει πως τα νεοπλασματικά Β κύτταρα δεν είναι παρθένα, αλλά έχουν διεγερθεί από κάποιο αντιγόνο. Επιπλέον, το ρεπερτόριο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που εκφράζονται από τα κύτταρα αυτά είναι σημαντικά περιορισμένο όσον αφορά τη χρήση των γονιδίων IGHV που αξιοποιούνται. Έτσι, συμπεραίνεται πως υπάρχει αντιγονική επιλογή ενός αρχικού κλώνου, ο οποίος στη συνέχεια υπόκειται σε λευχαιμική εξαλλαγή.<sup>69</sup> Τέλος, σημαντικό είναι να σημειωθεί πως, η ΧΛΛ αποτελεί μια εξαιρετικά ετερογενή νόσο. Υπάρχει μία μερίδα ασθενών (30%) που εμφανίζουν ήπια κλινική πορεία και ίσως να μην χρειαστούν θεραπεία ποτέ. Οι ασθενείς αυτοί επιβιώνουν με προσδόκιμο ζωής παρόμοιο με το γενικό πληθυσμό και συνήθως καταλήγουν από αίτια που δεν σχετίζονται με τη νόσο. Αντίθετα, υπάρχουν ασθενείς που πάσχουν από πιο επιθετική μορφή της νόσου, χρήζουν άμεσης θεραπείας και το προσδόκιμο ζωής τους δεν ξεπερνά τα 2 με 3 έτη. Υπάρχει και ένα 2-9% των ασθενών, των οποίων η νόσος εξελίσσεται στο επιθετικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα, και οι οποίοι επίσης έχουν ιδιαίτερα δυσμενή πρόγνωση (σύνδρομο Richter).<sup>70</sup>

## 4.2 Προγνωστικοί δείκτες

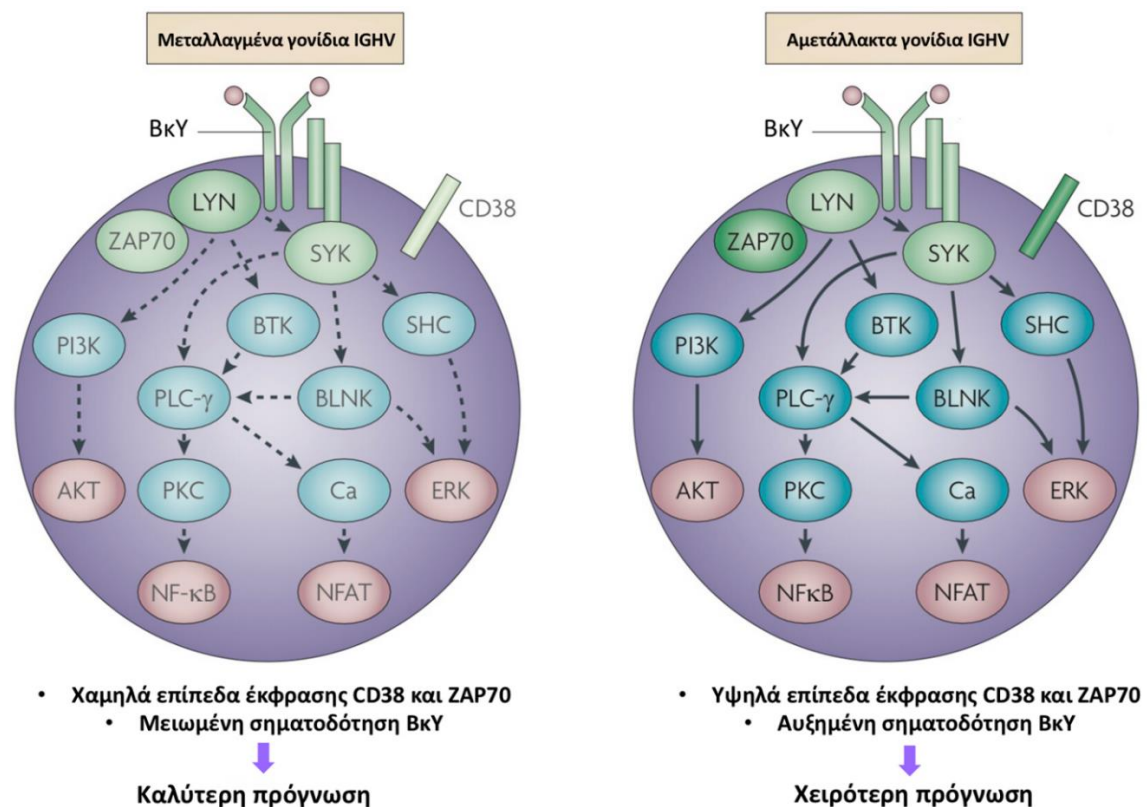
### 4.2.1 Πρότυπο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης των γονιδίων IGHV

Το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, ως απόρροια των μηχανισμών ωρίμανσης συγγένειας, αποτελεί έναν από τους πιο ακριβείς προγνωστικούς βιοδείκτες στη ΧΛΛ.<sup>71</sup> Με βάση το φορτίο αυτό, οι ασθενείς κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Από τη μία είναι οι ασθενείς που πάσχουν από Αμετάλλακτη ΧΛΛ, στην οποία κατατάσσονται οι ασθενείς, με IGHV γονίδια αμετάλλακτα ή που παρουσιάζουν ομολογία  $\geq 98\%$  με τη βλαστική σειρά, ενώ η άλλη ομάδα περιλαμβάνει τους ασθενείς που πάσχουν από Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, στην οποία συγκαταλέγονται ασθενείς με ομολογία  $< 98\%$  με τη βλαστική σειρά στα IGHV γονίδια.<sup>72</sup> Για να υπολογιστεί το φορτίο ΣΥΜ, υπολογίζεται ο αριθμός των μεταλλάξεων (σύγκριση με την αλληλουχία της βλαστικής σειράς) κατά μήκος της περιοχής VH FR1-FR3 περιοχή. Η VH-CDR3 εξαιρείται λόγω της υψηλής ετερογένειας της, καθιστώντας την αναγνώριση μεταλλάξεων στην περιοχή αυτή αναξιόπιστη. Έτσι, ασθενείς με ομολογία μικρότερη του 98% με τη βλαστική σειρά συγκαταλέγονται στη Μ-ΧΛΛ και συσχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση και ήπια εξέλιξη της νόσου.<sup>73</sup> Αντίθετα, οι ασθενείς με ομολογία μεγαλύτερη του 98% με τη βλαστική σειρά κατατάσσονται στην Α-ΧΛΛ και χαρακτηρίζονται από δυσμενή πρόγνωση, ταχεία εξέλιξη της νόσου και άμεση ανάγκη θεραπείας.<sup>74</sup> Οι ασθενείς με Α-ΧΛΛ αναγνωρίζουν συχνά πληθώρα αντιγονικών επιτόπων και γι' αυτό χαρακτηρίζονται από πολυδραστικότητα, ενώ η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια

IGHV, καθιστά τους υποδοχείς πιο επιλεκτικούς στην αναγνώριση επιτόπων, περιορίζοντας έτσι και την σηματοδότηση μέσω αυτών.

#### 4.2.2 Δείκτες ZAP-70 και CD38

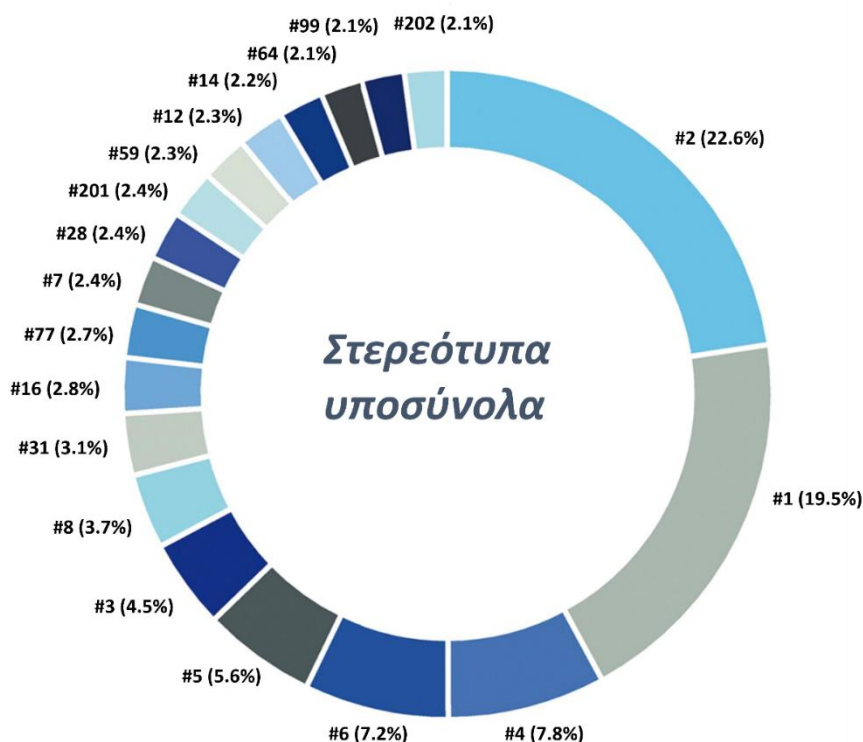
Δύο σημαντικοί βιοδείκτες που συνδέονται με τη νόσο, είναι τα επίπεδα των CD38 και ZAP-70.<sup>75,76</sup> Παρότι η υψηλή έκφραση τους χαρακτηρίζει την Α-ΧΛΛ, κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στην περίπτωση της Μ-ΧΛΛ, υποδηλώνοντας πιθανή συσχέτιση τους με τη πρόγνωση και την εξέλιξη της νόσου. Ο δείκτης CD38 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που προάγει, έτσι, την επιβίωση και τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ΧΛΛ κυττάρων.<sup>77</sup> Ασθενείς θετικοί για CD38 χαρακτηρίζονται από ταχεία εξέλιξη νόσου και μικρότερο προσδόκιμο ζωής.<sup>75,78,79</sup> Η ZAP-70 είναι μία κινάση τυροσίνης, φωσφορυλίωση της οποίας οδηγεί στην ενεργοποίηση της και στην έναρξη της σηματοδοτικής της ικανότητας, επιστρατεύοντας ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού του ΒκΥ.<sup>80</sup> Λόγω της πολυδραστικότητας του ΒκΥ των ασθενών με Α-ΧΛΛ και της προκύπτουσας αυξημένης σηματοδότησης, μπορεί να δικαιολογηθεί και η αυξημένη έκφραση ZAP-70. Άρα, υψηλά επίπεδα της σχετίζονται με επιθετική μορφή της νόσου και άρα χειρότερη πρόγνωση (Εικόνα 15).<sup>76,81</sup>



Εικόνα 15 Προγνωστικοί δείκτες για τη ΧΛΛ-Απεικόνιση της σύνδεσης της σηματοδότησης μέσω του ΒκΥ με το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων IGHV και συσχέτιση της με την εξέλιξη της νόσου (Τροποποιημένη από Zenz T et al, Nat Rev Cancer)

### 4.3 Στερεοτυπία του Β-κυτταρικού Υποδοχέα στη ΧΛΛ

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, το ανοσιακό σύστημα διαθέτει πληθώρα μηχανισμών οι οποίοι εξασφαλίζουν την ποικιλομορφία του ρεπερτορίου των Β-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, στην περίπτωση της ΧΛΛ έχει παρατηρηθεί το παράδοξο φαινόμενο, διαφορετικοί ασθενείς να εκφράζουν παρόμοιους ή και πανομοιότυπους ΒκΥ στο λευχαιμικό κλώνο.<sup>82</sup> Λαμβάνοντας υπόψη τις πιθανότητες να συμβεί αυτό στο φυσιολογικό ρεπερτόριο ( $1:10^{-12}$ ), ιδιαίτερα δεδομένων των διαφορετικών μηχανισμών με τους οποίους εξασφαλίζεται η ποικιλομορφία των Β λεμφοκυττάρων, το φαινόμενο αυτό, το οποίο ονομάζεται στερεοτυπία του ΒκΥ αποτελεί μέχρι σήμερα τη βασικότερη ανοσογενετική ένδειξη για εμπλοκή συγκεκριμένων αντιγόνων στη φυσική ιστορία της ΧΛΛ.<sup>83,84</sup> Οι ασθενείς που παρουσιάζουν στερεοτυπία του ΒκΥ αποτελούν ~41% του συνόλου των ασθενών με ΧΛΛ και ανάλογα με τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά τους κατατάσσονται σε ομάδες, οι οποίες ονομάζονται στερεότυπα υποσύνολα (Εικόνα 16). Είναι πολύ ενδιαφέρον, πως οι ασθενείς που ανήκουν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο χαρακτηρίζονται όχι μόνο από κοινά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά, αλλά και κοινά βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, όπως γενετικές βλάβες και πρόγνωση νόσου.<sup>85,86</sup> Με αυτό τον τρόπο, η στερεοτυπία του ΒκΥ αποτελεί ένα νέο μοριακό δείκτη που μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην καλύτερη και ακριβέστερη διαχείριση των ασθενών με ΧΛΛ.



Εικόνα 16 Σύνολο στερεότυπων υποσυνόλων και ποσοστά εμφάνισής τους σε ασθενείς με στερεότυπους ΒκΥ

#### 4.4 Ενδείξεις για *in vivo* εναλλαγή ισοτύπου στη ΧΛΛ

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΛΛ διαθέτουν κλωνικούς πληθυσμούς IgM<sup>+</sup> Β-κυττάρων. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως σε μερικούς από αυτούς, ιδιαίτερα σε ασθενείς Α-ΧΛΛ, υπάρχει ένα πολλαπλασιαζόμενο τμήμα του ΧΛΛ κλώνου που υπόκειται σε εναλλαγή ισοτύπου, χωρίς απαραίτητα να λαμβάνει μεταλλάξεις στο πλαίσιο της ΣΥΜ. Οι μελέτες αυτές συνδέσαν αυτά τα φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου με την αυξημένη έκφραση AID στα συγκεκριμένα κύτταρα, ενώ η παρουσία αυτών των κυττάρων συνδέθηκε και με δυσμενή κλινική πρόγνωση στους συγκεκριμένους ασθενείς.

#### 4.5 Σκοπός μελέτης

Παρόλο που τα μέχρι τώρα ευρήματα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, είναι αρκετά περιορισμένα αφού προκύπτουν από μελέτες μικρής κλίμακας σε μικρή σειρά ασθενών.

Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας σε μεγάλη σειρά ασθενών ΧΛΛ, για τη λεπτομερή μελέτη των μηχανισμών ωρίμανσης συγγένειας του ΒκΥ, δηλαδή της εναλλαγής ισοτύπου και σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στη ΧΛΛ με απώτερο σκοπό την απόκτηση ενδείξεων για την οντογένεση της νόσου.



## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Ομάδα μελέτης

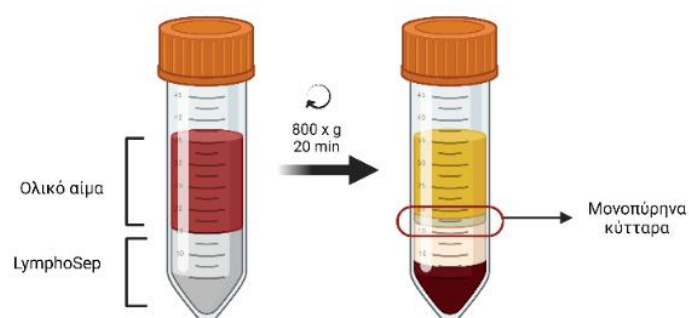
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν τα δείγματα 70 ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάγνωση, χωρίς οι ασθενείς να έχουν λάβει κάποια θεραπεία. Η διάγνωση και κατηγοριοποίηση σε ομάδες έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia / National Cancer Institute (iwCLL/NCI). Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν εξέφραζαν τον IgM ισότυπο στο λευχαιμικό κλώνο όπως επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής, ενώ ύστερα από αλληλούχηση κατά Sanger προσδιορίστηκε το μεταλλακτικό φορτίο των ανοσοσφαιρινών του BκΥ με βάση το οποίο οι ασθενείς χωρίστηκαν στις υποομάδες αμετάλλακτη ΧΛΛ (Α-ΧΛΛ) (39/70) και μεταλλαγμένη ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ) (31/70). Τέλος, η εργασία εγκρίθηκε από τις επιτροπές ηθικής & δεοντολογίας των συνεργαζόμενων φορέων και εκπονήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι.

### 2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγματα περιφερικού αίματος (PBMCs)

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διαχωρισμού με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φικόλης. Η φικόλη είναι ένας υδρόφιλος πολυσακχαρίτης, ο οποίος έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από το ολικό αίμα, καθιστώντας έτσι δυνατή την επιστοίβαση αυτού χωρίς ανάμιξη. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα διαφορετικά κύτταρα του ολικού αίματος σχηματίζουν τρεις διαφορετικές στιβάδες. Στην κατώτατη ζώνη βρίσκονται τα ερυθροκύτταρα μαζί με τα κοκκιοκύτταρα, ενώ πάνω από τη φικόλη σχηματίζεται μία νεφελώδης στιβάδα,



όπου βρίσκονται τα μονοπύρρηνα κύτταρα, επιτρέποντας έτσι την εύκολη απομόνωσή τους (Εικόνα 17).



Εικόνα 17 Απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης PBMCs

### Πειραματική διαδικασία:

1. Μετά τη λήψη του περιφερικού αίματος ( $V=20 \text{ cm}^3$ ) και την προσθήκη αντιπηκτικού παράγοντα (EDTA – 200μl), γίνεται αραιώση του ολικού αίματος σε θρεπτικό (RPMI) σε αναλογία 1:1
2. Επιστοίβαση του αραιωμένου ολικού αίματος σε φικόλη, σε αναλογία 2:1 υπό γωνία
3. Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 800 rcf, χωρίς την χρήση φρένου
4. Συλλογή της στιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων και μεταφορά σε νέο σωληνάριο με χρήση πιπέτας Pasteur
5. Προσθήκη θρεπτικού (RPMI) σε αναλογία ~1:1 και καλή ανάμιξη
6. Φυγοκέντρηση για 8 λεπτά στα 800 rcf και απόρριψη του υπερκειμένου
7. Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων και πλύση με θρεπτικό μέσο (RPMI–10ml)
8. Επανάληψη του βήματος 6.
9. Επαναιώρηση των κυττάρων σε RPMI σε ποσότητα ανάλογη του μεγέθους του ιζήματος με στόχο τη μέτρησή τους
10. Μέτρηση των κυττάρων και εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους σε πλάκα Neubauer, στο οπτικό μικροσκόπιο με τη χρωστική Trypan Blue. (Η συγκεκριμένη χρωστική βάφει μπλε τα νεκρά κύτταρα)
11. Διαχωρισμός του δείγματος σε επιμέρους φιαλίδια τύπου erpendorf, έτσι ώστε να περιέχονται  $12-15 \times 10^6$  κύτταρα στο καθένα από αυτά
12. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 800 rcf. Απόρριψη του υπερκειμένου.
13. Προσθήκη διαλύματος θειοκυανικού γουανιδίου-φαινόλης (TRI reagent) σε αναλογία: 1mL/  $12 \times 10^6$  κύτταρα, για λύση των κυττάρων
14. Αποθήκευση στους  $-80^\circ\text{C}$  ή απευθείας εκχύλιση RNA

### 3. Απομόνωση ολικού RNA – Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός

#### 3.1 Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φαινόλης-θειοκυανικού γουανιδίου 4M (TRI Reagent, Sigma-Aldrich, USA) και χλωροφόρμιο. Κατόπιν λύσης των κυττάρων με το παραπάνω διάλυμα, έγινε προσθήκη χλωροφορμίου, με αποτέλεσμα να προκύψει διφασικό μίγμα, όπου το ολικό RNA βρίσκεται στην υδατική φάση (άνω φάση) και οι πρωτεΐνες στην οργανική (κάτω φάση). Τέλος, ακολούθησε κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη για απομόνωση, αποκλειστικά, του RNA.

#### Πειραματική διαδικασία:

1. Προσθήκη χλωροφορμίου (200μL CHCl<sub>3</sub>/mL αντιδραστηρίου TRI) με ισχυρή ανάδευση
2. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12,000 rcf, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει διάλυμα δύο φάσεων, όπου η οργανική φάση περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες διαλυμένες στο μίγμα φαινόλης – χλωροφορμίου, και η υδατική περιέχει το RNA.
3. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf
4. Προσθήκη ισοπροπανόλης (i-PrOH) σε αναλογία 500 μL/mL TRI και ανάδευση
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά προς κατακρήμνιση του RNA
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12,000 rcf, (4°C) και απόρριψη του υπερκειμένου (το RNA βρίσκεται στον πάτο του φιαλιδίου σαν ιζήμα)
7. Προσθήκη αιθανόλης 75% σε αναλογία 1 ml/ml TRI, χωρίς διατάραξη του ιζήματος
8. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12,000 xg, (4°C) και απόρριψη του υπερκειμένου
9. Επανάληψη βήματος 7
10. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12,000 xg, (4°C), απόρριψη του υπερκειμένου και αφαίρεση περίσσειας αιθανόλης
11. Διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου με τα καπάκια από τα Erpendorf ανοιχτά μέχρι πλήρους εξάτμισης της αιθανόλης
12. Επαναιώρηση του ιζήματος RNA σε 20-50 μL H<sub>2</sub>O ελεύθερο από RNAσες
13. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C ή διατήρηση σε πάγο για άμεση επεξεργασία

#### 3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός εκχυλισμένου RNA

Η ποσοτικοποίηση του εκχυλισμένου RNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση έντασης φθορισμού με τη δοκιμασία Qubit® RNA BR (Broad-Range) Assay (Invitrogen, USA)

και το αντίστοιχο φθοριόμετρο Qubit® Fluorometer. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση φθορίζουσας χρωστικής, που προσδένεται εκλεκτικά μόνο στο RNA, με αποτέλεσμα η ένταση φθορισμού να είναι ανάλογη με την ποσότητα του RNA στο εκάστοτε δείγμα. Η ακριβής ποσοτικοποίηση γίνεται από το όργανο με τη βοήθεια προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης (Standard 1, Standard 2) και την κατασκευή της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς.

#### **Πειραματική διαδικασία:**

1. Ανάμιξη του Qubit® RNA BR Reagent με το Qubit® RNA BR Buffer σε αναλογία 1:200, προς τελικό όγκο 200μL, για παρασκευή του Qubit® Working Solution (WS)
2. Ανάδευση του μίγματος WS (vortex)
3. Προσθήκη 198μL από το WS και 2μL από το κάθε δείγμα σε ειδικά tubes που παρέχονται από το kit
4. Προσθήκη 190μL από το WS και 10μL από τα Standard 1 και Standard 2, σε αντίστοιχα tubes για κατασκευή της πρότυπης καμπύλης
5. Ελαφριά ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2'
6. Μέτρηση των Standard 1 και Standard 2 με το φθοριόμετρο Qubit® Fluorometer, προς κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και βαθμονόμησης του οργάνου
7. Μέτρηση του φθορισμού των δειγμάτων και αναγωγή της συγκέντρωσης στα 2μL για κάθε ένα από αυτά, ώστε να υπολογιστεί η τελική συγκέντρωση των δειγμάτων

### 3.3 Ποιοτικός έλεγχος του εκχυλισμένου RNA

Για τον ποιοτικό έλεγχο του απομονωμένου RNA, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 2% w/v. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μετακίνηση αρνητικά φορτισμένων μορίων κατά μήκος της πηκτής, υπό την επίδραση εξωτερικής ηλεκτρικής τάσης, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό με βάση το μέγεθός τους. Για οπτικοποίηση του αποτελέσματος χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide, EtBr) σε συγκέντρωση 10 mg/mL, το οποίο προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα, και επιτρέπει την παρακολούθησή τους, όταν η γέλη εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

#### **Παρασκευή πηκτής αгарόζης 2% w/v:**

1. Προσθήκη 300mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-Acetate EDTA (TAE) 1X σε κωνική φιάλη
2. Μέτρηση σε ζυγό 6gr αгарόζης και διάλυσή της στο TAE
3. Καλή ανάδευση μέχρι πλήρους ομογενοποίησης
4. Θέρμανση του διαλύματος μέχρι πλήρη διάλυση της αгарόζης

5. Ελαφριά ψύξη της φιάλης σε κρύο νερό
6. Προσθήκη 5% v/v EtBr και καλή ανάδευση
7. Απόχυση του διαλύματος αγαρόζης στο εκμαγείο και τοποθέτηση κατάλληλων χτενών
8. Πήξη της αγαρόζης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση των χτενών

## 4. Αντίστροφη μεταγραφή προς σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

### 4.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Κατά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του RNA, γίνεται σύνθεση ενός υβριδικού μορίου DNA-RNA, με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase), το οποίο έχει την ικανότητα να συνθέτει DNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA.

#### Πειραματική διαδικασία:

1. Αραίωση RNA σε νερό (καθαρό από RNAσες) σε τελικό όγκο 11.4μL, για κάθε δείγμα προσθέτοντας σε κάθε αντίδραση κατάλληλη ποσότητα RNA και WFI
2. Προσθήκη 11,4μL WFI στο σωληνάριο για τον αρνητικό μάρτυρα
3. Παρασκευή μίγματος αντίδρασης (Master Mix1) ως εξής:

*Πίνακας 1 Αντιδραστήρια για παρασκευή του MasterMix1 για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής*

Αντιδραστήρια	Όγκος ανα αντίδραση
dNTPs mix (10mM)	1μL
Random Primers (20μg)	0.1μL

4. Προσθήκη 1,1μL από το Master Mix1 σε κάθε ένα από τα σωληνάρια, εκτός από αυτό του αρνητικού μάρτυρα (Τελικός όγκος αντίδρασης: 12,5μL)
5. Έντονη ανάδευση (vortex)
6. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή (65°C / 5 λεπτά) για να γίνει η αποδιάταξη του RNA
7. Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο (10 λεπτά)
8. Παρασκευή Master Mix2 ως εξής:

Πίνακας 2 Αντιδραστήρια για παρασκευή του Master Mix2 για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση
5x First-Strand Buffer (FSB)	4μL
DTT (0.1 M)	2μL
RNase out (40U/μL)	1μL
Superscript™ II Reverse Transcriptase (200U/μL)	0.5μL

9. Προσθήκη 7,5μL από το Master Mix2 για την σύνθεση του cDNA σε κάθε δείγμα (Τελικός όγκος αντίδρασης: 20μL)
10. Έντονη ανάδευση (vortex)
11. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 3 Συνθήκες επώασης των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή

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

#### 4.2 Ποιοτικός έλεγχος νεοσυντιθέμενου cDNA

Για τον έλεγχο της επιτυχίας σύνθεσης του cDNA, κατά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, έγινε ενίσχυση τριών εξονίων του γονιδίου RARα (6,7,8), το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα α του ρετινοϊκού οξέος και είναι συνεχώς ενεργό (ιδιοσυστατικό γονίδιο, housekeeping gene). Χρησιμοποιείται έτσι, ως γονίδιο αναφοράς και η έκφραση του, μετά από σύγκριση με τα διαφορετικά δείγματα cDNA δίνει πληροφορίες για την ποιότητά τους.

#### Πειραματική διαδικασία:

1. Παρασκευή Master Mix για την αντίδραση ενίσχυσης του RARα ως εξής:

Πίνακας 4 Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου RARα

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος/αντίδραση
10x PCR Buffer (-Mg)	1x	2.5μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2mM	1μl
dNTP Mix (10mM)	0.2mM	0.5μl
Εκκινητής RAR6 (10μM)	0.3μM	0.75μl
Εκκινητής RAR8 (10μM)	0.3μM	0.75μl
Template cDNA	-	2μl
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	0.5 U	0.1μl
Water for injection (WFI)	-	17.4μl

Αλληλουχίες εκκινητών:

RAR6: 5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'  
 RAR8: 5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'

2. Προσθήκη 23μL από το Master Mix σε κάθε σωληνάριο
3. Προσθήκη 2μL από το cDNA σε κάθε δείγμα
4. Προσθήκη 2μL WFI στον αρνητικό μάρτυρα
5. Ελαφριά ανάδευση
6. Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 5 Συνθήκες επώασης στον θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του γονιδίου RARα

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 λεπτά	} 40X
Αποδιάταξη	94°C	1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	53°C	1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C	1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά	
Αποθήκευση αντίδρασης:	4°C	∞	

7. Έλεγχος των προϊόντων PCR σε γέλη αгарόζης περιεκτικότητας 2%. Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων αναμένεται να είναι στις 300bp.

## 5. *In vitro* επαγωγή της AID σε πρωτογενή κύτταρα ασθενών ΧΛΛ

### 5.1 Διέγερση κυττάρων με CD40L και Ιντερλευκίνη-4

B-λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ασθενών που πάσχουν από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία καλλιεργήθηκαν *in vitro*, σε θρεπτικό υλικό (RPMI + 10%FBS +1% Pen/strep) για 48 ώρες, στους 37°C. Ως διεγέρτες, χρησιμοποιήθηκαν ο προσδέτης του CD40 (CD40Ligand, CD40L) και ιντερλευκίνη-4, με στόχο την ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων και την *in vitro* επαγωγή της έκφρασης της AID.

Η πρωτεΐνη CD40 αποτελεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα της υπερικογένειας των TNF και εκφράζεται σε πληθώρα κυττάρων, μεταξύ των οποίων και τα B-λεμφοκύτταρα. Ο προσδέτης του CD40, συνδέεται στο εξωκυττάριο τμήμα του CD40 και η πρόσδεση αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην T-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Στη διαδικασία αυτή της ενεργοποίησης σημαντικό ρόλο έχουν και κυτταροκίνες που απελευθερώνονται, μεταξύ των οποίων και η ιντερλευκίνη 4 (IL-4), η οποία αποτελεί μια τύπου 1 κυτταροκίνη, που παράγεται κυρίως από τα T-Βοηθητικά κύτταρα και έχει βρεθεί πως συμμετέχει στην *in vitro* ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων.

Πίνακας 6 Διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν και η συγκέντρωσή τους στην *in vitro* καλλιέργεια

Διεγέρτης	Συγκέντρωση στην καλλιέργεια	Συγκέντρωση stock διαλύματος
CD40L	100ng/mL	0.1mg/mL
CD40 Enhancer	1μg/ml	1mg/mL
IL-4	3ng/mL	200μg/mL

### 5.2 Έλεγχος επιτυχίας διέγερσης με κυτταρομετρία ροής

Η επιτυχία της διέγερσης των κυττάρων και η κατ' επέκταση ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων ελέγχθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Κατά την κυτταρομετρία ροής, εναιώρημα κυττάρων ρέει και διαπερνά μια δέσμη φωτός-laser. Τα κύτταρα του εναιωρήματος επισημάνθηκαν με ειδικούς δείκτες για ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό (CD19, CD45) και προσδιορισμό της ενεργοποίησής τους (CD25, CD86). Οι δείκτες αυτοί είναι συνδεδεμένοι με συγκεκριμένα φθοριοχρώματα. Έτσι, όταν διαπερνά το εναιώρημα των κυττάρων από τη δέσμη φωτός, το φως προσπίπτει πάνω στα κύτταρα, σκεδάζεται και ανάλογα με το φθοριοχρώμα με το οποίο είναι συνδεδεμένο το εκάστοτε κύτταρο εκπέμπεται φως σε ανάλογο μήκος κύματος. Το κυτταρόμετρο, διαθέτει ειδικούς υποδοχείς, που αντιλαμβάνονται τα διαφορετικά μήκη κύματος που προκύπτουν και στη συνέχεια αποδίδεται η πληροφορία σε διαγράμματα διασποράς.

## Πειραματική διαδικασία

1. Μεταφορά 400,000 κυττάρων από την *in vitro* καλλιέργεια σε FACS tubes
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (2000rcf)
3. Απόρριψη υπερκειμένου
4. Προσθήκη 500μl διαλύματος: PBS 1X + 1% FBS  
(**PBS**: Phosphate-Buffered Saline, **FBS**: Fetal Bovine Serum)
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (2000rpm) και απόρριψη υπερκειμένου
6. Προσθήκη των επιλεγμένων δεικτών (Πίνακας 7) στο διάλυμα

Πίνακας 7 Δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής

Δείκτης	Ποσότητα (μl)/400,000 κύτταρα
<b>CD19</b> (Δείκτης Β-Λεμφοκυττάρων)	8μL
<b>CD45</b> (Δείκτης λευκών αιμοσφαιρίων)	2μL
<b>CD25</b> (Δείκτης ενεργοποίησης Β-Λεμφοκυττάρων)	3μL
<b>CD86</b> (Δείκτης ενεργοποίησης Β-Λεμφοκυττάρων)	5μL

7. Επώαση για 20 λεπτά απουσία φωτός
8. Προσθήκη 500μl διαλύματος: **PBS 1X + 1% FBS**
9. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (2000rpm)
10. Προσθήκη 300μl διαλύματος: **PBS 1X**
11. Προσθήκη δείκτη βιωσιμότητας **7-AAD** (7-Aminoactinomycin-D) σε αναλογία 5μl/400,000 κύτταρα
12. Μέτρηση στο κυτταρόμετρο

### 5.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης της AID με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου βασίζεται στην τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με τη μόνη διαφορά, ότι επιτρέπει την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Τη δυνατότητα αυτή, την προσφέρει η χρήση της χρωστικής SYBR® Green [KAPA SYBR® FAST qPCR MasterMix (2x) kit, KAPA Biosystems, Roche, USA], η οποία προσδένεται μη ειδικά στα δίκλιωνα μόρια DNA. Ως αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των δίκλωνων μορίων DNA, παρατηρείται και αύξηση του φθορισμού της χρωστικής. Η αντίδραση παρατηρείται σε πραγματικό χρόνο απεικονίζοντας την με τη μορφή μιας σιγμοειδούς καμπύλης, την οποία χαρακτηρίζει ένα σημείο, που ορίζεται ως «κατώφλι φθορισμού» (Cycle Threshold, Ct) και το οποίο αντιπροσωπεύει τον κύκλο, κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά ένα συγκεκριμένο σημείο.



Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της AID χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , όπου η τιμή  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση της AID. Ως  $\Delta Ct$  ορίζεται η διαφορά των Ct του γονιδίου στόχου και ενός ιδιοσυστατικού γονιδίου (Αποκλεισμός τεχνικών σφαλμάτων από τις μετρήσεις), και ως  $\Delta\Delta Ct$ , η διαφορά των  $\Delta Ct$  του δείγματος και ενός δείγματος αναφοράς. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί τη δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης, GAPDH.

### Πειραματική διαδικασία:

1. Προετοιμασία 2 διαφορετικών MasterMix, ένα για κάθε γονίδιο (AID, GAPDH) ως εξής:

Πίνακας 8 Αντιδραστήρια για την προετοιμασία της αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήρια	V (μL)/αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
2x KAPA SYBR Green Mix	10 μL	1x
10 μM F'	0.4 μL	0.2 μM
10 μM R'	0.4 μL	0.2 μM
Νερό ελεύθερο RNA-ασών	7.2 μL	
cDNA	2 μL	
Τελικός όγκος	20 μL	

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα δύο γονίδια είναι οι εξής:

Πίνακας 9 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα δύο γονίδια, AID, GAPDH

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' -> 3')
Forward Primer (AID)	TACTGCTGGAATACTTTTGTAGAA
Reverse Primer (AID)	GTGACATTCTGGAAGTTGC
Forward Primer (GAPDH)	ACTGTGGATGGCCCTCCGG
Reverse Primer (GAPDH)	ACGGCAGGTCAGGTCCACCA

2. Προσθήκη 18μl MasterMix /αντίδραση
3. Προσθήκη 2μl από το cDNA στο αντίστοιχο σωληνάριο
4. Τοποθέτηση στο σύστημα qPCR (ARIA Mx Real-time PCR System, Agilent Biotechnologies, USA) στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 10 Συνθήκες επώασης στον θερμοκυκλοποιητή για την αντίδραση qPCR

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	45 δευτερόλεπτα	} 40X
Αποδιάταξη	95°C	10 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	30 δευτερόλεπτα	
Ανάλυση καμπύλης τήξης	55-99°C		

## 6. Ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του Β-κυτταρικού Υποδοχέα

### 6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του ΒκΥ, χρησιμοποιήθηκε το cDNA κάθε ασθενή ως υπόστρωμα για 3 αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εμπρόσθιοι εκκινητές που υβρίζονται στη καθοδηγητική αλληλουχία (Leader sequence, L) της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών και ειδικοί ανάστροφοι εκκινητές για την εκάστοτε σταθερή περιοχή (IGHM, IGHG, IGHA).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Πίνακας 11 Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του ΒκΥ

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')	Tm
IGHV1aL	AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG	65.8 °C
IGHV1bL	AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAG(C/A)	66.2 °C
IGHV2aL	AAATCGATACCACCATGGACACACTTTGCT(A/C)AC	62.8 °C
IGHV2bL	AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTCCAC	62.4 °C
IGHV3aL	AAATCGATACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC	67.8 °C
IGHV3bL	AAATCGATACCACCATGGA(A/G)(C/T)T(G/T)(G/T)G(G/A)CT(G/C/T)(A/C/T)GC	70.4 °C
IGHV4L	AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT	63.5 °C
IGHV5L	AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC	67 °C
IGHV6L	AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTCCTC	62.9 °C
IGHM	TTGGGGCGGATGCACT	56.2 °C
IGHG	CAGGGGAAGACCGATGG	56.5 °C
IGHA	GCTCAGCGGAAGACCTTGGGGCT	67 °C

### Πειραματική διαδικασία:

1. Προετοιμασία σωληναρίων κατάλληλων για PCR για κάθε μια από τις αντιδράσεις, και άλλο ένα για τον αρνητικό μάρτυρα
2. Προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης, με κάθε έναν από τους διαφορετικούς εκκινητές (IGHV1L, IGHV2L, IGHV3L, IGHV4L, IGHV5L, IGHV6L και IGHM, IGHG, IGHA) για την PCR ως εξής:

Πίνακας 12 Αντιδραστήρια για την προετοιμασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του BκΥ

Αντιδραστήριο	Όγκος/αντίδραση (μL)	Τελική συγκέντρωση στην αντίδραση
10x PCR Buffer	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	1	0.2 mM
Εκκινητής IGHV <sub>L</sub> (10 μM)	1	0.2 μM
Εκκινητής IGHC (10 μM)	1	0.2 μM
Νερό ελεύθερο RNA-ασών	38.3 uL	
Platinum Taq DNA Polymerase (500U)	0.2 uL	2 U/rxn
cDNA	2 uL	

3. Προσθήκη 48μl από το μίγμα της αντίδρασης στο αντίστοιχο σωληνάριο αλλά και στα σωληνάκια με τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα
4. Προσθήκη 2 μl από το αντίστοιχο cDNA
5. Έντονη ανάδευση (vortex)
6. Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες αντίδρασης:

Πίνακας 13 Συνθήκες επώασης στον θερμοκυκλοποιητή για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του BκΥ

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	1 λεπτό
Αποδιάταξη	94°C	1 λεπτό
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	1 λεπτό
Επιμήκυνση	72°C	90 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά
Αποθήκευση αντίδρασης	4°C	∞

} 38 X

Για τον έλεγχο επιτυχίας της ενισχυτικής PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, περιεκτικότητας 3% w/v.

## 6.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης PCR, τα ενισχυμένα προϊόντα της αντίδρασης αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 3% w/v, προς διαχωρισμό τους με βάση το μέγεθος και στη συνέχεια απομονώθηκαν με τομή στην πηκτή. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως παρατίθεται παρακάτω:

### Πειραματική διαδικασία:

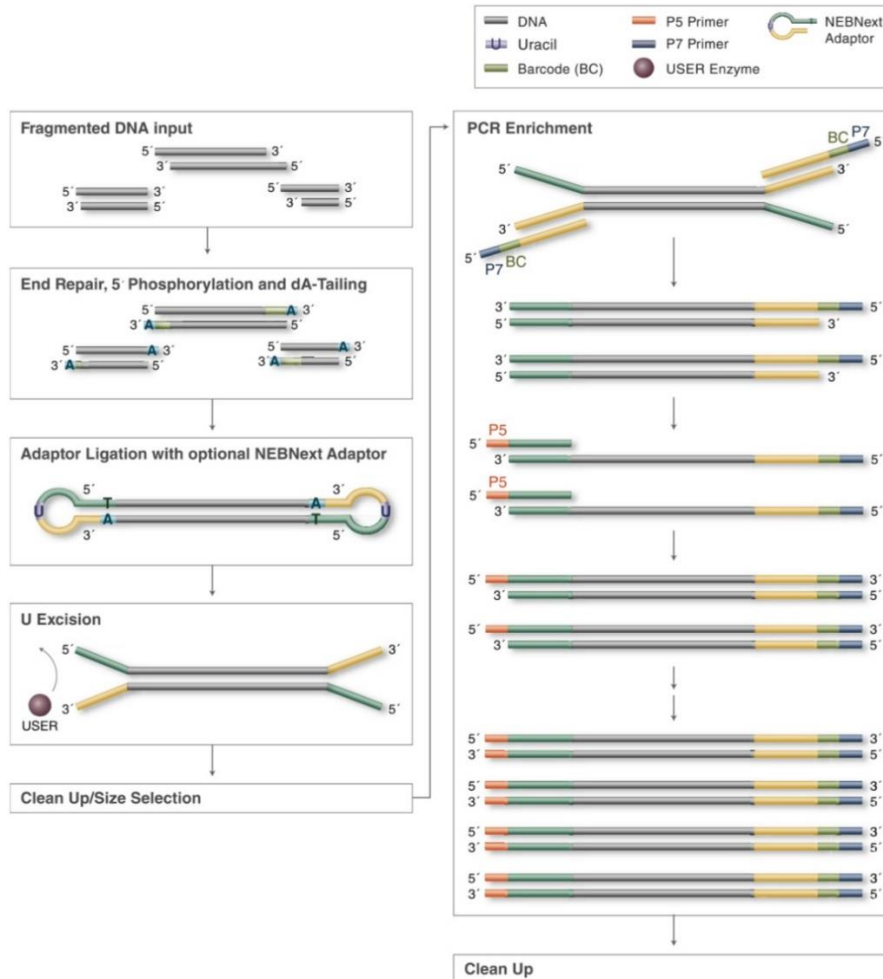
1. Ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR και απομόνωση από την πηκτή
2. Ζύγιση του απομονωμένου προϊόντος και προσθήκη τετραπλάσιου όγκου από το δείγμα Monarch Gel Dissolving Buffer σε κάθε σωληνάριο
3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 55°C και έντονη ανάδευση(vortex) ανά 3 λεπτά μέχρι να διαλυθεί εντελώς η γέλη.
4. Μεταφορά του διαλύματος σε μικροστήλες, φυγοκέντρηση 1' και απόρριψη του υποκειμένου
5. Προσθήκη 200μl DNA Wash Buffer, φυγοκέντρηση 1' (16.000 rcf) και απόρριψη υποκειμένου
6. Επανάληψη βήματος 5
7. Προσθήκη 20μl Elution Buffer και φυγοκέντρηση 1' (16.000 rcf) για να γίνει η αποδέσμευση του DNA από τη στήλη

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καθαρισμένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση έντασης φθορισμού (Qubit® DNA BR Assay Kit), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2)

## 7. Προετοιμασία γενετικών βιβλιοθηκών προς αλληλούχηση μεγάλης κλίμακας

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πλατφόρμα MiSeq του οίκου Illumina. Η πλατφόρμα αυτή πραγματοποιεί αλληλούχηση των δειγμάτων με βάση την τεχνολογία αλληλούχησης με σύνθεση (Sequencing by Synthesis). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχηση είναι απαραίτητη η κατασκευή γενετικών βιβλιοθηκών. Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται αρχικά προετοιμασία των άκρων των δίκλωνων μορίων DNA, μέσω φωσφορυλίωσης του 5'

άκρου, και προσθήκης αδερίνης στο 3' άκρο. Εφόσον τα άκρα έχουν προετοιμαστεί κατάλληλα, συνδέονται ειδικά μόρια-προσαρμογείς, που δημιουργούν μια φουρκέτα στα άκρα του δίκλωνου μορίου, και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη ενός ενζύμου (USER), που κόβει τη φουρκέτα αυτή και επιτρέπει τη σύνδεση ενός ζεύγους μοριακών ταυτοτήτων, μοναδικών για κάθε δείγμα, μέσω των οποίων αναγνωρίζεται το δείγμα από τον αλληλουχητή (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Απεικόνιση σταδίων κατασκευής γενετικών βιβλιοθηκών

## 7.1 Προετοιμασία άκρων

### Πειραματική διαδικασία:

1. Σε νέα σωληνάρια, για το κάθε δείγμα προστίθενται:

*Πίνακας 14 Αντιδραστήρια για το στάδιο προετοιμασίας των άκρων κατά την κατασκευή γενετικών βιβλιοθηκών*

Αντιδραστήριο	Όγκος
End Prep Enzyme Mix	1,5μl
End Prep Reaction Buffer	3,5μl
DNA (85 ng)	Ποικίλει
H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 30μL

2. Έντονη ανάδευση με χρήση πιπέτας
3. Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

*Πίνακας 15 Συνθήκες επώασης στον θερμοκυκλοποιητή για το στάδιο προετοιμασίας των άκρων κατά την κατασκευή γενετικών βιβλιοθηκών*

Θερμοκρασία	Χρόνος
20°C	30 λεπτά
65°C	30 λεπτά
4°C	∞

## 7.2 Ενσωμάτωση του προσαρμογέα της Illumina

### Πειραματική διαδικασία:

1. Αραίωση του διαλύματος με τον προσαρμογέα (NEBNext Adaptor for Illumina), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας για 85ng DNA, προς τελική συγκέντρωση 1.5μM.
2. Παρασκευή μίγματος της αντίδρασης λιγάσης ως εξής:

Πίνακας 16 Αντιδραστήρια για το στάδιο της ενσωμάτωσης του προσαρμογέα κατά την κατασκευή γενετικών βιβλιοθηκών

Αντιδραστήρια	Όγκος ανα αντίδραση
NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	15μl
NEBNext Ligation Enhancer	0.5μl
NEBNext Adaptor for Illumina	15μl

3. Έντονη ανάδευση με χρήση πιπέτας
4. Προσθήκη 30μl από το μίγμα σε κάθε αντίδραση
5. Τοποθέτηση δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή για 15 λεπτά στους 20°C
6. Προσθήκη 1,5μl από το ένζυμο USER™
7. Επώαση για 15' στους 37°C σε θερμοκυκλοποιητή

### 7.3 Καθαρισμός των προϊόντων που έχουν προσλάβει τον προσαρμογέα

#### Πειραματική διαδικασία:

1. Καλή ανάδευση (vortex) των SPRIselect beads

*Τα SPRIselect beads είναι μαγνητικά σφαιρίδια που δεσμεύουν το DNA και επιτρέπουν το διαχωρισμό του από άλλα παραπροϊόντα της αντίδρασης.*

2. Προσθήκη των SPRIselect beads σε αναλογία 0,9 X του όγκου αντίδρασης σε κάθε δείγμα
3. Επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνήτη με οπές για φιαλίδια 0.2 mL για 5 λεπτά
5. Μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, αφαίρεση του υπερκειμένου
6. Προσθήκη 180μl αιθανόλης (80% v/v) για 30'' και έπειτα αφαίρεση υπερκειμένου
7. Επανάληψη βήματος 6
8. Αναμονή 5 λεπτών, με ανοιχτά καπάκια, προς πλήρη εξάτμιση της περίσσειας αιθανόλης
9. Έκλυση του DNA με 8,5μl WFI
10. Ανάδευση με την πιπέτα
11. Επώαση για 2' σε θερμοκρασία δωματίου
12. Τοποθέτηση δειγμάτων ξανά στο μαγνήτη, για 5 λεπτά
13. Μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές, μεταφέρουμε το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA, σε νέα σωληνάρια

## 7.4 Προσθήκη μοριακών δεικτών και εμπλουτισμός των βιβλιοθηκών με PCR

### Πειραματική διαδικασία:

1. Προετοιμάζουμε εκ νέου σωληνάρια για το κάθε δείγμα και προσθέτουμε:

*Πίνακας 17 Αντιδραστήρια για το στάδιο προσθήκης μοριακών δεικτών κατά την κατασκευή γενετικών βιβλιοθηκών*

Αντιδραστήριο	Όγκος
Adaptor Ligated DNA Fragments	7,5 μl
NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	12,5 μl
Εκκινητής i7	2,5 μl
Εκκινητής i5	2,5 μl

2. Τοποθέτηση δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

*Πίνακας 18 Συνθήκες επώασης στον θερμοκυκλοποιητή για την προσθήκη των μοριακών δεικτών*

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	98°C	30 δευτερόλεπτα
Αποδιάταξη	98°C	10 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός/Επιμήκυνση	65°C	75 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	65°C	5λεπτά
Αποθήκευση αντίδρασης	4°C	∞

} 10X

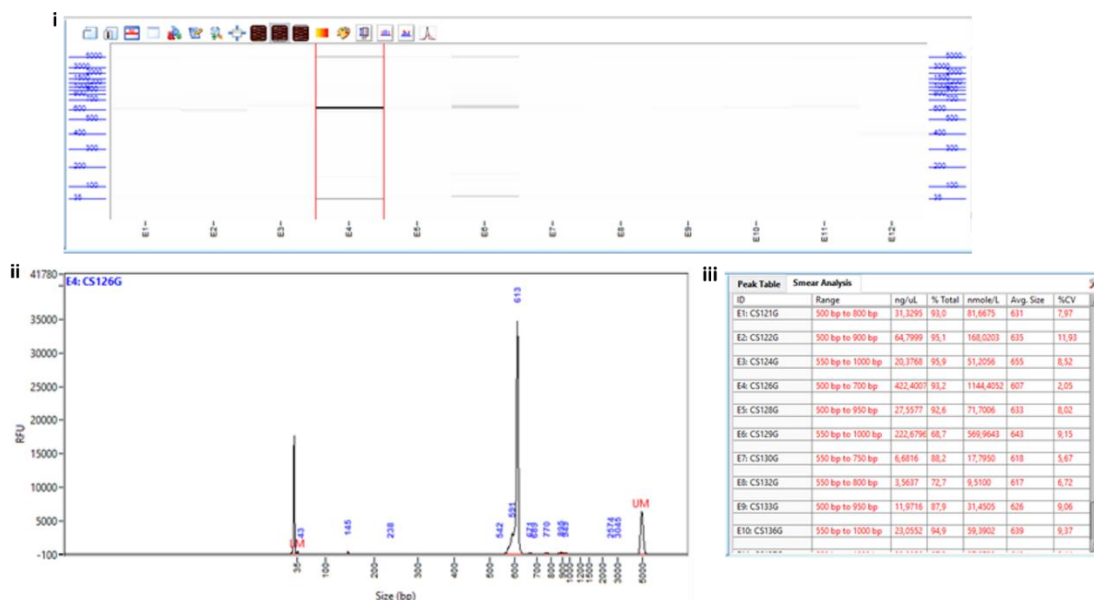
## 7.5 Καθαρισμός της αντίδρασης PCR

Γίνεται καθαρισμός των προϊόντων με μαγνητικά σφαιρίδια (SPRIselect beads), με την ίδια μέθοδο, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 7.3



## 8. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των βιβλιοθηκών

Για την εκτίμηση της ποιότητας και της καθαρότητας των βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Fragment Analyser™ Automated CE System (Agilent Biotechnologies, USA). Το όργανο αυτό αποτελεί ένα σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και ο διαχωρισμός των θραυσμάτων DNA γίνεται με βάση το μέγεθος τους, ωστόσο με πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την απλή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Για τις ανάγκες τις παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το DNF-915 dsDNA Reagent Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω της εφαρμογής Agilent-ProSize data analysis software (version 4.0.2.7). Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται ενδεικτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τον από τον ποιοτικό έλεγχο των βιβλιοθηκών στο Fragment Analyser™ Automated CE System (Εικόνα 19)



Εικόνα 19 Παράδειγμα των αποτελεσμάτων από τον ποιοτικό έλεγχο των βιβλιοθηκών στο Fragment Analyser™ Automated CE System. Προκύπτουν: i) Γράφημα ηλεκτροφόρησης, όπου φαίνεται η επιθυμητή ζώνη, καθώς και τα όρια των δεικτών (ανώτατο και κατώτατο), με βάση τον ladder ii) Γράφημα που αναφέρεται στο φάσμα απορρόφησης, όπου φαίνεται μια διακριτή κορυφή, που αντιστοιχεί στη βιβλιοθήκη (μήκους 613 bp), εκατέρωθεν της οποίας υπάρχουν οι δύο κορυφές που αντιστοιχούν στους δύο δείκτες (ανώτατο και κατώτατο). iii) Smear analysis: Οριοθέτηση (σε bp) της περιοχής στην οποία αντιστοιχεί η βιβλιοθήκη, που επιτρέπει τον υπολογισμό του ποσοστού του δείγματος που αντιστοιχεί στην βιβλιοθήκη

## 9. Παρασκευή ισομοριακού μίγματος και ποσοτικοποίηση με qPCR

Σε περίπτωση αλληλούχησης πολλαπλών δειγμάτων παρόμοιας συγκέντρωσης και μεγέθους συστήνεται η δημιουργία ενός ισομοριακού μίγματος, στο οποίο εμπεριέχεται ο ίδιος αριθμός moles από κάθε βιβλιοθήκη, έτσι ώστε κάθε δείγμα να αντιπροσωπεύεται ισότιμα κατά την αλληλούχηση.

## 9.1 Ποσοτικοποίηση με qRT-PCR

Κατόπιν ετοιμασίας του ισομοριακού μίγματος, είναι απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Η μέτρηση φθορισμού με Qubit, όπως στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω έχει περιορισμούς, καθώς η μέτρηση που λαμβάνεται, αντιστοιχεί στο συνολικό DNA που περιέχεται στο διάλυμα και όχι απαραίτητα στα μόρια που έχουν προσλάβει προσαρμογέα και μοριακούς δείκτες και άρα θα αλληλουχηθούν. Για το σκοπό αυτό ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ισομοριακού μίγματος πραγματοποιήθηκε με μία αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) και χρησιμοποιήθηκε ειδικά σχεδιασμένο kit (Library quantification kit, KAPA Biosystems) το οποίο χρησιμοποιεί εκκινητές που υβριδίζονται μόνο σε μόρια βιβλιοθηκών που έχουν στα άκρα τους προσαρμογείς, ώστε η μέτρηση της συγκέντρωσης να αντιστοιχεί μόνο στα μόρια που θα προσδεθούν στη flow cell κατά την αλληλούχηση. Χρησιμοποιούνται 4 standards, συγκεντρώσεων 20pM, 2pM, 0,2pM και 0,02pM, ώστε να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Απαραίτητη είναι η μετατροπή της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών από ng/μL σε nM. Η σχέση δίνεται από τον τύπο:

<b>Molarity (nM) =</b>	$\frac{\text{Συγκέντρωση βιβλιοθήκης (ng/}\mu\text{L)} \times 10^6}{660 \text{ g/mol} \times \text{Μέσο μέγεθος ισομοριακού μίγματος (bp)}}$
<i>660 g/mol: Μέση γραμμομοριακή μάζα των τεσσάρων αζωτούχων βάσεων του DNA</i>	

Το ισομοριακό μίγμα των βιβλιοθηκών αραιώνεται επίσης ανάλογα, σε WFI.

Στο kit (Library quantification kit, KAPA Biosystems) υπάρχει μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία προσδέεται μη ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA, και η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αύξησης του αριθμού των δίκλωνων μορίων.

### Πειραματική διαδικασία:

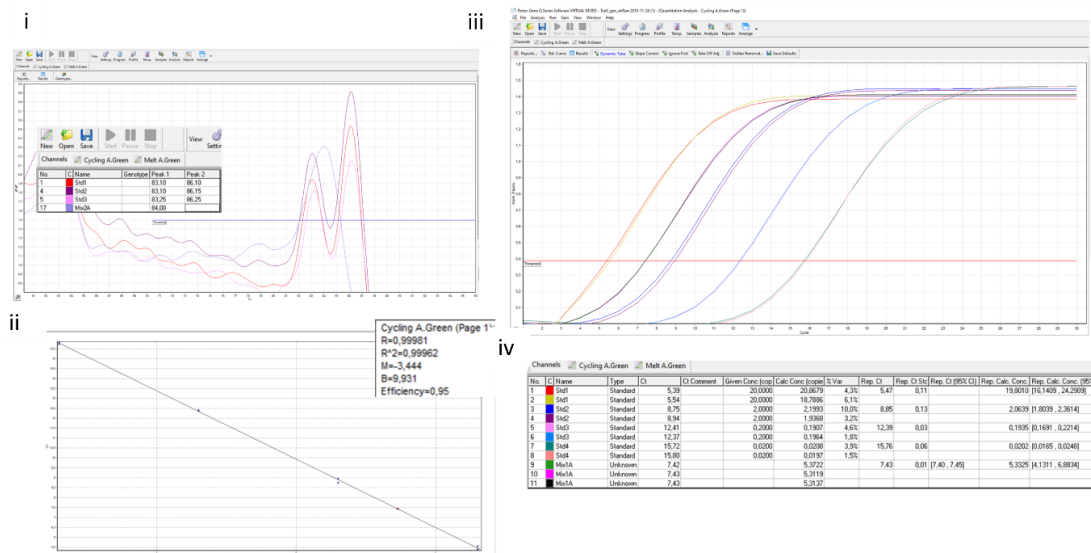
1. Ανάμιξη 5ml 2X KAPA SYBR FAST qPCR-Master mix με 1ml 10X Primer Premix
2. Χρήση 6μl από το παραπάνω μίγμα και ανάμιξη με 4μl από το αραιωμένο δείγμα
3. Κάθε δείγμα που φορτώνεται στην πλάκα, εισάγεται 2 φορές, για έλεγχο της επαναληψιμότητας του αποτελέσματος.  
Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται WFI, με χρήση του οποίου είχαν γίνει και οι αραιώσεις
4. Τοποθέτηση στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 19 Συνθήκες αντίδρασης στον θερμοκυκλοποιητή για την ποσοτική PCR

	Θερμοκρασία	Χρόνος	} 35X
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	5 λεπτά	
Αποδιάταξη	95 °C	30 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινήτων/επιμήκυνση	60 °C	45 δευτερόλεπτα	
Ανάλυση καμπύλης τήξης	65-95 °C		

## 9.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR

Για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της αντίδρασης ελέγχεται η ποιότητα της πρότυπης καμπύλης (ii). Συγκεκριμένα, ελέγχεται η απόδοση της αντίδρασης, η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 90% και ο συντελεστής  $R^2$ , ο οποίος πρέπει να είναι κοντά στην τιμή 1. Η καθαρότητα ελέγχεται μέσω της καμπύλης τήξης(i), στην οποία απεικονίζεται η εναλλαγή στην ένταση φθορισμού, που προκύπτει από την σύνδεση των μορίων χρωστικής με τα δίκλινα μόρια DNA. Επιπλέον προκύπτει και μια καμπύλη ενίσχυσης (iii), στην οποία απεικονίζεται το όριο πάνω από το οποίο λαμβάνεται υπόψιν το σήμα, και κάτω από το οποίο, θεωρείται θόρυβος. Από την καμπύλη ενίσχυσης προκύπτει και ο μέσος όρος των αντιγράφων (mean copies) που βρέθηκαν στο μίγμα (iv), (Εικόνα 20).



Εικόνα 20 Απεικόνιση αποτελεσμάτων ανάλυσης της ποσοτικής PCR, όπου φαίνεται η καμπύλη τήξης (i), η πρότυπη καμπύλη (ii), η καμπύλη ενίσχυσης (iii) και η τελική συγκέντρωση του δείγματος, ως ο μέσος όρος των 3 μετρήσεων που λαμβάνονται (iv).

Η συγκέντρωση της βιβλιοθήκης υπολογίζεται ως εξής:

<b>Molarity = (mean copies * 452 / Average size) * Συντελεστής αραίωσης</b>	
<b>Molarity</b>	Ζητούμενη συγκέντρωση
<b>mean copies</b>	Μέσος αριθμός αντιγράφων που υπολογίστηκαν
<b>452</b>	Μέσο μήκος ενός τμήματος DNA
<b>Average size</b>	Μέγεθος του προϊόντος, όπως υπολογίστηκε από το Fragment Analyzer
<b>Συντελεστής αραίωσης</b>	Παράγοντας αραίωσης για υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρχικού μίγματος

## 10. Αλληλούχηση μεγάλης κλίμακας

Η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών έγινε σε σύστημα αλληλούχησης επόμενης γενιάς της Illumina μέσω της μεθοδολογίας αλληλούχησης με σύνθεση (sequence by synthesis, SBS). Για την αλληλούχηση το μίγμα των βιβλιοθηκών υφίσταται θερμική και χημική αποδιάταξη και στη συνέχεια αναμιγνύεται με το διάλυμα υβριδισμού σε αναλογίες κατάλληλα υπολογισμένες ανάλογα με την επιθυμητή κάλυψη αλληλούχησης/δείγμα (μέγιστος αριθμός reads 23,000,000).

### Πειραματική διαδικασία:

1. Αποδιάταξη μέρους του μίγματος με κατάλληλη ποσότητα 0,2N NaOH (συγκέντρωση NaOH στο τελικό διάλυμα να μην υπερβαίνει το 1mM).
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
3. Αραίωση του αποδιαταγμένου μίγματος με διάλυμα υβριδισμού HT1 (Miseq reagent kit-Illumina)
4. Υπολογισμός της συγκέντρωσης του μίγματος και εκ νέου αραίωση όπου είναι απαραίτητο σε διάλυμα HT1, προς τελική συγκέντρωση 13pM.
5. Προσθήκη στο μίγμα ποσότητα της βιβλιοθήκης αναφοράς του βακτηριοφάγου PhiX προς τελικό όγκο 600μl
6. Επώαση στους 96°C για 3 λεπτά, ώστε να γίνει η θερμική αποδιάταξη
7. Τοποθέτηση δείγματος στην ειδική θέση στην κασέτα αντιδραστηρίων
8. Εισαγωγή της flow cell, της κασέτας και του Incorporation buffer (Miseq reagent kit-Illumina) στην πλατφόρμα Miseq και αλληλούχηση

## 11. Βιοπληροφορική ανάλυση

Μετά το πέρας της αλληλούχησης, η πλατφόρμα MiSeq, του οίκου Illumina, προσφέρει μία αρχική αξιολόγηση και επεξεργασία των αλληλουχιών που προέκυψαν. Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται αντιστοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν με τα δείγματα της μελέτης, με βάση τις μοριακές ταυτότητες που

χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή βιβλιοθηκών. Στη συνέχεια, απορρίπτονται αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας, αλλά και τμήματα που αντιστοιχούν στον προσαρμογέα (adaptor) ή στους μοριακούς δείκτες (indices).

## 11.1 Ποιοτικός έλεγχος και σύνθεση των αντιπαράλληλων reads

Από τη στιγμή που έχει γίνει λήψη των δεδομένων από την αλληλούχηση, το πρώτο βήμα που ακολουθεί είναι η χρήση ενός ειδικά σχεδιασμένου αλγορίθμου βιοπληροφορικής (Stitching). Ο αλγόριθμος αυτός, αρχικά, φιλτράρει τις αλληλουχίες ποιοτικά, βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων (πίνακας 20), αλλά και βάσει του μήκους κάθε αλληλουχίας. Επιπλέον, ο αλγόριθμος πραγματοποιεί και τη σύνθεση των δύο αντιπαράλληλων διαβασμάτων (R1 και R2), που προκύπτουν από την αλληλούχηση, σε ενιαία αλληλουχία, με βάση την αλληλοεπικάλυψη τους, στην περιοχή CDR3. Τέλος, οι νεοσυντιθέμενες αλληλουχίες περνούν εκ νέου ποιοτικό έλεγχο και προκύπτουν 10 τελικά αρχεία, ως έξοδος του αλγορίθμου για κάθε δείγμα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τα επόμενα βήματα της ανάλυσης.

Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά τα κριτήρια ελέγχου των αλληλουχιών πριν, κατά, αλλά και μετά την σύνθεση ενιαίας αλληλουχίας.

*Πίνακας 20 Κριτήρια ποιότητας των αλληλουχιών, που χρησιμοποιεί ο αλγόριθμος. Αρχικά ελέγχονται ποιοτικά τα δύο διαφορετικά διαβάσματα R1, R2 (Α), στη συνέχεια γίνεται η σύνθεση ενιαίας αλληλουχίας (Β) και τέλος αξιολογείται ποιοτικά και η προκύπτουσα, από τη σύνθεση, αλληλουχία (Γ).*

<b>A. Ποιοτικός έλεγχος μεμονωμένων διαβασμάτων R1, R2</b>	
Ελάχιστο επιτρεπτό μήκος αρχικής αλληλουχίας	150 nt
Ελάχιστο επιτρεπτό όριο αξιολόγησης ποιότητας νουκλεοτιδίων (Q score)	14
Μέγιστο ποσοστό αποδεκτών νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας	5%
Μέγιστο ποσοστό αποδεκτών μη ταυτοποιημένων νουκλεοτιδίων (N)	1%
<b>B. Κριτήρια για σύνθεση των R1, R2 προς μία ενιαία αλληλουχία</b>	
Ελάχιστο μήκος αλληλοεπικάλυψης των δύο διαβασμάτων (R1, R2)	200
Μέγιστο ποσοστό αποδεκτών αταίριαστων ζευγών βάσεων, για κάθε θέση	25%
Ελάχιστος αποδεκτός αριθμός ταιριαστών ζευγών βάσεων για κάθε θέση	10
<b>Γ. Τελική αξιολόγηση νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας</b>	
Μέση ποιότητα νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας (Q score)	25
Ελάχιστο μήκος νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας	280bp
Μέγιστο αποδεκτό ποσοστό νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας	7%
Μέγιστο αποδεκτό ποσοστό νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας στην περιοχή CDR3	0,5%

## 11.2 IMGT / High V-Quest

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο IMGT / High V-Quest, του IMGT (International imMunoGeneTics system). Το εργαλείο αυτό παρέχει τη δυνατότητα ανοσογενετικού χαρακτηρισμού των δεδομένων που προκύπτουν από αλληλουχήσεις επόμενης γενιάς, αλλά και προσδιορισμού των γονιδίων IGHV, IGHD, IGHJ. Οι πληροφορίες αυτές προκύπτουν από την ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών των τριών γονιδίων με αυτών της βλαστικής σειράς, παρέχοντας έτσι πληροφορίες σχετικά με μεταλλακτικό φορτίο, αλλά και την ακριβή θέση κάθε μετάλλαξης. Δίνονται επίσης η αμινοξική και νουκλεοτιδική αλληλουχία των CDR και FR περιοχών. Συγκεκριμένα για τη CDR3, δίνονται και πληροφορίες σχετικά με το μήκος και το μοριακό βάρος την αλληλουχίας. Τα αρχεία εξόδου από το εργαλείο αυτό χρησιμοποιούνται για την συνέχεια της βιοπληροφορικής ανάλυσης, σε ειδικά σχεδιασμένο εργαλείο (tripr-tool).

## 11.3 TRIP-tool (T cell Receptor/Immunoglobulin Profiler)

Το τελικό φιλτράρισμα των αλληλουχιών γίνεται μέσω του **TRIP-R (T-cell Receptor/Immunoglobulin Profiler)**, ενός εργαλείου, σχεδιασμένου από την ομάδα του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB), στη γλώσσα προγραμματισμού R, που τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί τα αρχεία εξόδου από το IMGT / High V-Quest για ανοσογενετική ανάλυση δεδομένων. Το εργαλείο αυτό παρέχει φιλτράρισμα δύο σταδίων.

Κατά το πρώτο στάδιο (Pre-selection) φιλτράρονται οι αλληλουχίες με βάση τη λειτουργικότητα του V-γονιδίου, την ύπαρξη παραγωγικών αναδιατάξεων και CDR3 περιοχών που έχουν κυστεΐνη (C) στη θέση 104 και τρυπτοφάνη (W) στη θέση 118.

	Preselection parameters	Filter Out	Filter In
1	Functional V-Gene	1	199700
2	CDR3 with no Special Characters	724	198976
3	Productive Sequences	14676	184300
4	CDR3 start with C and end with W	69037	115405

*Εικόνα 21 Ενδεικτικό παράδειγμα οπτικοποίησης των φίλτρων από το στάδιο Pre-selection του trip-r, όπου φαίνεται ο ακριβής αριθμός αλληλουχιών που περνούν κάθε φίλτρο (overview file)*

Στο δεύτερο στάδιο (Selection), οι αλληλουχίες φιλτράρονται με βάση το V-γονίδιο, που εκφράζεται στο εκάστοτε δείγμα (γνωστό για τους ασθενείς της συγκεκριμένης μελέτης) και με βάση την ομολογία της CDR3 περιοχής με τη βλαστική σειρά (παραμένουν οι αλληλουχίες με ομολογία 85% και άνω).

	Selection parameters	Filter Out	Filter In
1	V-REGION identity from 85% to 100%	116	115289
2	V Gene: IGHV3-7	107401	7888

Εικόνα 22 Ενδεικτικό παράδειγμα οπτικοποίησης των φίλτρων από το στάδιο Selection του trip-r, όπου φαίνεται ο ακριβής αριθμός αλληλουχιών που περνούν κάθε φίλτρο (overview file)

Επιπλέον, μέσω του εργαλείου αυτού, μπορούν να δοθούν πληροφορίες σχετικά με την κλωνικότητα του ρεπερτορίου, τον αριθμό των κλωνοτύπων, την αλληλουχία της CDR3 περιοχής του κυρίαρχου κλωνοτύπου, αλλά και τη συχνότητά του.

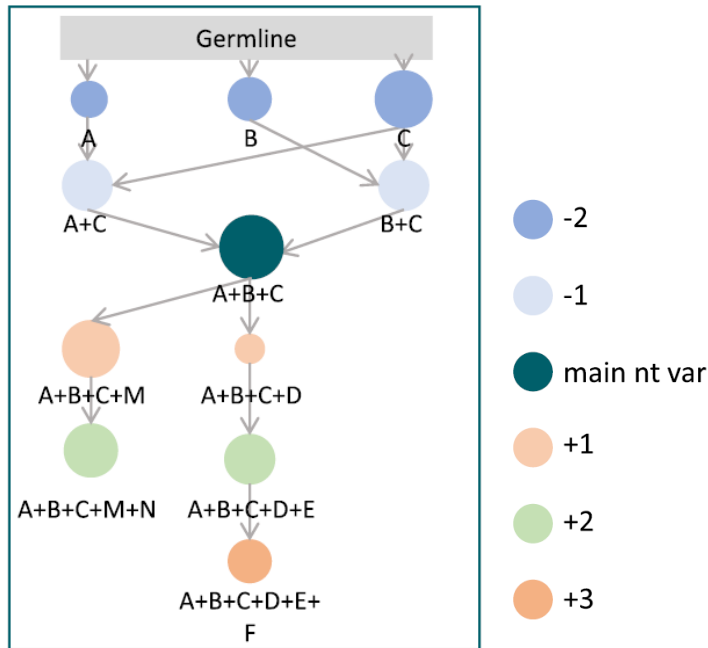
Τέλος, δίνονται και οι μεταλλάξεις σε αμινοξικό και νουκλεοτιδικό επίπεδο, η θέση και η συχνότητα εμφάνισής τους.

Τα αρχεία εξόδου του εργαλείου είναι της μορφής .txt και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια της ανάλυσης.

#### 11.4 IgIDivA (Immunoglobulin Intracloonal Diversification Analysis)

Τα αρχεία εξόδου από το εργαλείο trip-r, χρησιμοποιήθηκαν ως αρχεία εισόδου για το εργαλείο IgIDivA (Immunoglobulin Intracloonal Diversification Analysis)<sup>87</sup>, για ανάλυση της ενδοκλωνικής ετερογένειας. Το εργαλείο αυτό παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στη μεταβλητή περιοχή των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, καθώς και οπτικοποίησης της πορείας της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης. Επιτρέπει έτσι την παρακολούθηση εξέλιξης του κλώνου (διαγράμματα-γράφοι) (Εικόνα 23), του προτύπου συσσώρευσης μεταλλάξεων και μέσω ειδικών μετρικών, τον έλεγχο της πολυπλοκότητας και της μετέπειτα εξέλιξής του.





Εικόνα 23 Παράδειγμα δικτύου εξέλιξης κλωνοτύπων που προκύπτει από το εργαλείο IgIDivA. Ως ‘main nt var’ απεικονίζεται ο κυρίαρχος κλωνοτύπος, ο οποίος είναι και ο πιο συχνός. Ο κλωνοτύπος στο παράδειγμα αυτό περιέχει τις μεταλλάξεις (A+B+C). Αυτές οι μεταλλάξεις τον διαφοροποιούν από τη θλαστική σειρά (germline). Με ανοιχτό μπλε χρώμα και στο αμέσως προηγούμενο επίπεδο από τον κύριο κλωνοτύπο (-1) είναι δύο προγενέστεροι κλώνοι οι οποίοι περιέχουν 2 εκ των 3 μεταλλάξεων του κυρίαρχου κλωνοτύπου (A+C, B+C). Αντίστοιχα, με πιο σκούρο μπλε χρώμα, και δύο στάδια πριν τον κυρίαρχο κλωνοτύπο (-2) βρίσκονται επιμέρους κλώνοι, που διαφέρουν με τη θλαστική σειρά κατά μια μετάλλαξη (A,B,C). Ο κυρίαρχος κλωνοτύπος περιέχει, έτσι το σύνολο των μεταλλάξεων των δύο πρώτων σταδίων (A+B+C). Σε κάθε επίπεδο μετά από τον κυρίαρχο κλωνοτύπο (+1, +2, +3, +4) προστίθεται και άλλη μία μετάλλαξη, δίνοντας νέους ‘υποκλώνους’, οι οποίοι σχετίζονται με τον κυρίαρχο, αλλά διαφέρουν και κατά μία, δύο ή τρεις μεταλλάξεις από αυτόν.

## 12. Ορισμοί

Με τον όρο ‘κλωνοτύπος’ ορίζεται μια μοναδική νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί σε παραγωγική αναδιάταξη IGHV-IGHD-IGHJ του BκΥ, που χαρακτηρίζει το εκάστοτε Β-κύτταρο. Ο ‘κυρίαρχος κλωνοτύπος’ είναι ο κλωνοτύπος εκείνος, που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο εκάστοτε δείγμα και χαρακτηρίζει τον ΧΛΛ κλώνο. Στο πλαίσιο της ανάλυσης ενδοκλωνικής ετερογένειας του ΧΛΛ κλώνου, ορίστηκαν ως ‘υποκλωνοτύποι’, οι κλωνοτύποι εκείνοι που ομοιάζουν σημαντικά με τον επικρατή (ίδιο γονίδιο IGHV και ομοιότητα 80% στη CDR3 περιοχή) και θεωρούνται συγγενείς αυτού στα πλαίσια της εξέλιξης του λευχαιμικού κλώνου ύστερα από πιθανώς εμμένουσα αντιγονική διέγερση.



### 13. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε μέσω του εργαλείου GraphPad Prism (v.8.0.2). Για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης, για τις ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν μέση και διάμεση τιμή, καθώς και το εύρος κατανομής. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τρεις μη παραμετρικές μέθοδοι. Αρχικά, αξιοποιήθηκε η μη παραμετρική μέθοδος «**Kruskal Wallis test**», η οποία χρησιμοποιείται για σύγκριση τριών ή παραπάνω ανεξάρτητων ομάδων (Οι ομάδες μπορούν να περιέχουν είτε ίδιο είτε διαφορετικό αριθμό τιμών). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος «**Mann–Whitney test**», η οποία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ δύο ομάδων τιμών, ανεξάρτητων μεταξύ τους. Τέλος, για τη σύγκριση εξαρτημένων μεταβλητών, έγινε χρήση της μεθόδου «**Friedman test**».

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Ανοσογενετικές ενδείξεις μεγάλης κλίμακας για *in vivo* εναλλαγή ισοτύπου στη ΧΛΛ

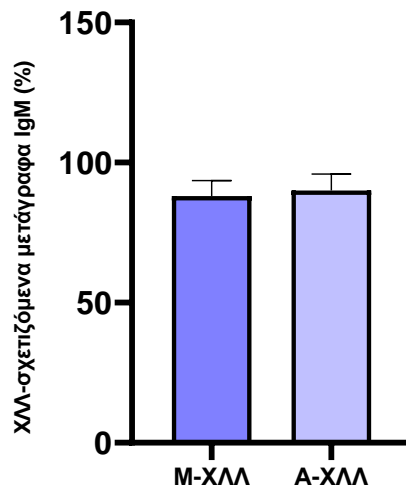
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν, πως ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μάλιστα κυρίως ασθενείς που ανήκουν στην υποομάδα της Α-ΧΛΛ και εκφράζουν IgM ισοτύπο παρουσιάζουν φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου, όπου ένα τμήμα του ΧΛΛ κλώνου υπόκειται σε μεταστροφή του ισοτύπου της ανοσοσφαιρίνης από IgM σε IgG ή/και IgA. Η παρουσία των μεταγράφων/κυττάρων αυτών έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με ΧΛΛ, ωστόσο οι μέχρι τώρα μελέτες είναι αρκετά περιορισμένες λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων αλλά και λόγω των τεχνολογιών μικρής κλίμακας που εφαρμόζονταν. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, προσπαθώντας να προσπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί, μελετήθηκαν τα εν λόγω φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου, αξιοποιώντας τις δυνατότητες που προσφέρει η αλληλούχηση μεγάλης κλίμακας.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα δείγματα περιφερικού αίματος από 70 ασθενείς, για τους οποίους έγινε ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ του BκΥ και για τα τρία διαφορετικά μεταγράφα («μ», «γ», «α») (70\*3=210 δείγματα). Ως αρνητικά, χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα που δεν έδωσαν προϊόν ενίσχυσης για τα «γ», και «α» μεταγράφα, ενώ όσα έδωσαν προϊόν προχώρησαν σε αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Illumina, MiSeq) και αξιολογήθηκαν μετέπειτα για την παρουσία τέτοιων μεταγράφων.

#### 1.1 Διαφορετικά πρότυπα έκφρασης εναλλακτικών Ig-μεταγράφων μεταξύ ασθενών Α-ΧΛΛ/Μ-ΧΛΛ

Από την αλληλούχηση προέκυψαν συνολικά 33,032,854 αλληλουχίες (διάμεση τιμή 169.000|εύρος 29.394-727.793). Από αυτές, οι αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν σε παραγωγικές αναδιατάξεις ήταν συνολικά 20,563,741 (διάμεση τιμή 100,409|εύρος 788-320,999) οι οποίες αξιοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Αρχικά, έγινε η ταυτοποίηση του κύριου κλωνοτύπου (ΧΛΛ-σχετιζόμενου) στα μεταγράφα «μι» και στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ύπαρξή του, στα αντίστοιχα ρεπερτόρια των «γάμμα» και «άλφα» μεταγράφων. Στα ρεπερτόρια των «μι» μεταγράφων, η διάμεση συχνότητα του ΧΛΛ-σχετιζόμενου κλωνοτύπου ήταν 94.1%, επιβεβαιώνοντας έτσι το μονοκλωνικό προφίλ που αναμενόταν και χαρακτηρίζει τα ρεπερτόρια της ΧΛΛ (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Διαγραμματική απεικόνιση σύγκρισης της συχνότητας εμφάνισης του επικρατούς κλωνοτύπου στα IgM μετάγραφα μεταξύ ασθενών που πάσχουν από M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ. Η διάμεση συχνότητα είναι και στις δύο κατηγορίες ~94%

Ακολουθως, αναζητήθηκε ο ΧΛΛ-σχετιζόμενος κλωνοτύπος στα ρεπερτόρια των «γάμμα» και «άλφα» μεταγράφων, πρώτα με βάση το γονίδιο IGHV μαζί με την αμινοξική αλληλουχία της περιοχής CDR3 και στη συνέχεια σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

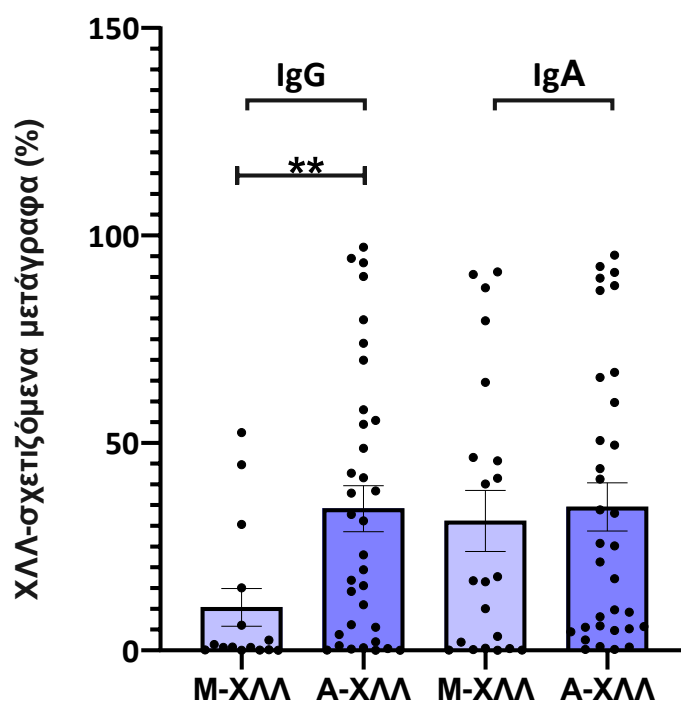
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως, η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισότυπου (με συχνότητα μεγαλύτερης του 1%). Συγκεκριμένα, από τους 70 ασθενείς, οι 38 (54,3%) εμφάνισαν εναλλακτικά «γάμμα» μετάγραφα, ενώ 44 (62,9%) παρουσίασαν εναλλακτικά «άλφα» μετάγραφα.

Εστιάζοντας στις δύο επιμέρους κατηγορίες της ΧΛΛ (M-ΧΛΛ, A-ΧΛΛ) παρατηρούμε ότι 28/39 ασθενείς που ανήκουν στην A-ΧΛΛ παρουσιάζουν εναλλακτικά IgG μετάγραφα (71.8%), ενώ οι 25/39 παρουσιάζουν εναλλακτικά IgA μετάγραφα (64.1%). Αντίθετα, μόνο 10/31 ασθενείς με M-ΧΛΛ, εμφανίζουν εναλλακτικά IgG μετάγραφα (32.3%), ενώ 20/31 παρουσιάζουν εναλλακτικά IgA μετάγραφα (64.5%) (Πίνακας 21).

Πίνακας 21 Ποσοστά εναλλακτικών μεταγράφων, διάμεση συχνότητα και εύρος

	Μ-ΧΛΛ		Α-ΧΛΛ	
	Αριθμός ασθενών	Διάμεση συχνότητα (Εύρος)	Αριθμός ασθενών	Διάμεση συχνότητα (Εύρος)
<b>Εναλλακτικά IgG μεταγράφα</b>	10/31 (32,3%)	37.53 (1.4-94.04)	28/39 (71,8%)	38.15 (1.11-97.16)
<b>Εναλλακτικά IgA μεταγράφα</b>	20/31 (64,5%)	41.48 (1.98-91.21)	25/39 (64,1%)	33.46 (2.51-92.5)

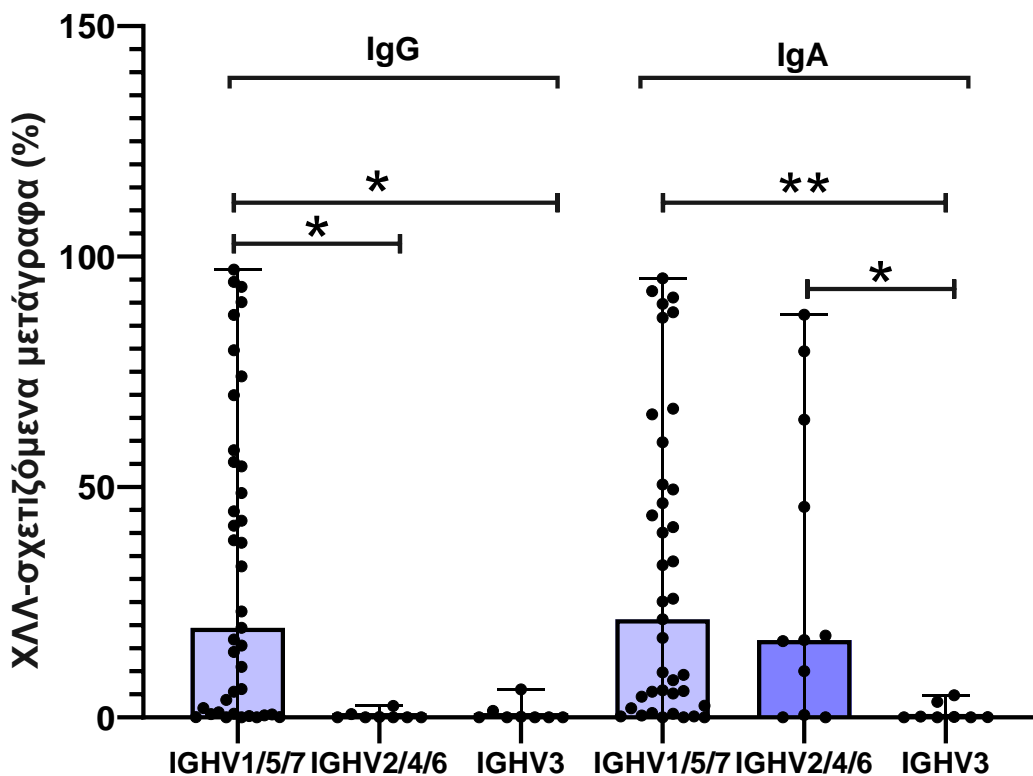
Παρατηρήθηκε, πως η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου εναλλαγής ιστύπου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (Μ-ΧΛΛ/Α-ΧΛΛ). Συγκεκριμένα η συχνότητα εμφάνισης IgG εναλλακτικών μεταγράφων φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερη στους ασθενείς με Α-ΧΛΛ, σε σχέση με τους ασθενείς που άσχουν από Μ-ΧΛΛ ( $p=0.06$ ) (Εικόνα 25). Αντίθετα, η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου προς IgA μεταγράφα δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων (Εικόνα 25).



Εικόνα 25 Διαγραμματική απεικόνιση σύγκρισης έκφρασης IgG και IgA εναλλακτικών μεταγράφων μεταξύ ασθενών που πάσχουν από Α-ΧΛΛ και Μ-ΧΛΛ. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.06$ , \*\*) όσον αφορά τα IgG μεταγράφα, γεγονός που δεν συμβαίνει στα IgA μεταγράφα.

## 1.2 Ασθενείς που εκφράζουν γονίδια των υποομάδων IGHV1/5/7 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα εναλλακτικών μεταγράφων

Έπειτα, ελέγχθηκε αν η παρουσία εναλλαγμένων μεταγράφων συσχετίζεται με το γονίδιο IGHV γονίδιο που εκφράζει ο ΧΛΛ κλώνος σε κάθε ασθενή. Σε πρώτο επίπεδο, οι ασθενείς της μελέτης κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη φυλογενετική ομάδα που ανήκει το γονίδιο IGHV που εκφράζουν (Φυλογενετική ομάδα 1: IGHV1/5/7, ομάδα 2: IGHV2/4/6, ομάδα 3: IGHV3). Η έκφραση εναλλακτικών «γάμμα» και «άλφα» μεταγράφων φαίνεται να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών που εκφράζουν IGHV γονίδια διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων. Συγκεκριμένα, η παρουσία εναλλακτικών «γάμμα» μεταγράφων φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς που εκφράζουν IGHV γονίδια της φυλογενετικής ομάδας 1 (IGHV1/5/7), σε σχέση με τους ασθενείς που εκφράζουν γονίδια των άλλων ομάδων ( $p=0.02$  και για τις 2 συγκρίσεις) (Εικόνα 26). Επίσης, και η εμφάνιση IgA μεταγράφων φαίνεται ιδιαίτερα αυξημένη στους ασθενείς αυτούς, συγκριτικά με τους ασθενείς που εκφράζουν γονίδια της υποομάδας IGHV3 ( $p=0.002$ ), ενώ δεν υπήρξε αντίστοιχη παρατήρηση συγκριτικά με ασθενείς που εκφράζουν γονίδια της φυλογενετικής ομάδας 2. Αντίθετα, στην περίπτωση των «άλφα» εναλλακτικών μεταγράφων παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που εκφράζουν γονίδια της υποομάδας IGHV3 και ασθενών που εκφράζουν γονίδια της φυλογενετικής ομάδας 2 ( $p=0.02$ ), κάτι που δεν παρατηρείται για τα εναλλακτικά «γαμμα» μεταγράφα (Εικόνα 26).

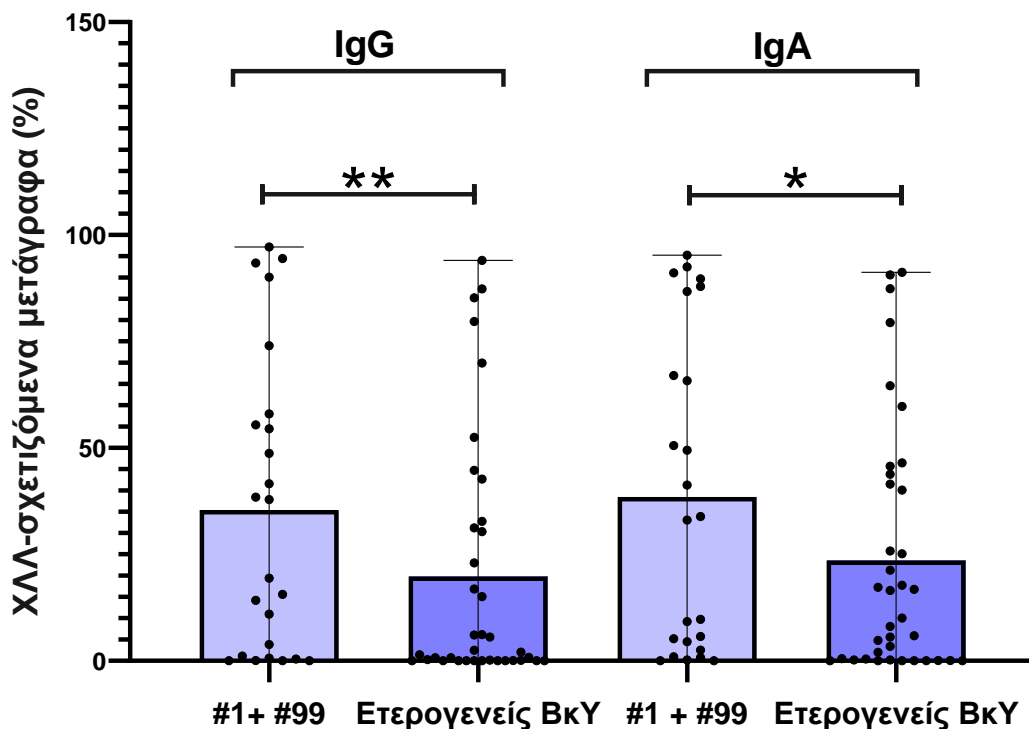


Εικόνα 26 Διαγραμματική απεικόνιση σύγκρισης έκφρασης εναλλακτικών IgG και IgA μεταγράφων μεταξύ ασθενών που εκφράζουν IGHV γονίδια διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων. Φαίνεται πως, οι ασθενείς που

εκφράζουν γονίδιο από την ομάδα 1 παρουσιάζουν εντονότερο φαινόμενο εναλλαγής ισοτύπου προς IgG μεταγράφα σε σχέση με ασθενείς που εκφράζουν γονίδιο της ομάδας 2 ( $p=0.02$ ) και με ασθενείς που εκφράζουν IGHV3 γονίδιο ( $p=0.02$ ). Αντιστοίχως, παρατηρείται πως οι ασθενείς που εκφράζουν γονίδιο από την ομάδα 1 παρουσιάζουν εντονότερο φαινόμενο εναλλαγής ισοτύπου προς IgA μεταγράφα σε σχέση με ασθενείς που εκφράζουν το IGHV3 γονίδιο ( $p=0.002$ ), ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία εναλλακτικών IgA μεταγράφων μεταξύ ασθενών που εκφράζουν γονίδια των ομάδων 1,2. Υπάρχει, όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών που εκφράζουν γονίδια της ομάδας 2 και ασθενών που εκφράζουν IGHV3 ( $p=0.02$ )

### 1.3 Ασθενείς που ανήκουν στα υποσύνολα #1, #99 παρουσιάζουν εντονότερα φαινόμενο *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου

Με αφορμή το εύρημα από τις προηγούμενες συγκρίσεις όπου ξεχώρισαν οι ασθενείς που εκφράζουν γονίδιο IGHV της φυλογενετικής ομάδας 1 έναντι των υπολοίπων, όσον αφορά την έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων, διερευνήθηκε η εμφάνιση του φαινομένου σε ασθενείς που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #1 και στο συγγενές αυτού, #99 (δορυφόρος του #1). Οι ασθενείς που ανήκουν στο υποσύνολο αυτό παρουσιάζουν επιθετική μορφή ΧΛΛ, με δυσμενή πρόγνωση και εκφράζουν αμετάλλακτα γονίδια IGHV της φυλογενετικής ομάδας 1 (IGHV 1/5/7). Για τον λόγο αυτό κατηγοριοποιήθηκαν εκ νέου τα δείγματα σε ασθενείς που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #99 και σε ασθενείς που εκφράζουν IGHV γονίδια της φυλογενετικής ομάδας 1, αλλά δεν ανήκουν σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο (ετερογενείς ΒκΥ). Η σύγκριση έδειξε πως, όντως, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών των υποσυνόλων #1, #99, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς που εκφράζουν ετερογενείς ΒκΥ, όσον αφορά την έκφραση εναλλακτικών IgA μεταγράφων ( $p=0.02$ ) (Εικόνα 27), αλλά κυρίως, όσον αφορά την έκφραση εναλλακτικών IgG μεταγράφων ( $p=0.003$ ) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27 Διαγραμματική απεικόνιση σύγκρισης έκφρασης εναλλακτικών IgG και IgA μεταγράφων μεταξύ ασθενών που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #1+#99, και ασθενών που εκφράζουν ετερογενείς BκΥ, όπου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.003$ ,  $p=0.02$ , αντίστοιχα).

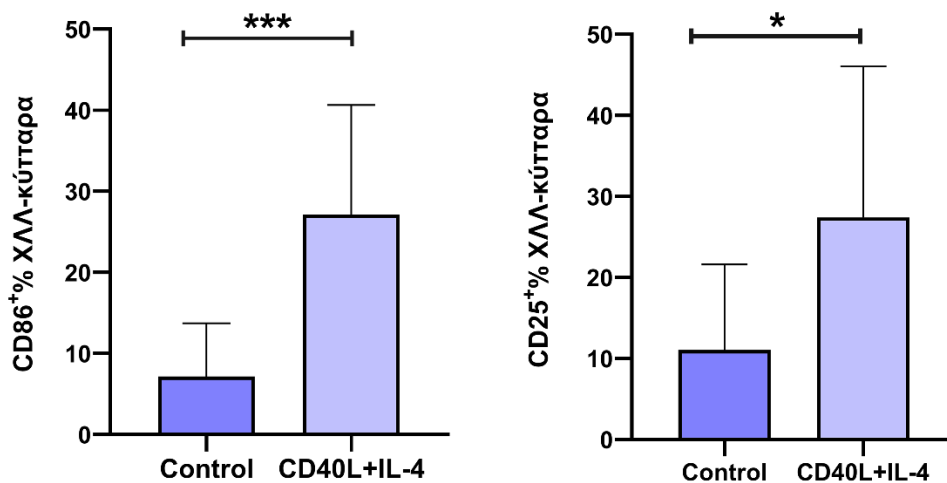
## 2. Επαγωγή έκφρασης AID σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πως οι ασθενείς με A-ΧΛΛ εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα mRNA από το ένζυμο δεαμινάσης της Κυτιδίνης (AID), το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση των μηχανισμών ωρίμανσης συγγένειας, δηλαδή της ΣΥΜ και της εναλλαγής ισοτύπου και οι ασθενείς αυτοί είναι που παρουσιάζουν και τα φαινόμενα in vivo εναλλαγής ισοτύπου. Για να εξεταστεί αν οι διαφορές μεταξύ A-ΧΛΛ και M-ΧΛΛ στην έκφραση της AID και κατ' επέκταση τα έντονα φαινόμενα εναλλαγής ισοτύπου, οφείλονται σε ενδογενείς μηχανισμούς των κυττάρων ΧΛΛ ή εξαρτώνται από ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος και να διαπιστωθεί, αν οφείλονται σε διαφορές σε αυτούς τους μηχανισμούς μεταξύ των δύο ομάδων, ελέγχθηκε αν μπορεί να επιτευχθεί in vitro αύξηση έκφρασης της AID μετά από διέγερση πρωτογενών κυττάρων ΧΛΛ και αν αυτή διαφέρει μεταξύ A-ΧΛΛ, M-ΧΛΛ. Η διέγερση έγινε με τον προσδέτη του υποδοχέα CD40 (CD40L), παρουσία IL-4, προσομοιάζοντας την ενεργοποίηση των ΧΛΛ κυττάρων, κατά την αλληλεπίδρασή τους με T λεμφοκύτταρα.

### 2.1 Η διέγερση κυττάρων ΧΛΛ μέσω του υποδοχέα CD40 οδηγεί σε ενεργοποίηση των ΧΛΛ κυττάρων

Τα πρωτογενή κύτταρα ΧΛΛ καλλιεργήθηκαν για 48h υπό διέγερση και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, κάνοντας χρήση των δεικτών ενεργοποίησης CD25 και CD86, για να διαπιστωθεί η επιτυχία της διέγερσης.

Πράγματι, τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων CD25, CD86 στα κύτταρα, που είχαν υποστεί διέγερση σημείωσαν σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τα αδιέγερτα κύτταρα, υποδηλώνοντας, πως η διέγερση του υποδοχέα CD40 στα B λεμφοκύτταρα οδηγεί, όντως, στην ενεργοποίησή τους (Εικόνα 28).



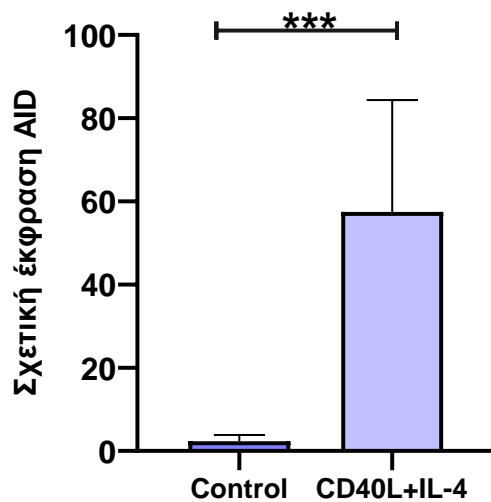
Εικόνα 28 Σύγκριση ποσοστών έκφρασης CD25, CD86 υποδοχέων μεταξύ διεγερμένων (CD40L+IL-4) και αδιεγερτων (Control) κυττάρων. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση και των δύο, μετά τη διέγερση.

## 2.2 Η έκφραση της AID, παρουσιάζει διαφορές στις ομάδες ασθενών μετά από διέγερση με CD40L και IL-4 σε *in vitro* καλλιέργεια

Μετά την επιβεβαίωση ενεργοποίησης των κυττάρων, ελέγχθηκαν, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, qRT-PCR, τα επίπεδα έκφρασης της AID, ώστε να διαπιστωθεί, εάν η ενεργοποίηση οδηγεί και σε αυξημένη έκφραση του ενζύμου.

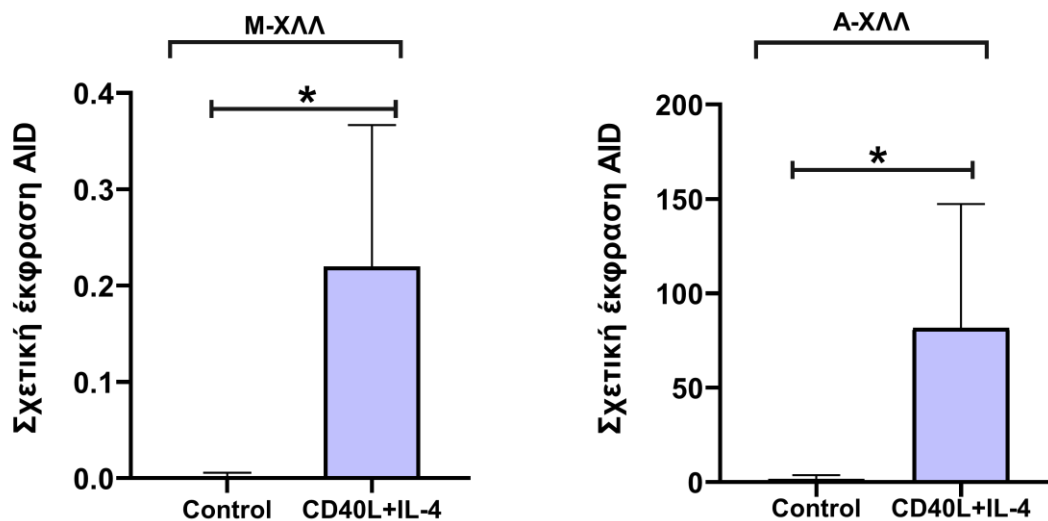
Παρατηρήθηκε, ότι σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών, η σχετική έκφραση της AID αυξάνεται, σημαντικά, στη διεγερμένη κατάσταση σε σύγκριση με την αδιεγερτη ( $p=0.0002$ ) (Εικόνα 29).





Εικόνα 29 Σύγκριση επιπέδων έκφρασης AID μεταξύ αδιεγέρτης (control) και διεγερμένης (CD40L +IL-4) κατάστασης

Στη συνέχεια, συγκρίνοντας την έκφραση της AID μετά τη διέγερση στις διαφορετικές ομάδες Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ, παρατηρήθηκε, πως πράγματι, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η διέγερση προκαλεί πολύ εντονότερη αύξηση έκφρασης της AID, στους ασθενείς που πάσχουν από Α-ΧΛΛ ( $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ stim}/2^{-\Delta\Delta Ct \text{ ctrl}}}=53.1$ ) σε σχέση με αυτούς της Μ-ΧΛΛ ( $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ stim}/2^{-\Delta\Delta Ct \text{ ctrl}}}=23$ ) (Εικόνα 30).



Εικόνα 30 Σύγκριση έκφρασης AID μεταξύ αδιεγέρτης (control) και διεγερμένης (CD40L +IL-4) κατάστασης, μεταξύ ασθενών Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ

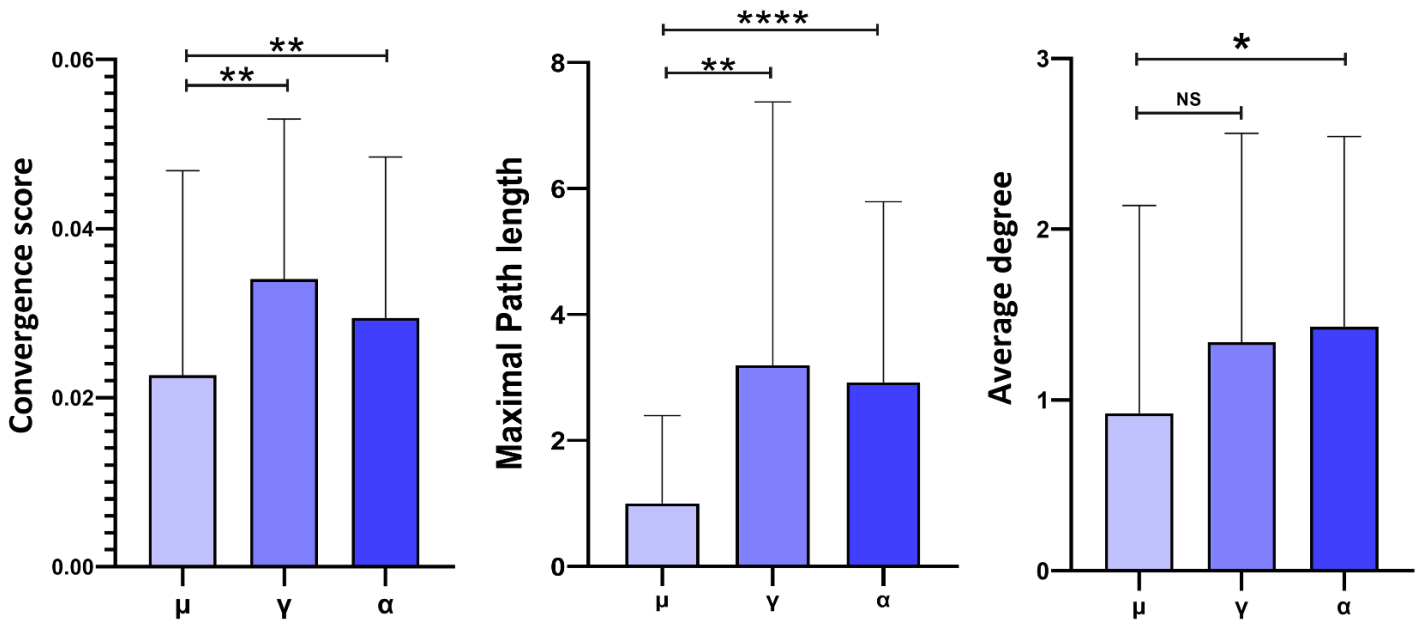
### 3. Τα εναλλακτικά μετάγραφα παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα ενδοκλωνικής ετερογένειας

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, η ενδοκλωνική ετερογένεια ενός ΧΛΛ κλώνου προκύπτει ως αποτέλεσμα της δράσης του μηχανισμού της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης, λόγω συνεχούς αλληλεπίδρασης με αντιγόνα. Συνεπώς, η παρακολούθηση της σειράς εμφάνισης και του προτύπου μεταλλάξεων βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση τόσο της αρχιτεκτονικής του λευχαιμικού κλώνου, όσο και της κλωνικής του εξέλιξης. Έτσι, κρίθηκε σημαντικό σε πρώτο βαθμό να εντοπιστούν μεταλλάξεις που υπάρχουν στα ρεπερτόρια των «μ, γ και α» μεταγράφων και στη συνέχεια να διερευνηθεί εάν αυτές αποτελούν τυχαίο γεγονός ή προέκυψαν στο πλαίσιο συνεχιζόμενης ΣΥΜ, ύστερα από αντιγονική διέγερση. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο IgIDivA, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προσφέρει τη δυνατότητα ανάλυσης των μεταλλάξεων που εντοπίζονται τόσο στον κύριο ΧΛΛ κλωνοτύπο αλλά και στους σχετιζόμενους υποκλωνοτύπους.

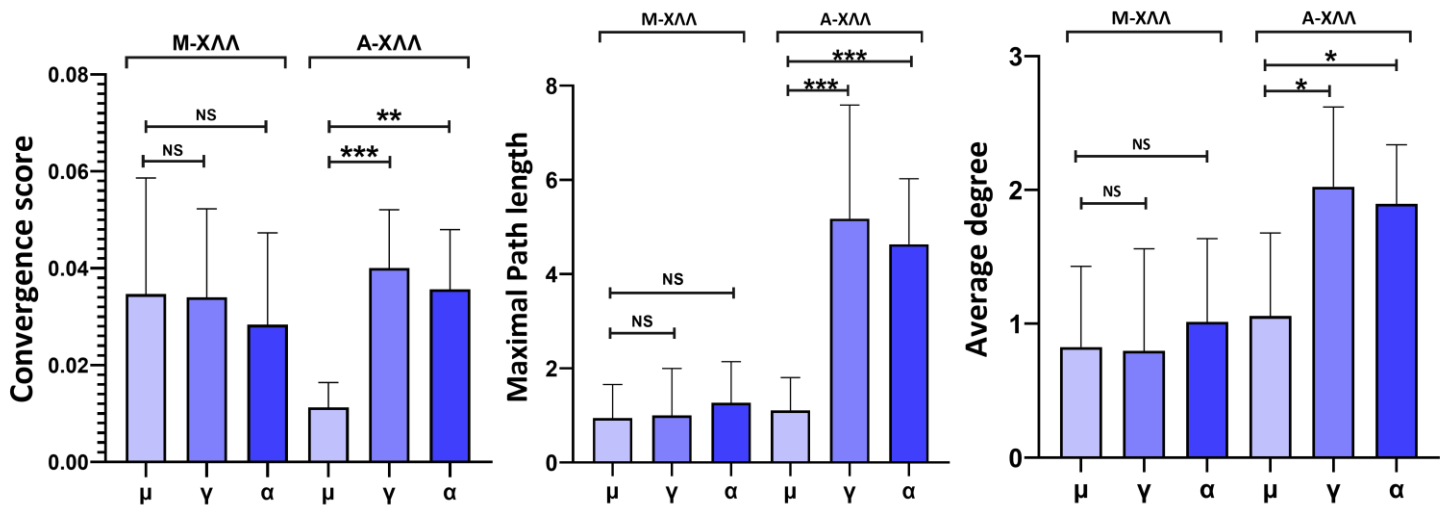
Προκειμένου οι διαφορές που εντοπίζονται στους γράφους σε πρώτο επίπεδο να είναι συγκρίσιμες (και άρα μετρήσιμες), αξιοποιήθηκαν διαφορετικές μετρικές που είναι ενσωματωμένες στο εργαλείο και που αξιολογούν την τάση του ΧΛΛ-σχετιζόμενου κλώνου να συσσωρεύσει περεταίρω μεταλλάξεις (Convergence score), την πολυπλοκότητα της διαδικασίας μεταλλαξιγένεσης (Maximal path length), καθώς και τη συσχέτιση των μεταλλάξεων μεταξύ τους (Average degree).

Όσον αφορά την τάση της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ να συσσωρεύει μεταλλάξεις, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των «μ» και «γ» μεταγράφων ( $p=0.02$ ), όσο και μεταξύ των «μ» και «α» ( $p=0.06$ ), υποδηλώνοντας, πως τα εναλλακτικά μετάγραφα «γ, α» έχουν μεγαλύτερη τάση να συγκεντρώνουν μεταλλάξεις σε σχέση με τα «μ» (Εικόνα 31). Μελετώντας την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε επιμέρους ομάδες (Α-ΧΛΛ, Μ-ΧΛΛ), παρατηρείται πως στη περίπτωση της Α-ΧΛΛ υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των «μ» και «γ» ( $p=0.0001$ ), αλλά και μεταξύ των «μ» και «α» ( $p=0.004$ ) μεταγράφων. Αντιθέτως, στη περίπτωση της Μ-ΧΛΛ δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του «μ» και των εναλλακτικών μεταγράφων (Εικόνα 32). Στην περίπτωση της μετρικής 'Maximal Path length' προκύπτει πως τα ρεπερτόρια των εναλλακτικών μεταγράφων εμφανίζουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στα μονοπάτια μεταλλαξιγένεσης, συγκριτικά με τα «μ» μετάγραφα, με τη διαδικασία της ΣΥΜ να γίνεται σε πολλά περισσότερα βήματα, ενδεικτική για συνεχιζόμενες αλληλεπιδράσεις με αντιγόνα ( $p \leq 0.001$  και για τα δύο μετάγραφα)(Εικόνα 31). Σύγκριση της μετρικής αυτής με βάση την ομάδα ασθενών (Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ) έδειξε πως υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς που πάσχουν από Μ-ΧΛΛ δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πολυπλοκότητα των μονοπατιών, ενώ στους ασθενείς με Α-ΧΛΛ η πολυπλοκότητα διαφέρει σημαντικά τόσο μεταξύ των «μ» και «γ» ( $p=0.0005$ ), όσο μεταξύ των «μ» και «α» μεταγράφων ( $p=0.0002$ ) (Εικόνα 32). Τέλος, η συσχέτιση και αλληλεπίδραση των διαφορετικών μεταλλάξεων φαίνεται να μην διαφέρει σημαντικά μεταξύ των «μ» και των «γ» μεταγράφων, αλλά παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των «μ» και «α», όταν ελέγχεται το σύνολο των ασθενών (Εικόνα 31). Εξετάζοντας, όμως, τις δύο επιμέρους

ομάδες (Μ-ΧΛΛ, Α-ΧΛΛ), ξεχωριστά, παρατηρείται πως υπάρχει διαφορά μεταξύ των «μ» και «γ» στην περίπτωση της Α-ΧΛΛ (Εικόνα 32).



Εικόνα 31 Σύγκριση των μετρικών ενδοκλωνικής ετερογένειας ‘convergence score’, ‘Maximal Path length’ και ‘Average degree’ μεταξύ των «μ, γ α» μεταγράφων.



Εικόνα 32 Σύγκριση των μετρικών ενδοκλωνικής ετερογένειας ‘Convergence score’, ‘Maximal Path length’ και ‘Average degree’ μεταξύ ασθενών με Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ για τα «μ», «γ» και «α» μεταγραφα

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι η πιο συχνή μορφή λευχαιμίας στη Δύση. Αναφορικά με την οντογένεση της ΧΛΛ, σειρά ανοσογενετικών αναλύσεων έχουν υπογραμμίσει την εμπλοκή συγκεκριμένων αντιγόνων στην παθογένεση της νόσου. Συγκεκριμένα, ο αντιγονικός υποδοχέας των Β κυττάρων (BκΥ) παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο σε αυτό, ιδίως η δομή της μεμβρανικής, κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης. Σε αυτό το πλαίσιο, οι μηχανισμοί ωρίμανσης συγγένειας του ΒκΥ, δηλαδή η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και εναλλαγή ισοτύπου, λόγω του αντίκτυπου που έχουν στη δομή της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ, αξίζει να μελετηθούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια αφού μπορεί να προσφέρουν πληροφορίες για την οντογένεση της νόσου. Πράγματι, είναι γνωστό πως ειδικά το φορτίο της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης μπορεί να χωρίσει τους ασθενείς σε δύο μεγάλες ομάδες (Α-ΧΛΛ, Μ-ΧΛΛ) με διακριτή κλινική συμπεριφορά, ωστόσο ο αντίκτυπος της εναλλαγής ισοτύπου έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο και οι μέχρι τώρα αναφορές αφορούν σε μελέτες μικρής κλίμακας.

Έτσι, βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν πως ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζουν φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου, εφαρμόστηκε μία μεθοδολογία αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας σε σειρά 70 ασθενών με ΧΛΛ (IgM<sup>+</sup>) και εξετάστηκε αν αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου με το NGS, απαντώνται εκτενή φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου. Αρχικά συγκρίναμε τους ασθενείς που ανήκουν στην Α-ΧΛΛ με αυτούς που ανήκουν στη Μ-ΧΛΛ. Παρατηρήθηκε πως η εμφάνιση γ και α μεταγράφων διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, η εμφάνιση α μεταγράφων δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ ασθενών Α-ΧΛΛ και Μ-ΧΛΛ (~64% των ασθενών εμφανίζει το φαινόμενο και στις δύο περιπτώσεις), αλλά στην περίπτωση των γ μεταγράφων η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων, με την Α-ΧΛΛ να εμφανίζει πιο εκτενώς μετάγραφα γ. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που συσχέτισαν την ύπαρξη τέτοιων φαινομένων με δυσμενή κλινική πορεία, μπορεί αυτή η διαφορά μεταξύ Α-ΧΛΛ, Μ-ΧΛΛ να εξηγεί εν μέρει την επιθετική φύση της Α-ΧΛΛ.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η υπόθεση ασθενείς που εκφράζουν γονίδια IGHV διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων να παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα εναλλαγής ισοτύπου. Παρατηρήθηκε πως ασθενείς που εκφράζουν γονίδια IGHV της φυλογενετικής ομάδας 1 (γονίδια IGHV1/5/7) εμφανίζουν πιο έντονα το φαινόμενο, τόσο προς IgG, όσο και προς IgA μετάγραφα. Η έντονη αυτή διαφοροποίηση των ασθενών με γονίδια IGHV της φυλογενετικής ομάδας 1 μας οδήγησε στην διερεύνηση της συχνότητας εμφάνισης του φαινομένου μεταξύ ασθενών των υποσυνόλων #1 και #99 καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στα υποσύνολα αυτά κατατάσσονται ασθενείς Α-ΧΛΛ, με γονίδια IGHV που ανήκουν στη φυλογενετική ομάδα 1.<sup>88</sup> Ήταν έτσι αναμενόμενο, ασθενείς των υποσυνόλων αυτών να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα εναλλαγής ισοτύπου, υπόθεση η οποία και επιβεβαιώθηκε. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τα ποσοστά εναλλακτικών IgG και IgA μεταγράφων να είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς των υποσυνόλων, συγκριτικά με αυτά των ασθενών που εκφράζουν ετερογενείς ΒκΥ. Η παρατήρηση αυτή συνηγείται επίσης στην υπόθεση συσχέτισης

A-ΧΛΛ και άρα και της δυσμενούς κλινικής πορείας, με την αυξημένη εμφάνιση του φαινομένου εναλλαγής ισοτύπου.

Εφόσον διαπιστώθηκε πως οι ασθενείς με A-ΧΛΛ, παρουσιάζουν εντονότερα φαινόμενα *in vivo* εναλλαγής ισοτύπου, σε σχέση με τους ασθενείς M-ΧΛΛ, εξετάστηκε αν αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται σε ενδογενείς μηχανισμούς των κυττάρων ΧΛΛ ή σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος. Για τον λόγο αυτό έγινε *ex vivo* ενεργοποίηση των κυττάρων ΧΛΛ προς επαγωγή έκφρασης της AID σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, διεγέρσεις κυττάρων ΧΛΛ με CD40L και IL-4 οδηγούν σε ενεργοποίηση των ΧΛΛ κυττάρων και σε επαγωγή έκφρασης της AID.<sup>89</sup> Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τα πειράματα της παρούσας μελέτης. Αρχικά, παρατηρήθηκε πως παρουσία CD40L και IL-4 τα ποσοστά των δεικτών ενεργοποίησης (CD86/CD25) ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με την αδιέγερτη κατάσταση. Η ενεργοποίηση άρα, των κυττάρων επιβεβαίωσε και την επιτυχία της διέγερσης. Στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση της AID και συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασής της στη διεγερμένη και την αδιέγερτη κατάσταση. Η σχετική έκφραση του ενζύμου ήταν σημαντικά υψηλότερη στη διεγερμένη κατάσταση, τόσο για την A-ΧΛΛ όσο και για τη M-ΧΛΛ, υποδηλώνοντας πως στην περίπτωση της M-ΧΛΛ η μειωμένη έκφραση που έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με το μικροπεριβάλλον και όχι με την ικανότητα των κυττάρων να εκφράσουν AID. Αντίθετα, η A-ΧΛΛ που κάτω από τις ίδιες συνθήκες διέγερσης παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τη M-ΧΛΛ, μπορεί να υποδηλώνει και την πιθανότητα ύπαρξης και ενδογενών παραγόντων που σε συνδυασμό με τα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος επάγουν την έκφραση της AID.

Τέλος, έγινε ανάλυση της ενδοκλωνικής ετερογένειας των ΧΛΛ-κλώνων και σύγκριση των διαφορετικών προτύπων σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης μεταξύ των αρχικών  $\mu$  και των θυγατρικών  $\gamma$  και  $\alpha$  μεταγράφων. Παρατηρήθηκε πως οι ανοσοσφαιρίνες των BκΥ στην περίπτωση της A-ΧΛΛ τείνουν να συγκεντρώνουν περισσότερες μεταλλάξεις στην περίπτωση των  $\gamma$  και  $\alpha$  εναλλακτικών μεταγράφων και αυτό γίνεται σε πολλά βήματα, πιθανώς ως αποτέλεσμα εμμένουσας αντιγονικής διέγερσης. Αντίθετα, στην M-ΧΛΛ που τα 3 διαφορετικά μετάγραφα παρουσίαζαν παρόμοια επίπεδα ενδοκλωνικής ετερογένειας. Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να αντανακλούν διαφορές στον τόπο και τον χρόνο που πραγματοποιούνται οι μηχανισμοί της ΣΥΜ και της εναλλαγής ισοτύπου στις δύο διαφορετικές ομάδες. Στη μεν M-ΧΛΛ τα πρότυπα ενδοκλωνικής ετερογένειας δείχνουν πως πρώτα εισάγονται μεταλλάξεις στον λευχαιμικό κλώνο και σε δεύτερο χρόνο αυτός ξεκινά να παρουσιάζει φαινόμενα εναλλαγής ισοτύπου, ένα σενάριο που είναι συμβατό με την κλασική θεώρηση για ωρίμανση συγγένειας στα βλαστικά κέντρα, ενώ για την A-ΧΛΛ φαίνεται πως τουλάχιστον σε κάποιες περιπτώσεις η εναλλαγή ισοτύπου μπορεί να συμβαίνει νωρίτερα από τη ΣΥΜ, εξ ου και η παρουσία περισσότερων μεταλλάξεων στα θυγατρικά μετάγραφα  $\gamma$ ,  $\alpha$ .

Συνολικά, τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας δείχνουν ένα διαφορετικό ρόλο με τον οποίο επιδρούν οι μηχανισμοί της ΣΥΜ και της εναλλαγής ισοτύπου στη ΧΛΛ, με σημαντικές οντογενετικές προεκτάσεις, ιδιαίτερα όσον αφορά στο χρονικό πλαίσιο που αυτοί πραγματοποιούνται.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kindt TJ, G. R. O. B. *Kuby immunology, Sixth edition. Immunology.* (2007).
2. Sherwood. *Introduction to Human Physiology 8th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning.* (2013).
3. Abbas A.K., L. A. H. & P. S. *Cellular and Molecular Immunology.* (Elsevier, 2022).
4. Dzierzak, E. & Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, (2013).
5. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
6. Gordon S. *Minireview Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response.*
7. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. & Lotze, M. T. *PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity.* (2012).
8. Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M. & Núñez, G. Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* vol. 27 549–559 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.002> (2007).
9. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* vol. 34 637–650 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006> (2011).
10. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, (2010).
11. Eiz-Vesper, B. & Schmetzer, H. M. Antigen-presenting cells: Potential of proven und new players in immune therapies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* vol. 47 429–431 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000512729> (2020).
12. Akkaya, M., Kwak, K. & Pierce, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology* vol. 20 229–238 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2> (2020).
13. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: Generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 24–35 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3567> (2014).
14. Tsai, D. Y., Hung, K. H., Chang, C. W. & Lin, K. I. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. *J Biomed Sci* **26**, (2019).
15. Wang, K., Wei, G. & Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* **1**, (2012).
16. Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews Immunology* vol. 17 281–294 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19> (2017).

17. Kelsoe, G. Heavy-chain receptor editing unbound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112 2297–2298 Preprint at <https://doi.org/10.1073/pnas.1501480112> (2015).
18. Nemazee, D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 728–740 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1939> (2006).
19. Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T. & Vilen, B. J. B-cell anergy: From transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology* vol. 7 633–643 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2133> (2007).
20. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal centers. *Annual Review of Immunology* vol. 30 429–457 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032> (2012).
21. DeFranco, A. L. The germinal center antibody response in health and disease [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7717.1> (2016).
22. Natkunam, Y. *The Biology of the Germinal Center Follicular Lymphoma*. [http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2007/1/210/646215/210\\_215ash.pdf](http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2007/1/210/646215/210_215ash.pdf).
23. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 126 898–907 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.007> (2010).
24. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* vol. 45 471–482 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001> (2016).
25. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* **15**, 137–148 (2015).
26. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* vol. 45 471–482 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001> (2016).
27. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* **15**, 172–184 (2015).
28. The complexity of signaling pathways activated by the BCR Anthony L DeFranco. (1997).
29. Lohi, O. & Lehto, V.-P. *ITAM motif in an apoptosis-receptor*. *Apoptosis* vol. 3 (1998).
30. Geisberger, R. Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01770.x.
31. Ackermann, J. A. *et al.* Syk Tyrosine Kinase Is Critical for B Cell Antibody Responses and Memory B Cell Survival. *The Journal of Immunology* **194**, 4650–4656 (2015).
32. Burger, J. A. & Wiestner, A. Targeting B cell receptor signalling in cancer: Preclinical and clinical advances. *Nature Reviews Cancer* vol. 18 148–167 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.121> (2018).

33. Dal Porto, J. M. *et al.* B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* **41**, 599–613 (2004).
34. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, (2010).
35. Agathangelidis, A. *et al.* Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1881 51–62 (Humana Press Inc., 2019).
36. Lefranc Chairperson, M.-P. & Lefranc, M.-P. *IMGT Locus in Focus Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes. Exp Clin Immunogenet* vol. 18 <http://imgt.cines.fr:8104ABCFax+41613061234E-Mailkarger@karger.chwww.karger.comwww.karger.com/journals/eci> (2001).
37. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A. K. & Rizzi, M. B cell biology: An overview topical collection on basic and applied science. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**, (2014).
38. 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).
39. Lefranc, M.-P. *IMGT Locus in Focus Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes. Exp Clin Immunogenet* vol. 18 (2001).
40. Lefranc, M.-P. *IMGT Locus in Focus Nomenclature of the Human Immunoglobulin Lambda (IGL) Genes. Exp Clin Immunogenet* vol. 18 (2001).
41. Schlissel, M. S. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature Reviews Immunology* vol. 3 890–899 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1225> (2003).
42. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 251–263 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2941> (2011).
43. Backhaus, O. Generation of Antibody Diversity. in *Antibody Engineering* (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.72818.
44. Jones, J. M. & Gellert, M. *The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system.*
45. 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).
46. Lu, H., Schwarz, K. & Lieber, M. R. Extent to which hairpin opening by the Artemis: DNA-PKcs complex can contribute to junctional diversity in V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res* **35**, 6917–6923 (2007).
47. Hwang\*, J. K., Alt\*, F. W. & Yeap, L.-S. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* **3**, (2015).



48. Methot, S. P. & Di Noia, J. M. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. in *Advances in Immunology* vol. 133 37–87 (Academic Press Inc., 2017).
49. Wagner, S. D. & Neuberger, M. S. *SOMATIC HYPERMUTATION OF IMMUNOGLOBULIN GENES. Annual Reviews WAGNCHPT.DUN* vol. 16 www.annualreviews.org (1996).
50. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740> (2007).
51. Cohen, R. M., Kleinstein, S. H. & Louzoun, Y. Somatic hypermutation targeting is influenced by location within the immunoglobulin V region. *Mol Immunol* **48**, 1477–1483 (2011).
52. Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G. & Basu, U. Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev* **27**, 1–17 (2013).
53. Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, 1–22 (2013).
54. Li, Z., Woo, C. J., Iglesias-Ussel, M. D., Ronai, D. & Scharff, M. D. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes and Development* vol. 18 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.1101/gad.1161904> (2004).
55. Tong, P. & Wesemann, D. R. Molecular mechanisms of ige class switch recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* **388**, 21–37 (2015).
56. Stavnezer, J. & Schrader, C. E. IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *The Journal of Immunology* **193**, 5370–5378 (2014).
57. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research* vol. 2 130–143 Preprint at <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02> (2013).
58. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: Induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology* vol. 12 517–531 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3216> (2012).
59. Matthews, A. J., Zheng, S., DiMenna, L. J. & Chaudhuri, J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: Choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. in *Advances in Immunology* vol. 122 1–57 (Academic Press Inc., 2014).
60. Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. *mechanisms of disease Chronic Lymphocytic Leukemia*. www.nejm.org (2005).
61. Molica, S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia and Lymphoma* vol. 47 1477–1480 Preprint at <https://doi.org/10.1080/10428190600555819> (2006).

62. Rawstron, A. C. *et al.* *Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia Abstract. N Engl J Med* vol. 359 [www.nejm.org](http://www.nejm.org) (2008).
63. Ginaldi, L. *et al.* *Levels of expression of CD 19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. J Clin Pathol* vol. 51 (1998).
64. Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. *mechanisms of disease Chronic Lymphocytic Leukemia. www.nejm.org* (2005).
65. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* **94**, 1266–1287 (2019).
66. Hallek, M. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* vol. 111 5446–5456 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906> (2008).
67. Linet, M. S. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia: An overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *British Journal of Haematology* vol. 139 672–686 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06847.x> (2007).
68. Houlston, R. S., Catovsky, D. & Yuille, M. R. SPOTLIGHT REVIEW Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **16**, 1008–1014 (2002).
69. Vardi, A. *et al.* Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: Revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Research* vol. 74 4211–4216 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0630> (2014).
70. Tsimberidou, A. M. & Keating, M. J. Richter's Transformation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol* **33**, 250–256 (2006).
71. Hallek, M. *et al.* *Special Report iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. www.bloodjournal.org* (2018).
72. Baliakas, P. *et al.* Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **104**, 360–369 (2019).
73. Fais, F. *et al.* *Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Restricted Sets of Mutated and Unmutated Antigen Receptors. J. Clin. Invest* vol. 102 <http://www.jci.org> (1998).
74. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. *Unmutated Ig V H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. vol. 94* (1999).
75. Boonstra, J. G. *et al.* CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): Comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin Cytom* **70**, 136–141 (2006).

76. Orchard, J. A. , et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **363**, 105-111 (2004).
77. Deaglio, S. *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. (2005) doi:10.1182/blood-2004-10.
78. Malavasi, F. *et al.* CD38 and chronic lymphocytic leukemia: A decade later. *Blood* vol. 118 3470–3478 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-275610> (2011).
79. Damle, R. N. *et al.* *Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia.*
80. Gobessi, S. *et al.* ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* **109**, 2032–2039 (2007).
81. Crespo, M. *et al.* *ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia.* *N Engl J Med* vol. 18 [www.nejm.org](http://www.nejm.org) (2003).
82. Ghiotto, F. *et al.* Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1008–1016 (2004).
83. Stamatopoulos, K. *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. **109**, 259–270 (2007).
84. 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).
85. Bomben, R. *et al.* Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: Results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol* **144**, 492–506 (2009).
86. 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.
87. Zaragoza-Infante, L. *et al.* IgIDivA: Immunoglobulin intraclonal diversification analysis. *Brief Bioinform* **23**, (2022).
88. Del Giudice, I. *et al.* Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: A direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *Am J Hematol* **89**, 74–82 (2014).
89. Oppezzo, P., Navarrete, M. & Chiorazzi, N. AID in Chronic Lymphocytic Leukemia: Induction and Action During Disease Progression. *Frontiers in Oncology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.634383> (2021).