



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ
ΤΗΣ ΒΑΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Δ. ΡΗΓΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ
ΒΑΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Δ. ΡΗΓΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5881/1
Ημερ. Εισ.: 04-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΡΗΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087365

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ
ΒΑΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο: «Ανίχνευση υπερμεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία», πραγματοποιήθηκε στην **Ιατρική Σχολή του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών** και ειδικότερα, στο **Εργαστήριο Αιματολογίας**.

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιωτίδης Παναγιώτης

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ

Ευχαριστίες:

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο αιματολογίας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, επίκουρο καθηγητή, κο Παναγιωτίδη Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη του κατά το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή, κο Κουρέτα Δημήτριο, και τον επίκουρο καθηγητή, κο Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, που δέχθηκαν να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής κρίσης της πτυχιακής.

Ευχαριστίες οφείλω στον Γιώργο Γεωργίου, επιστημονικό συνεργάτη του εργαστηρίου αιματολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Ιδιαίτερως σημαντική ήταν η βοήθεια της Άννας Ευθυμίου η οποία μου παρείχε τις απαραίτητες γνώσεις ώστε να εργαστώ στο εργαστήριο, καθώς και η βοήθεια του Λοΐζου Πετρίκου, για την συνολική υποστήριξη και την καθοδήγηση στη συγκέντρωση του απαραίτητου υλικού για αυτή την εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Νίκο Πανταζή και Οδυσσέα Παζιώνη για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
	1.1 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	6
	1.2 Διάγνωση	8
	1.3 Σταδιοποίηση	8
	1.4 Πρόγνωση	10
	1.5 Γονίδια Ανοσοσφαιρίνης	12
	1.6 Ανάπτυξη και Διαφοροποίηση Β-λεμφοκυττάρων	13
	1.7 Σωματικές Υπερμεταλλάξεις Γονιδίων Ανοσοσφαιρίνης	14
	1.8 Παθογένεση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας	15
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	17
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
	3.1 Απομόνωση DNA	18
	3.2 Φωτομέτρηση	20
	3.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	21
	3.4 Ηλεκτροφόρηση	23
	3.5 Κλωνοποίηση	24
	3.5.1 Εισαγωγή PCR προϊόντος σε φορέα κλωνοποίησης	24
	3.5.2 Μεταμόρφωση Κυττάρων	27
	3.5.3. Επώαση Μεταμορφωμένων Κυττάρων	28
	3.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA	29
	3.7 Πέψη με Ένζυμο Περιορισμού (EcoRI)	33
	3.8 Ανάλυση Αλληλουχίας Βάσεων	34
	3.9 Έλεγχος Υπερμεταλλάξεων	36
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	36
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί μία νόσο του αιμοποιητικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από την σταδιακή επέκταση ενός μόνο κλώνου λεμφοκυττάρων στο αίμα (Caligaris-Cappio F., 1999), (Linet MS., 1988). Τα κύτταρα αυτού του κλώνου αποτελούν το 90% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και εκφράζουν τις πρωτεΐνες επιφανείας CD5, CD19, CD23 ενώ ταυτόχρονα, παρατηρείται μειωμένη έκφραση ανοσοσφαιρινών επιφανείας (Sgambati M.et al., 2003), (Rai KR.et al., 1975), (Binet JLet al, 1981). Τα λευχαιμικά Β-λεμφοκύτταρα έχουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινοτυπικό προφίλ. Εκφράζουν ανοσοσφαιρίνες επιφανείας- συνήθως IgM ή IgM σε συνδυασμό με IgD. Τα λευχαιμικά κύτταρα σχηματίζουν ροζέτες με ερυθροκύτταρα ποντικού. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίζονται διαμεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες.

Η Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι η πιο διαδεδομένη μορφή λευχαιμίας στις δυτικές χώρες, καθώς η ποσοστιαία αναλογία συγκριτικά με το σύνολο των διαγνωσμένων περιπτώσεων λευχαιμίας κυμαίνεται μεταξύ 25 και 30%(Sgambati M et al., 2003). Μόνο στις Η.Π.Α διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο 10.000 νέες περιπτώσεις. Εμφανίζεται κυρίως σε μεγάλες ηλικίες με συχνότητα 720 άτομα ανά 100.000 στις ηλικίες άνω των 70 (Rai KR, 2007). Παρολαυτά η διάγνωση γίνεται με μεγάλη συχνότητα σε μικρές ηλικίες και δεν είναι ασυνήθιστο να εμφανίζεται και σε ηλικίες κάτω των 35. Ως μέση ηλικία διάγνωσης θεωρούνται τα 55 χρόνια. Η συχνότητα εμφάνισης χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας επηρεάζεται από τον παράγοντα του φύλου και έτσι παρουσιάζεται να είναι 1,7 φορές μεγαλύτερη στους άνδρες. Από την άλλη, στις ασιατικές χώρες η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί σπάνια νόσο. Τα αίτια της διακύμανσης αυτής στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου παραμένουν άγνωστα.

Τέλος, στο 95% των ασθενών, εμφανίζεται Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία ενώ η Τ-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι σπάνια (2-5%). Το παραπάνω χαρακτηριστικό είναι και ο λόγος για τον οποίον από το σημείο αυτό και έπειτα, όταν αναφερόμαστε στον όρο «χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία», εννοούμε «Β- χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία».

Στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παρατηρείται αφομοίωση των λευχαιμικών λεμφοκυττάρων χωρίς αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Τα λεμφοκύτταρα στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παρουσιάζουν μεγάλο χρόνο ζωής καθώς είναι ανθεκτικά στην απόπτωση(Panayiotidis P et al,1996).

Η ανθεκτικότητα αυτή έχει δειχτεί από έρευνες που μελετούν την έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2. Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 έχει έναν καθοριστικό ρόλο στα μονοπάτια της απόπτωσης. Η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας, η Bcl-2 λειτουργεί ανασταλτικά για τη διαδικασία της απόπτωσης. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της Bcl-2 πρωτεΐνης (Dancescu M et al,1992).

1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η κλινική πορεία της νόσου καθώς και ο μέσος όρος επιβίωσης διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι συνέπειες της ασθένειας είναι άμεσες και οι ασθενείς επιβιώνουν μερικούς μόνο μήνες, ενώ σε άλλες δεν εμφανίζονται καθόλου συμπτώματα και ο χρόνος επιβίωσης μπορεί να επιμηκυνθεί μέχρι και τα 20 χρόνια. Το συχνότερο σύμπτωμα της νόσου είναι οι διογκωμένοι λεμφαδένες ενώ, σπανιότερα, εμφανίζονται συμπτώματα όπως πυρετός, απώλεια βάρους, έντονη εφίδρωση κατά τη διάρκεια της νύχτας, κόπωση, υπερβολική αντίδραση σε τσιμπήματα εντόμων και συχνές ιικές και βακτηριακές λοιμώξεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ποσοστό των ασυμπτωματικών ασθενών φτάνει το 25% (Yair Herishanu, Aaron Polliack, 2005). Τα συχνότερα κλινικά ευρήματα περιλαμβάνουν λεμφαδενοπάθειες (στο 87% των ασθενών), σπληνομεγαλία (στο 54%) και ηπατομεγαλία (στο 14%). Τα εργαστηριακά ευρήματα σε νεοδιαγνωσθείσες χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες είναι συνήθως αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (10%), υπογαμμασφαιριναιμία (10%) ή ακόμη και μονοκλωνική γαμμοπάθεια. Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς συνήθως αναγνωρίζονται από την απόλυτη λεμφοκυττάρωση που παρατηρείται στις εξετάσεις ρουτίνας (Brian L. Abbott, 2006).

1.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Το επόμενο στάδιο που ακολουθεί τη διάγνωση είναι η εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας και η σταδιοποίησή της. Υπάρχουν δύο συστήματα σταδιοποίησης της νόσου: το σύστημα Rai που χρησιμοποιείται στην Αμερική (Rai KR et al, 1975), και το σύστημα Binet (Binet JL et al, 1981) που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη.

Τα συστήματα αυτά χρησιμεύουν ώστε να γίνει εκτίμηση της πρόγνωσης της ασθένειας μέσω κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων, όπως η σπληνομεγαλία, η ηπατομεγαλία, η αναιμία και η θρομβοκυτταροπενία. Υπάρχουν τρία στάδια κατάταξης των ασθενών σε καθένα από τα δύο συστήματα ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου. Τα δύο βασικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα παραπάνω συστήματα, απλά στη χρήση και με μικρό κόστος, τα έχουν καθιερώσει ως εργαλεία σε παγκόσμια κλίμακα.

Στο σύστημα Rai οι ασθενείς χωρίζονται σε ομάδες επικινδυνότητας με βάση τα συμπτώματα της νόσου που εκδηλώνουν. Έτσι στο πρώτο στάδιο παρατηρείται λεμφοκυττάρωση (δηλαδή, τα λεμφοκύτταρα είναι $> 40\%$ του συνόλου των εμπύρηνων κυττάρων του αίματος). Στο δεύτερο στάδιο παρατηρείται διόγκωση λεμφαδένων, ενώ στο τρίτο στάδιο οι ασθενείς εμφανίζουν σπληνομεγαλία. Στο τέταρτο στάδιο έχουμε πτώση των τιμών της αιμοσφαιρίνης (τιμές $< 11\text{g/dl}$) ενώ στο πέμπτο σταδιο μειώνεται και η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο αίμα (αιμοπετάλια $< 100,000/\mu\text{l}$).

Στο σύστημα Binet, το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από λεμφοκυττάρωση. Στο δεύτερο παρατηρείται διόγκωση λεμφαδένων ενώ το τρίτο και τελευταίο στάδιο χαρακτηρίζεται από κυτταροπενία (αιμοσφαιρίνη $< 10\text{g/dl}$ ή αιμοπετάλια $< 100,000/\mu\text{l}$). Πρέπει να τονίσουμε ότι σύμφωνα με τα συστήματα αυτά οι ασθενείς με λίγα συμπτώματα βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της νόσου ενώ αυτοί που εμφανίζουν εντονότερα συμπτώματα βρίσκονται σε όψιμα στάδια.

Πρέπει, ωστόσο, να τονιστεί, ότι για τα συστήματα που περιγράφηκαν δεν υπάρχει επικύρωση σε ασθενείς που βρίσκονται σε φάση υποτροπής της νόσου. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η πρόγνωση σχετίζεται περισσότερο με τα μοριακά τους χαρακτηριστικά και με τη διάρκεια της προηγούμενης ύφεσης (Marco Montillo et al,2005).

1.4 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που χρησιμοποιούνται ως προγνωστικοί παράγοντες για τους νοσούντες από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι οι παρακάτω:

- ο χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων ,
- τα κυτταρογενετικά ευρήματα ,
- η έκφραση της CD38,
- η β-2 μικροσφαιρίνη του ορού,
- το ποσοστό υπερμεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης
- η έκφραση του ZAP70.

Ως μικρός χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων ορίζεται ο διπλασιασμός του αριθμού των λεμφοκυττάρων στο αίμα σε λιγότερο από 12 μήνες. Ασθενείς με μεγάλο χρόνο διπλασιασμού παρουσιάζουν μέσο όρο ζωής 118 μήνες, ενώ ασθενείς με μικρό χρόνο διπλασιασμού μόνο 61 μήνες (Montserrat E., 1986), (Molica S., 1987).

Η CD38 είναι μια πρωτεΐνη επιφανείας των λευχαιμικών κυττάρων. Εκφράζεται σε επιθετικές μορφές της νόσου και έτσι η ανίχνευσή της σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Θετικό θεωρείται το δείγμα το οποίο μετά από κυτταρομετρία ροής, βρέθηκε να περιέχει λεμφοκύτταρα CD38+ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% (Damle RN, Temburni S et al 2007).

Η απουσία υπερμεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgV_H) σχετίζεται με τη γρήγορη εξέλιξη της νόσου. (Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al., 1999), (Lin K, Sherrington PD, Dennis M et al., 20002), (Krober A, Seiler T, Benner A et al., 2002).

Έκφραση του διακυτταρικού μορίου σηματοδότησης ZAP70 έχει παρατηρηθεί στην πλειοψηφία των περιπτώσεων όπου δεν ανευρίσκονται υπερμεταλλάξεις και πλέον το ZAP70 θεωρείται ο επόμενος φαρμακευτικός στόχος για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Crespo M, Bosch F, Villamor N et al., 2003), (Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al., 2003).

Υπάρχουν πολλές κυτταρογενετικές αλλαγές που σχετίζονται με την πρόγνωση στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al., 2000). Τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με πολύ κακή πρόγνωση (υπάρχει στο 7% των ασθενών με μέσο χρόνο επιβίωσης 32 μήνες) είναι η έλλειψη 17p -στην περιοχή αυτή εδράζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η έλλειψη της σχετίζεται με βλάβες στο p53 που ουσιαστικά αφαιρούν την ικανότητα του κυττάρου για απόπτωση (Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al., 2000), (Thornton PD, Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA et al., 2004)- και η έλλειψη της περιοχής 11q όπου βρίσκεται το γονίδιο της αταξίας- τηλεαγγειεκτασίας (υπάρχει στο 18% των ασθενών που επιβιώνουν για 79 μήνες). Στους ασθενείς μέσου κινδύνου, (μέσος χρόνος επιβίωσης 114 μήνες), ανευρίσκεται σε ποσοστό 16% τρισωμία 12, ωστόσο δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι τώρα η αξία αυτής της κυτταρογενετικής αλλαγής ως προγνωστικού δείκτη (Que TH et al, 1993). Οι ασθενείς με μεγάλο χρόνο επιβίωσης, (133 μήνες), εμφανίζουν έλλειψη του 13q14 σε ποσοστό 50%. Ως εκ τούτου αυτή η κυτταρογενετική μεταβολή θεωρείται δείκτης καλής πρόγνωσης (Dohner H et al, 2000).

Στη συνέχεια παρατίθεται ο πίνακας 1 με στοιχεία για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Διάγνωση και Σταδιοποίηση στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.

Διαγνωστικά κριτήρια:

1. Λεμφοκύτταρα $> 5 \cdot 10^9/l$
2. Διάρκεια λεμφοκυττάρωσης
3. Λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών $> 30\%$
4. Ευρήματα κυτταρομετρίας ροής στην πλειονότητα των λεμφοκυττάρων:
 - I. Μονοκλωνικότητα στην κ ή λ ελαφριά αλυσίδα
 - II. Ασθενής έκφραση των CD5+, CD 19+, CD23+, CD20

III. D1 κυκλίνη αρνητική, ασθενής έκφραση CD22

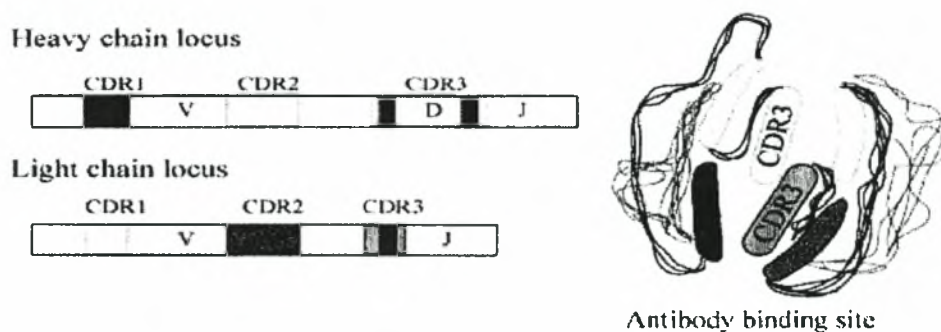
Δείκτες υψηλού κινδύνου:

1. Έκφραση CD38 σε > 30% των λεμφοκυττάρων
2. Έκφραση ZAP70 σε > 30% των λεμφοκυττάρων
3. Αμετάλλαχτη Ig VH
4. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες
 - a) Μεταβολές στην περιοχή 14q
 - b) Μεταβολές στην περιοχή 11q
 - c) Έλλειψη της περιοχής 17p
 - d) Τρισωμία 12
5. Rai στάδιο 3 / Binet στάδιο C
6. Χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων < 12 μηνών
7. Αυξημένη β-2 μικροσφαιρίνη ορού
8. Αυξημένη κινάση θυμιδίνης ορού

1.5 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Κατά την ανοσολογική απάντηση, τα Β-λεμφοκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών (Ig), οι οποίες αποτελούν βασικό στοιχείο της χημικής ανοσοαπάντησης. Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης εκφράζεται στην επιφάνεια των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων και αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες: δύο πανομοιότυπες βαριές (IgH) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (IgL). Αυτές οι αλυσίδες περιλαμβάνουν από μία μεταβλητή περιοχή, υπεύθυνη για τη σύνδεση με το αντιγόνο και από μία σταθερή περιοχή υπεύθυνη για τη σύνδεση με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και για την ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την βαριά αλυσίδα (IgH) βρίσκονται στην περιοχή 14q32. Το μήκος τους φτάνει τις 1100 kb και περιλαμβάνουν τις περιοχές μεταβλητότητας V_H, ποικιλομορφίας D και τα συνδετικά τμήματα J. Από τα 95 υπάρχοντα γονίδια V_H τα 51 είναι λειτουργικά ενώ τα υπόλοιπα είναι ψευδογονίδια (Cook GP, Tomlinson IM.,

1995). Διαχωρίζονται βάσει της ομολογίας τους σε 7 οικογένειες γονιδίων (V_H 1-7)(Gerard Tobin,2004).



ΣΧΗΜΑ 1

Ανασυνδυσασμένα γονίδια ανοσοσφαιρινών. Στο σχήμα δείχνονται επίσης οι περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας με το αντιγόνο (CDRs). V: μεταβλητή περιοχή D: περιοχή ποικιλομορφίας και J: συνδετική περιοχή.

Πηγή: Gerard Tobin, The Immoglobulin Genes and Chronic Lymphocytic Leucemia, Upsala J Med Sci, 2004; 109: 97-114.

1.6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην αλυσίδα της δημιουργίας ενός ώριμου Β-λεμφοκυττάρου είναι ο ανασυνδυασμός των γονιδίων των IgH και IgL. Αρχικά, το προγονικό Β-λεμφοκύτταρο διαφοροποιείται κατά ένα στάδιο με τον ανασυνδυασμό ενός γονιδίου D με ένα γονίδιο J_H . Το σύμπλοκο αυτό (DJ_H) ανασυνδυάζεται με ένα τμήμα V_H και δημιουργούν το ανασυνδυασμένο γονίδιο V_HDJ_H , το οποίο εκφραζόμενο θα δώσει τη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Η αλυσίδα που προκύπτει εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου συνδεδεμένη με δύο αμετάβλητες πρωτεΐνες που υποκαθιστούν τις ελαφριές αλυσίδες, σχηματίζοντας έτσι τον προ-υποδοχέα των Β-λεμφοκυττάρων (προ-BCR). Η παρουσία του προ-υποδοχέα είναι απαραίτητη για την επιβίωση του προ - Β-λεμφοκυττάρου (Kitamura D, Kudo A, Schaal S, et al., 1992). Η μετάβαση σε παρθένο Β-λεμφοκύτταρο πραγματοποιείται με τον ανασυνδυασμό των γονιδίων της

ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Ένα V_k γονίδιο ενώνεται με ένα J_k στην Ig_k περιοχή και όταν ο ανασυνδυασμός είναι επιτυχής, η ελαφριά αλυσίδα που εκφράζεται ενώνεται με τη βαριά δημιουργώντας τον υποδοχέα των Β-λεμφοκυττάρων (BCR). Το κύτταρο είναι πλέον ένα ώριμο Β-λεμφοκύτταρο που εκφράζει IgM και IgD . Στην περίπτωση που ο V_kJ_k ανασυνδυασμός δεν καταλήξει στη δημιουργία μιας λειτουργικής, ελαφριάς αλυσίδας, ξεκινά ένας δεύτερος IgL ανασυνδυασμός προκειμένου να το (Korsmeyer SJ, Hieter PA, Sharrow SO, et al., 1982), (Brauninger A, Goossens T, Rajewsky K, et al., 2001).

Η πολύ μεγάλη ποικιλομορφία των αντισωμάτων οφείλεται στον μεγάλο αριθμό των τυχαίων ανασυνδυασμών που μπορεί να συμβούν. Επιπρόσθετα, στην ίδια περιοχή συμβαίνουν τυχαία γεγονότα ένθεσης νουκλεοτιδίων από ένα ένζυμο που ονομάζεται τελική δεοξυριβονουκλεοτιδική τρανσφεράση, καθώς και εξαγωγής ζευγών βάσεων από εξωνουκλεάσες. Αυτά τα δύο γεγονότα συμβάλουν στην ακόμα μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Goldsby RA, Kuby J., 2003).

1.7 ΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η διαδικασία αναγνώρισης του αντιγόνου από το μόριο της ανοσοσφαιρίνης στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων ακολουθείται από τη δημιουργία υπερμεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών στα Β-λεμφοκύτταρα. (Kelsoe G., 1996). Ο μηχανισμός δημιουργίας σωματικών υπερμεταλλάξεων (Somatic HyperMutations-SHM), περιλαμβάνει στοχευμένες σημειακές μεταλλάξεις, καθώς και ενθέσεις και ελλείψεις μετά τον υποκινητή των IgH και IgL . Οι σωματικές υπερμεταλλάξεις πραγματοποιούνται με πολύ μεγάλο ρυθμό - 10^{-5} έως 10^{-3} ανά ζεύγος βάσεων ανά γενιά (Rajewsky K, Forster I, Cumano A., 1987) και εντοπίζονται σε έξι περιοχές που είναι καθοριστικές για τη συμπληρωματικότητα αντιγόνου-αντισώματος (Complementarity Determining Regions - CDRs). Οι CDRs είναι υπερμεταβλητές περιοχές στην περιοχή δέσμευσης του αντιγόνου (Xu JL, Davis MM., 2000). Οι υπερμεταλλάξεις, λοιπόν, μπορούν να αλλάξουν την αμινοξική αλληλουχία

της περιοχής στην οποία συμβαίνουν και έτσι να επηρεάσουν τη συγγένεια του αντισώματος για το αντιγόνο. Σε έναν φυσιολογικό άνθρωπο υπερμεταλλάξεις ανευρίσκονται περίπου στο 40% του συνολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων του (Klein U, Rajewsky K, Kuppers R., 1998).

1.8 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια, χάρη στην πληθώρα εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων, έχουν ανακαλυφθεί αρκετά σημαντικά στοιχεία για την παθογένεση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Τα νέα στοιχεία που έχουν προκύψει έχουν συμβάλει στην βαθύτερη κατανόηση των μεταμορφωτικών γεγονότων που οδηγούν στη δημιουργία ενός λευχαιμικού κλώνου. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι, παρά τη μεγάλη κλινική ετερογένεια της νόσου, αναγνωρίζονται δύο μεγάλοι υπότυποι της ασθένειας, οι οποίοι πιθανότατα σχετίζονται: (α) με την προέλευση των κυττάρων και (β) με το ποσοστό των υπερμεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al., 1998), (Damle RN, Wasil T, Fais F, et al, 1999).

Φαίνεται ότι στην υποομάδα των ασθενών της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας στους οποίους δεν ανευρίσκονται υπερμεταλλάξεις (επιθετική κλινική πορεία και μικρότερος χρόνος επιβίωσης), τα λευχαιμικά κύτταρα προέρχονται από ένα Β-λεμφοκύτταρο που δεν έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο (Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK., 1999), (Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al, 2001), (Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al, 2002).. Αντιθέτως, στους ασθενείς της δεύτερης υποομάδας (δηλαδή, αυτούς που φέρουν υπερμεταλλάξεις στο γονίδιο V_HDJ_H και οι οποίοι έχουν καλύτερη κλινική εικόνα και υψηλότερο μέσο όρο ζωής), φαίνεται ότι τα λευχαιμικά κύτταρα έχουν προέλθει από ένα Β-λεμφοκύτταρο που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο. Το συμπέρασμα αυτό είναι λογικό, καθώς οι υπερμεταλλάξεις δημιουργούνται κατά το πέρασμα των λεμφοκυττάρων από το βλαστικό κέντρο (Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al, 2002).

Με τον τρόπο αυτό, εάν ένα Β-λεμφοκύτταρο έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο και στη συνέχεια γίνει κακοήθης, αυτό και οι κλώνοι του θα φέρουν

υπερμεταλλάξεις. Περίπου στο 60% των ασθενών της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ανευρίσκονται υπερμεταλλάξεις.(Hamblyn TJ, Davis Z et al, 1999)(Damle RN, Wasil T, Fais F, et al,1999)(Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, et al).

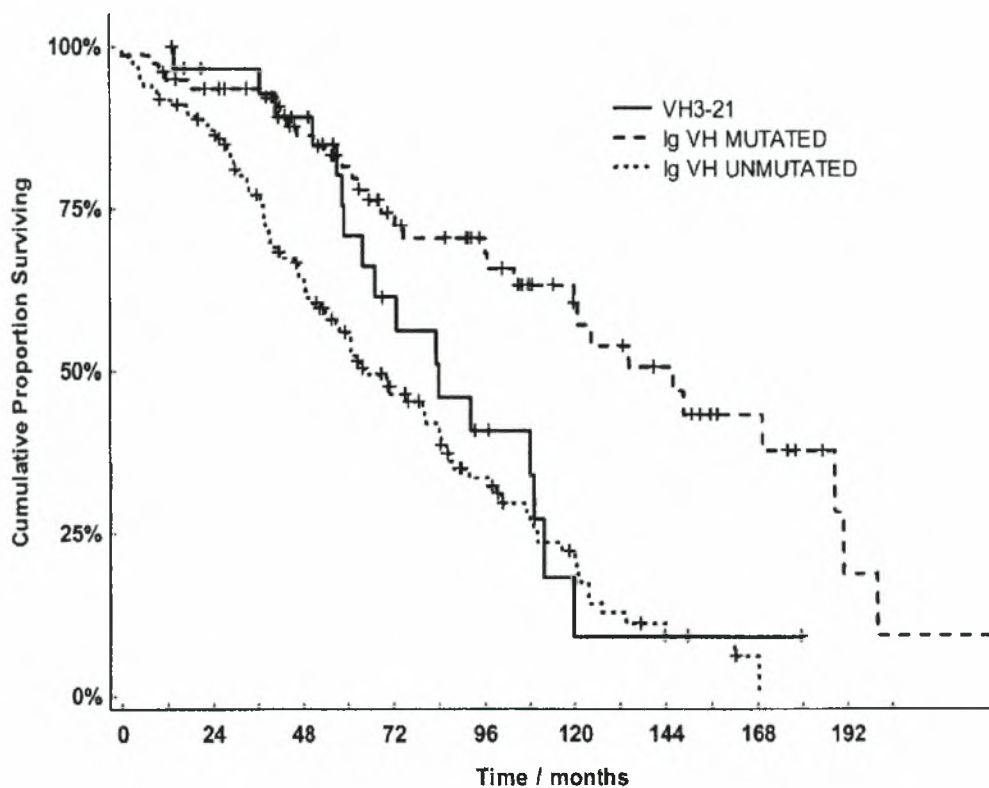


Fig. 2. Survival analysis of 265 CLL cases displaying Ig V_H unmutated (median survival 70 months), Ig V_H mutated (median survival 146 months) and V_H³⁻²¹ cases (median survival 83 months).

Πηγή: Gerard Tobin 'The Immoglobulin Genes and Chronic Lymphocytic Leukemia, διαθέσιμο στο <http://www.uims.se>

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μία πολύ σοβαρή νόσος του αιματοποιητικού συστήματος, αποτελεί μία από τις συχνότερες μορφές λευχαιμίας στο δυτικό κόσμο. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι αφενός η εξαιρετικά μεγάλη ετερογένεια συμπτωμάτων και αφετέρου η μεγάλη διαφορά στο χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Προκειμένου για την εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου, χρησιμοποιούνται δύο συστήματα σταδιοποίησης, το σύστημα Rai και το σύστημα Binet. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούν κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, όπως η ηπατομεγαλία, η σπληνομεγαλία κ.α., ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις αδυνατούν να προβλέψουν την πορεία της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ο *in situ* υβριδισμός, κατέστη δυνατή η μελέτη πολλών παραμέτρων. Κάποιες από τις παραμέτρους αυτές συσχετίστηκαν με καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση της νόσου. Μία από παραμέτρους είναι η παρουσία ή απουσία υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Η παρουσία των υπερμεταλλάξεων συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την ανίχνευση υπερμεταλλάξεων σε δείγματα 24 ασθενών που πάσχουν από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία προκειμένου να γίνει μία πρώτη εκτίμηση για την σοβαρότητα της νόσου και το προσδόκιμο επιβίωσης. Η ανίχνευση των υπερμεταλλάξεων πραγματοποιείται με ένα συνδυασμό μοριακών τεχνικών: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, κλωνοποίηση και αλληλούχιση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλέχθηκαν 24 δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη υπερμεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης.

Από το περιφερικό αίμα απομονώθηκε το γενετικό τους υλικό.

Ακολούθως ενισχύθηκε η επιθυμητή περιοχή του γονιδιώματος με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και το προϊόν της PCR κλωνοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλων φορέων ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη μονοκλωνικότητας.

Στη συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και η αλληλουχία του διαβάστηκε με τη χρήση των βάσεων δεδομένων Joinsolver και IMG.T .

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA (QIAamp DNA minikit)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία απομόνωσης του DNA είναι τα κάτωθι:

- Πρωτεϊνάση K
- Διάλυμα AL
- Αιθανόλη 100%
- Διάλυμα AW1
- Διάλυμα AW2
- Στήλες φυγοκέντρησης (QIAamp Spin Column)

Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται σε επτά στάδια:

Στάδιο 1^ο: Παίρνουμε 200 μl περιφερικού αίματος και στο ίδιο σωληνάριο προσθέτουμε 20μl πρωτεϊνάσης K και 200 μl διαλύματος AL. Αναδεύουμε το μείγμα με τη βοήθεια του vortex. Στη συνέχεια επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 56° C για 10 λεπτά.

Στάδιο 2^ο: Φυγοκεντρούμε το μείγμα για 15 περίπου δευτερόλεπτα ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σταγόνες από τα τοιχώματα του σωληναρίου, και έπειτα προσθέτουμε 200 μl καθαρής αιθανόλης. Αναδεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε ξανά για 15 δευτερόλεπτα.

Στάδιο 3^ο: Τοποθετούμε το μείγμα σε μία στήλη (QIAamp Spin Column) και φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 1 λεπτό.

Στάδιο 4^ο: Τοποθετούμε τη στήλη μας σε ένα καθαρό σωληνάριο και προσθέτουμε 500 μl του διαλύματος AW1. Φυγοκεντρούμε ξανά στις 14000 rpm για ένα λεπτό και βάζουμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο.

Στάδιο 5^ο: Προσθέτουμε 500μl του διαλύματος AW2 και φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για ένα λεπτό.

Στάδιο 6^ο: (Προαιρετικά)Για μεγαλύτερη καθαρότητα, αφού τοποθετήσουμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο, φυγοκεντρούμε άλλη μία φορά χωρίς να προσθέσουμε διάλυμα.

Στάδιο 7^ο: Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα σωληνάριο erpendorf και προσθέτουμε 100μl ενέσιμου ύδατος. Το αφήνουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 14000 rpm. Το δείγμα φυλάσσεται στους -80° C

3.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ (invitrogen)

Η ποσοτικοποίηση του DNA που έχει απομονωθεί γίνεται με τη διαδικασία της φωτομέτρησης του δείγματος. Αρχικά παρασκευάζεται το Quant-iT Working Solution με διάλυση του Quant-It reagent στο Quant-iT buffer σε αναλογία 1:200. Στη συνέχεια παρασκευάζονται τα διαλύματα προς φωτομέτρηση με τις εξής αναλογίες:

Τυφλό διάλυμα (200μl):

Quant-iT Working Solution 190μl

Standard Solution 1 10μl

Το τυφλό διάλυμα δεν περιέχει DNA.

Διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (200μl):

Quant-iT Working Solution 190μl

Standard Solution 2 10μl

Διάλυμα προς ποσοτικοποίηση (200μl):

Quant-iT Working Solution 190μl

Δείγμα ασθενούς 10μl

Φωτομετρούμε τα δύο πρώτα διαλύματα. Το φωτόμετρο χρησιμοποιεί τις συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αυτών ώστε να κατασκευάσει πρότυπη καμπύλη, η οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκεντρώσεως του δείγματος.

3.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδιώματος με τη χρήση δύο εκκινητών, ειδικών για το συγκεκριμένο τμήμα. Ο ένας εκκινητής καθορίζει την αρχή του τμήματος (forward), ενώ ο δεύτερος το τέλος του (reverse). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η DNA πολυμεράση 1 του θερμοφιλου βακτηρίου *Thermus Aquaticus*, ή αλλιώς πολυμεράση Taq. Το κομμάτι του γονιδιώματος που ενισχύεται κατά την PCR που εκτελούμε ξεκινάει από την FR1 περιοχή που βρίσκεται στην αρχή της κάθε οικογένειας των γονιδίων V_H – στην οποία εισέρχεται ο forward εκκινητής (VH1-6)- και καταλήγει στην J_H περιοχή – στην οποία συνδέεται ο reverse εκκινητής. Η περιοχή αυτή έχει μήκος περίπου 300-350 ζεύγη βάσεων. Σε περίπτωση που η PCR με τους FR1 εκκινητές δεν δώσει αποτελέσματα, υπάρχουν εκκινητές που δεσμεύονται στις περιοχές FR2 ή FR3.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν:

- 10x PCR buffer (invitrogen)
- 200 mM Tris- HCl (pH 8,4), 500mM KCl
- 50mM MgCl₂ (invitrogen)
- dNTPs (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade-Roche)
- Εκκινητές (biomed)

VH1-FR1: 5'-GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG-3'

VH2-FR1: 5'-GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC-3'

VH3-FR1: 5'-CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG-3'

VH4-FR1: 5'-CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG-3'

VH5-FR1: 5'-CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT-3'

VH6-FR1: 5'-TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG-3'

JH-CONS: 5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGACC-3'

- Platinum Taq DNA Polymerase (invitrogen)
- Απεσταγμένο νερό (PCR Grade)

Παρασκευάστηκε δείγμα τελικού όγκου 25μl το οποίο περιείχε:

- 2 μl δείγματος από την απομόνωση DNA
- 2,5 μl 10x PCR buffer
- 0,5 μl MgCl₂
- 0,5μl dNTPs
- 0,5μl VH primer (1-6)
- 0,5 μl JH primer
- 0,25 μl Platinum Taq Polymerase
- 18,25 μl απεσταγμένο νερό (PCR Grade)

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

- i. 94⁰ C για 3 λεπτά
- ii. 94⁰ C για 30 δευτερόλεπτα (μετουσίωση)
62⁰ C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδισμός εκκινητών)
72⁰ C για 1 λεπτό (επιμήκυνση αλυσίδας)
X 35 κύκλους
- iii. 72⁰ C για 5 λεπτά

Το προϊόν της PCR φυλάσσεται στους -20⁰ C.

3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε γέλη αγαρόζης περιεκτικότητας 1,5%.

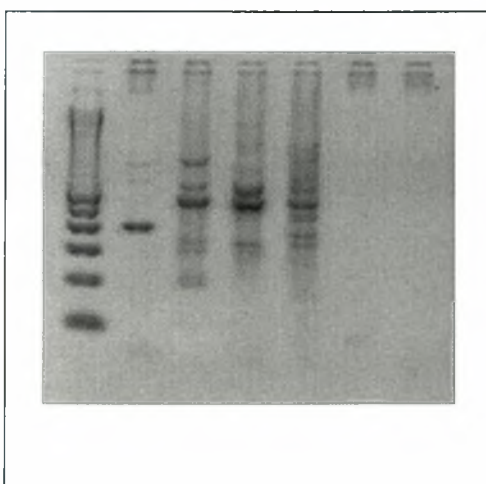
Για την παρασκευή της γέλης χρησιμοποιήθηκαν:

- 60 ml TBE 0,5X
- 0,9 gr αγαρόζης
- 16 ml βρωμιούχου εθιδίου

Το TBE παρασκευάστηκε με αραιώση από stock διάλυμα TBE 5X που περιέχει:

- Για τελικό όγκο 1L
 - 54 gr tris base
 - 27,5 gr boric acid
 - 20 ml EDTA

Με την ηλεκτροφόρηση ανιχνεύουμε τη μονοκλωνικότητα στα Β-λεμφοκύτταρα.



ΕΙΚΟΝΑ 1: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,5% ΜΕΤΑ ΑΠΟ MULTIPLEX PCR ΜΕ ΤΟΥΣ VH-FR1 ΚΑΙ JH-CONS ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΑΡΧΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ VH1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ.

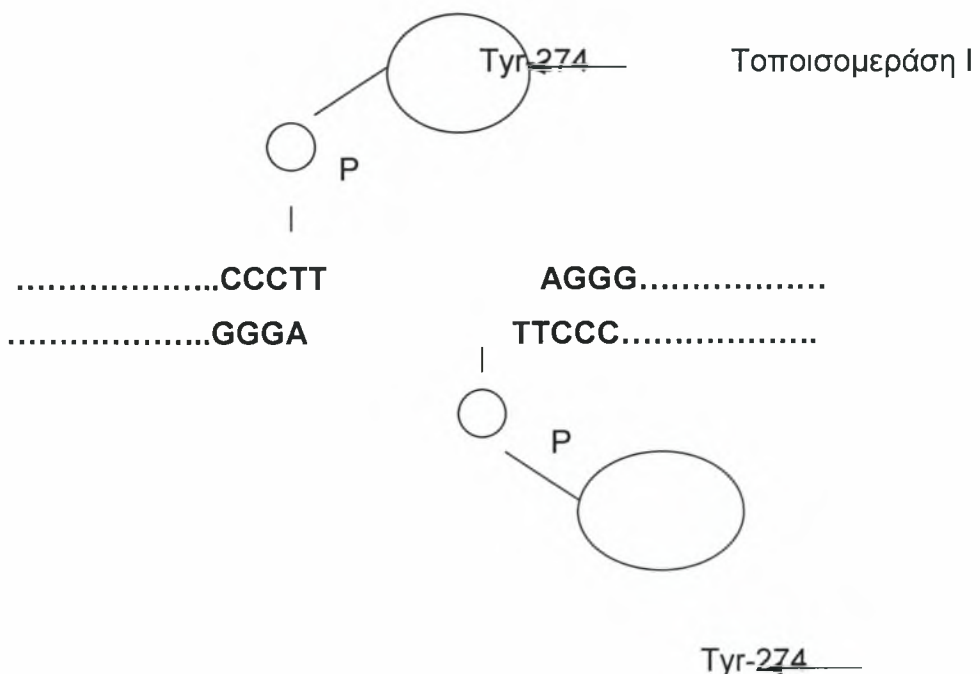
3.5 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

3.5.1 Εισαγωγή PCR προϊόντος σε φορέα κλωνοποίησης (in vitro ligation)

Το προϊόν της PCR αντίδρασης εισάγεται σε πλασμίδια τα οποία κλωνοποιούνται σε βακτήρια.

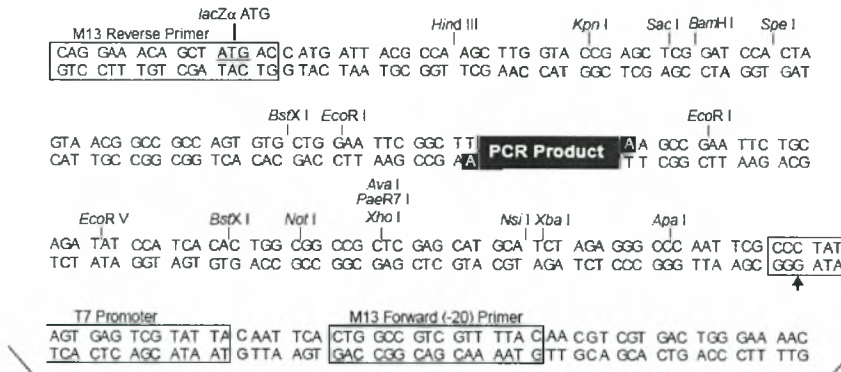
Τα πλασμίδια είναι μικρά εξωχρωμοσωμικά κυκλικά μόρια DNA που βρίσκονται σε βακτήρια. Διπλασιάζονται ανεξάρτητα από το γενωμικό DNA και βρίσκονται σε αριθμό από ένα μέχρι εκατοντάδες ανά κύτταρο. Τα πλασμίδια συχνά μεταφέρουν γονίδια που προσφέρουν αντίσταση στα αντιβιοτικά.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται για κλωνοποίηση βρίσκονται σε μη κυκλική μορφή με ένα μόριο θυμιδίνης στο τέλος κάθε άκρου. Το τοπίσομεράση I είναι σταθερά συνδεδεμένη στα πλασμίδια (activated vector). Η τοπίσομεράση I από τον ιό Vaccinia προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA του πλασμιδίου στα ελεύθερα άκρα του.



Στην περίπτωση μας επιλέχθηκε το πλασμίδιο PCR 2.1 της invitrogen που περιέχει:

1. Τον προαγωγέα έκφρασης της περιοχής LacZa ο οποίος επιτρέπει την έκφραση της περιοχής αυτής
2. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το επιθυμητό γονίδιο μπαίνει ανάμεσα στο γονίδιο και τον προαγωγέα του και αποτρέπει τη μεταγραφή των γονιδίου. Ως αποτέλεσμα η γαλακτοσιδάση δεν καταβολίζεται και το βακτήριο δεν χρωματίζεται.
3. Το ρεπλικόνιο pUc origin που εξασφαλίζει την αντιγραφή του πλασμιδίου και ως εκ τούτου τη βιωσιμότητα του και τον αυξημένο αριθμό πλασμιδίων στα βακτηριακά κύτταρα
4. Γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη
5. M13 forward και M13 reverse priming site. Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση των εκκνητών κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης.



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

- LacZ*α gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807



Η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής:

Παίρνουμε 3μl από το μονοκλωνικό προϊόν της PCR και τα τοποθετούμε σε ένα σωληνάριο.

Προσθέτουμε 1μl Buffer salt solution (invitrogen), 1μl sterile water και 1μl Ta vector (invitrogen).

Επιδράζουμε το μείγμα για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5.2 Μεταμόρφωση κυττάρων (invitrogen transformation)

Για τα τρυβλία:

Προτού ξεκινήσουμε, φροντίζουμε να φτιάξουμε θρεπτικό υλικό για αποικίες βακτηρίων. Αρχικά φτιάχνουμε LB ως εξής:

Για τελικό όγκο 1 λίτρο

- 10 gr bacto- tryptone
- 5 gr bacto- yeast extract
- 10 gr NaCl

Αφήνουμε το διάλυμα στον αναδευτήρα έως ότου διαλυθούν όλα τα συστατικά και στη συνέχεια το αποστειρώνουμε.

Στη συνέχεια, για να στρώσουμε δύο τρυβλία παίρνουμε 100 ml LB και 1,5 gr Agar Bact. Το διάλυμα μπαίνει ξανά για αποστείρωση και αφού κρυώσει, προσθέτουμε 100μl διαλύματος αμπικικιλίνης(συγκέντρωση 100gr/ml)

Παίρνουμε 2-3 μl απ'το ligation product, το βάζουμε στα κύτταρα toplof (E.Coli) και τα αφήνουμε στον πάγο για 15-30 λεπτά.

Στη συνέχεια βάζουμε τα κύτταρα στους 42⁰C για χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων (heat shock) και αμέσως μετά τα επανατοποθετούμε στον πάγο.

Προσθέτουμε 1 ml solsoc και τα τοποθετούμε στο shaker για μία ώρα.

Έπειτα βάζουμε 40 μl XGAL 40 μl IPTG στο σωληνάκι με τα κύτταρα και στρώνουμε τα κύτταρα σε δύο τρυβλία. Τα αφήνουμε να στεγνώσουν και τα βάζουμε σε κλίβανο στους 37⁰ C για τουλάχιστον 12 ώρες.

3.5.3 Επώαση μεταμορφωμένων κυττάρων

Σε σωληνάκια των 15 ml τρυπάμε τα καπάκια και βάζουμε 3 ml LB και 3μl αμπικιλίνης στο κάθε σωληνάκι. Τσιμπάμε με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες τις λευκές αποικίες από τα τρυβλία και τις τοποθετούμε στα σωληνάκια. Τα σωληνάκια μπαίνουν στο shaker για τουλάχιστον 12 ώρες ώστε να αναπτυχθούν τα μεταμορφωμένα κύτταρα σε υγρό θρεπτικό υλικό.

3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA (QIAprep Miniprep -QIAGEN)

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιούμε για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων. Η λύση ακολουθείται από συσσώρευση του πλασμιδιακού DNA πάνω σε μία στήλη πυριτίου σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων. Ακολουθούνται τρία βασικά βήματα:

1. Προετοιμασία και καθάρισμα του διαλύματος που περιέχει τα λυμένα βακτηριακά κύτταρα από πρωτεΐνες και RNA.
2. Αφομοίωση του DNA στη μεμβράνη (QIAprep membrane),
3. Πλύσιμο και έκλουση του πλασμιδιακού DNA.

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται χωρίς τη χρήση φαινόλης, χλωροφορμίου, βρωμιούχου εθιδίου και χωρίς αλκοόλη.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

P1 Buffer
P2 Buffer
N3 Buffer
PB Buffer
PE Buffer

Πριν εκκινήσουμε τη διαδικασία, μεταφέρουμε την υγρή καλλιέργεια κυττάρων σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρούμε ώστε να καθιζάνουν τα βακτήρια. Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο διάλυμα P1.

Προετοιμασία του διαλύματος που περιέχει τα λυμένα κύτταρα

Η λύση γίνεται σε αλκαλικές συνθήκες. Μετά την επαναδιάλυση των κυττάρων στο διάλυμα P1 προστίθεται στο σωληνάκι το διάλυμα P2 που περιέχει NaOH/SDS παρουσία Rnάσης A. Το SDS διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης οδηγώντας έτσι σε λύση του κυττάρου και απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών. Οι αλκαλικές συνθήκες προκαλούν αποδιάταξη του γενωμικού και πλασμιδιακού DNA. Ο χρόνος έκθεσης στο αλκαλικό διάλυμα πρέπει να είναι μικρός γιατί διαφορετικά η αποδιάταξη του πλασμιδίου μπορεί να είναι μη-αναστρέψιμη. Στη συνέχεια προσθέτουμε το διάλυμα N3 που επαναφέρει το pH σε φυσιολογικά επίπεδα και αυξάνει τη συγκέντρωση αλάτων. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων οδηγεί σε αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ το πλασμιδιακό DNA που δεν είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες επαναδιατάσσεται. Το χρωμοσωμικό DNA είναι ισχυρά συνδεδεμένο με το κυτταρικό τοίχωμα και με αδιάλυτα συστατικά όπως άλατα, αποδιατακτικά και πρωτεΐνες. Έτσι όταν στη συνέχεια φυγοκεντρούμε το διάλυμα, σχηματίζεται ένα ίζημα που περιέχει το χρωμοσωμικό DNA ενώ το πλασμιδιακό παραμένει διαλυμένο στο υπερκείμενο.

Αφομοίωση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου

Οι στήλες πυριτίου QIAprep spin column αφομοιώνουν επιλεκτικά το πλασμιδιακό DNA σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούμε καθαρίζουν τη στήλη από το RNA, τις κυτταρικές πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες που προήλθαν από τη λύση των κυττάρων ενώ εξασφαλίζουν την παραμονή του πλασμιδιακού DNA πάνω στη μεμβράνη.

Πλύση και έκλουση του πλασμιδιακού DNA

Οι ενδονουκλεάσες καταστρέφονται με την πλύση της μεμβράνης με το διάλυμα PB. Εξασφαλίζουμε έτσι ότι δεν θα γίνει πέψη του προϊόντος μας.

Στη συνέχεια απομακρύνουμε τα άλατα με το διάλυμα PE ώστε το πλασμιδιακό DNA να είναι καθαρό. Η έκλουση γίνεται με νερό και το DNA φυλάσσεται στους -20°C για να αποφευχθεί τυχόν αποδιάταξη εφόσον δεν χρησιμοποιούμε ρυθμιστικό διάλυμα για τη φύλαξη.

Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (QIAprep Miniprep)

- Μεταφέρουμε τις υγρές καλλιέργειες κυττάρων σε σωληνάκια φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούμε για τέσσερα λεπτά στις 14000 στροφές ανά λεπτό (rpm). Αδειάζουμε το υπερκείμενο (το ίζημα αποτελείται από τα κύτταρα).
- Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 250 μl διαλύματος P1 με ανάδευση.
- Προσθέτουμε 250 μl διαλύματος P2 και αναδεύουμε ήπια (η έντονη ανάδευση μπορεί να δημιουργήσει θραύσματα χρωμοσωμικού DNA τα οποία δεν διαχωρίζονται από το πλασμιδιακό).
- Προσθέτουμε 350 μl διαλύματος N3 και αναδεύουμε άμεσα.
- Φυγοκεντρούμε για δέκα λεπτά στις 14000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο στην QIAprep spin column (στήλη πυριτίου).
- Φυγοκεντρούμε για 30-60 δευτερόλεπτα στις 14000 rpm. Απορρίπτουμε το υποκείμενο.
- Ξεπλύνουμε τη στήλη με 500 μl του διαλύματος PB. Φυγοκεντρούμε για 30-60 δευτερόλεπτα στις 1400 rpm. Απορρίπτουμε το υποκείμενο.
- Ξεπλύνουμε τη στήλη με 750 μl του διαλύματος PE. Φυγοκεντρούμε για 30-60 δευτερόλεπτα στις 14000 rpm και απορρίπτουμε το υποκείμενο.
- Φυγοκεντρούμε για ένα ακόμη λεπτό ώστε να απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα διαλυμάτων.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάκι. Προσθέτουμε 100 μl νερού στο κέντρο της στήλης. Το αφήνουμε για ένα λεπτό σε

Θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 14000 rpm.

3.7 ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΖΥΜΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ-EcoRI (Roche)

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού αποτελούν ένζυμα που αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες δίκλωνου DNA και πέπτουν το DNA στις θέσεις αυτές δημιουργώντας τμήματα DNA με συγκεκριμένα άκρα (Benjamin Lewin, Genes, Ελληνική έκδοση, 2004 κεφ 2 σελ 47-70). Κάθε ένζυμο αναγνωρίζει και μία ειδική αλληλουχία. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιούμε περιέχει δύο θέσεις κοπής για το ένζυμο EcoRI εκατέρωθεν του γονιδίου που εισάγεται. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία

5'...G↓AATTC...3'

3'...CTTAA↑G...5'

Μετά την απόμόνωση του πλασμιδιακού DNA, το πλασμίδιο πρέπει να ελεγχθεί ώστε να εξακριβωθεί εάν έχει εισαχθεί το προϊόν της PCR. Αυτό γίνεται με πέψη του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο EcoRI.

Το πρωτόκολλο της πέψης που χρησιμοποιούμε είναι το εξής:

Μέσα σε σωληνάκια τοποθετούμε

DNA 10 μl

Digest buffer (Roche) 2 μl

dH₂O 6 μl

EcoRI 2 μl *

*η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 10 units / μl, δηλαδή για κάθε πέψη χρειαζόμαστε 20 units ενζύμου. Τα σωληνάκια μπαίνουν σε υδατόλουτρο στους 37 °C για διάστημα 4 έως 12 ωρών. Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης σε γέλη αγαρόζης 1,5% ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού γονιδίου (~ 350 βάσεις).

3.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ

Ο σκοπός της ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων είναι ο καθορισμός της σειράς των νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA. Στην ανάλυση αλληλουχίας βάσεων το υλικό που χρησιμοποιείται δεν είναι γενωμικό DNA αλλά PCR προϊόν (στην περίπτωση του direct sequencing) ή κλωνοποιημένο PCR προϊόν σε πλασμιδιακό DNA.

Το πλασμιδιακό DNA ή το PCR προϊόν (στην περίπτωση του direct sequencing), υποβάλλεται εκ νέου σε PCR με τη χρήση αυτή τη φορά μόνο ενός εκκινητή (primer), απλών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) και σημασμένων με φθοριόχρωμα διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP-διαφορετικό φθοριόχρωμα για κάθε διδεοξυνουκλεοτίδιο). Τα νουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά στην έλικα του DNA προστίθενται στο 3' άκρο του εκκινητή. Όταν προστίθεται στο άκρο διδεοξυνουκλεοτίδιο η αντίδραση επιμήκυνσης του προϊόντος σταματάει. Εφόσον τα διδεοξυνουκλεοτίδια είναι σημασμένα με φθοριόχρωμα, μπορούμε να ανιχνεύσουμε το χρώμα της τελευταίας βάσης αυτού του τμήματος με τη χρήση laser σε έναν αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας βάσεων.

3.10 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Για τον έλεγχο των υπερμεταλλάξεων γίνεται σύγκριση της αλληλουχίας του ασθενούς με αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων. Χρησιμοποιούνται οι βάσεις δεδομένων IMGT και Joinsolver.

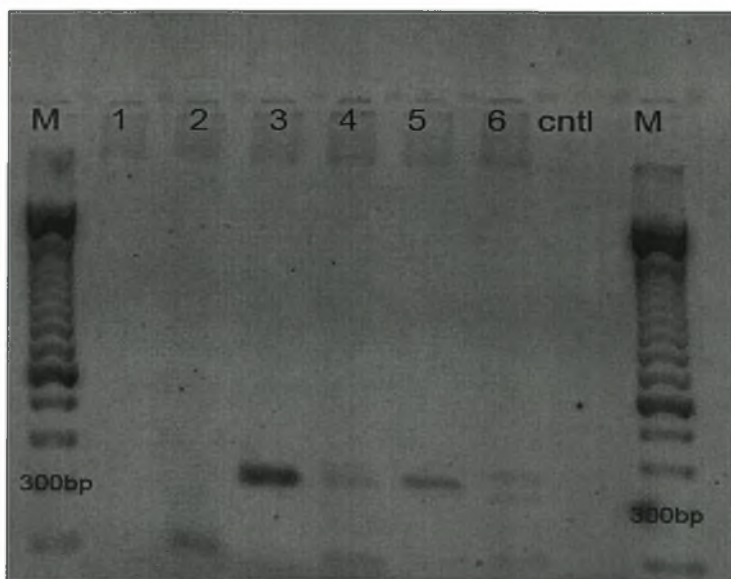
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 24 ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Το ποσοστό μεταλλάξεων πάνω από το οποίο η αλληλουχία θεωρείται υπερμεταλλαγμένη είναι το 2%. Έτσι ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία με ποσοστό μεταλλάξεων >2% στη μονοκλωνική V_H αλληλουχία τους έχουν ευνοϊκότερη κλινική πρόγνωση.

1^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTAGATTCATATTTAGTAGYTATC
GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCCAACATAAAGCATGATGGAAGTGAGAGGYACTATATGGACTCTGTGT
AGGGCCGATTCACCCCTCTCCAGAGACAACGCCAACAACTCGATGTATCT
GCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTCTATTACTGTGCG
AGAGGATTTTGTTCATGATGDTAGCTGCTACGGTGATCGTACGTTAGACT
ACTGGGGCCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCATC
```

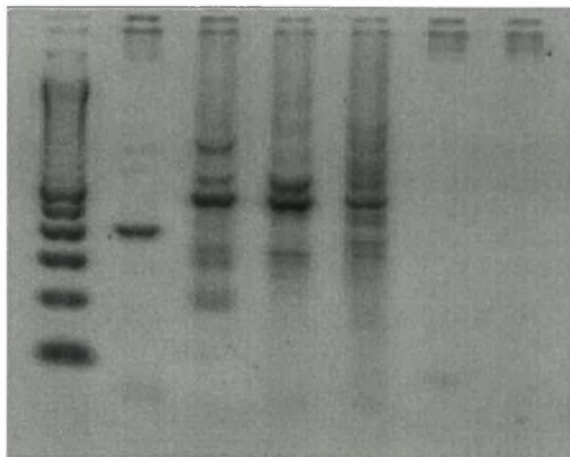
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η $V_H 3$ αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 3,12% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία. Το ποσοστό μεταλλάξεων είναι >2% στη μονοκλωνική V_H αλληλουχία τους και έτσι ο 1^{ος} ασθενής έχει ευνοϊκότερη κλινική πρόγνωση.

2^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCT
ATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA
TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTT
CCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTA
CATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGTATCGGATATTGTAGTAGTACCAGCTGCTATGGCCSTATGG
ATGTCTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC
CGTCTCCTCAGGTAA
```

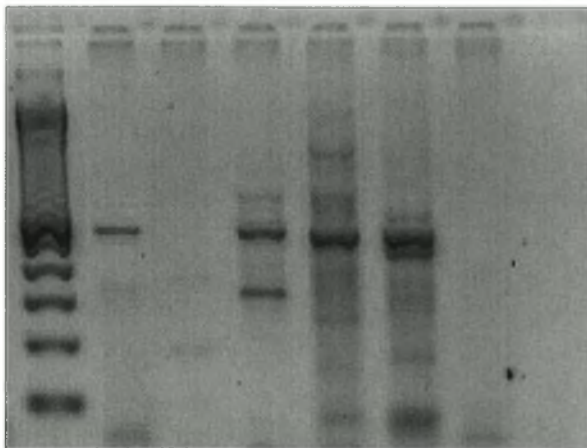
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,82% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία. Ο 2^{ος} ασθενής έχει ποσοστό μεταλλάξεων < 2% στη μονοκλωνική V_H.

3^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACCTGTGGATACACCTACCTTCACCA  
GTTACTACTATGTCACTAGGTGCGCCAGGCCCATGCACAAGGGCTTGAG  
TGGATGGGAAGGATGTGCCCTAGTGATGGCAGCATAAGCTACGCAGAG  
AAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACATCCACGAGCACA  
GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCATGTATT  
TGTTTCGAGGGGCTACGATTACGGGCCCTTTTTGAGGGGGGCATACTACT  
ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG  
GTAAGAAGGAGACCTT
```

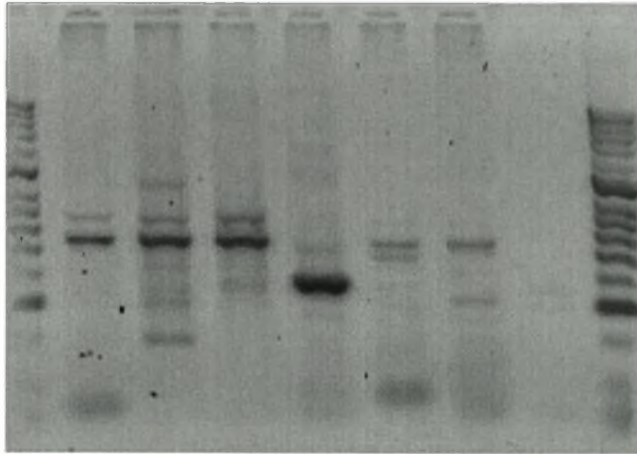
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 1,49% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

4^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
TTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGC
AGTAGTAACTGGTGTGAGTTGGGTCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGATTGGGGAAATCTATCATAGTGGGAGCACCAACTACAACCCG
TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACAAGTCCAAGAACCAGTT
CTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGAGAGGGGTGAGGGACAAGGATTTTTGGAGTGGACCCACCTTT
TTGACGGGGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCAGGTA
```

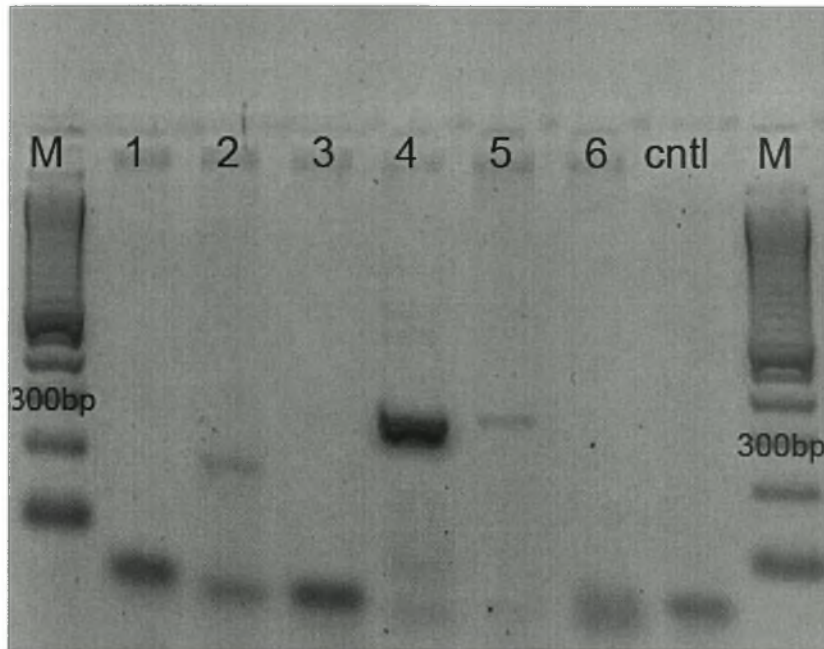
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 1,21% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

5^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCCCCATCAG
TAGTACTATTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGA
GTGGATTGGTTATGTGTATTACAGTGGGAAGCACCAATTACAACCCCTCCC
TCAAGAGTCGAGTCACCATATCGGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGGACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTCTATTATTGT
GCGAGAGATCGATATGGTAGTGGTGGTAGTGGCTTGCAACTGGTACTTC
GATTTGCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGG
```

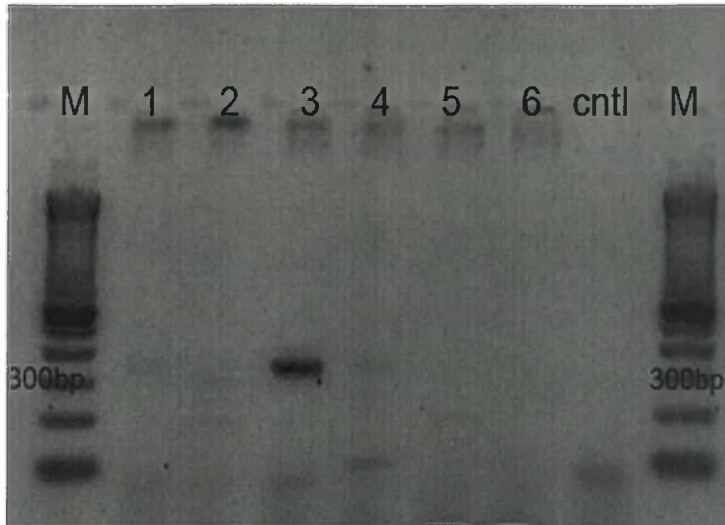
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 4,56 % σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

6^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAG  
CAGGAAAGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG  
AGTGGGTCTCAGCCATTACTGGCAGTGGTGCTTATACATACTACGCAGA  
CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACCTCCGACAACGCA  
CTGTTTCTGCACATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT  
ACTGTGCGACAGATAATGGCTTCCGCAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCA  
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 3 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 7,26% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

7^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAG
CTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
GATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAG
TTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAACCCCTCCCGGTTGGGATTTTTGGAGTGGTATTATACCCC
CCCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGGTAAG
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0.82% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

8^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGTTTCATCAGC  
TATGCCATACATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGTCTTGAGTGGA  
TGGGACGGATCAACGCTGGCAATGGTGACACAAAATATTCACAGAAGTT  
CCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGACCACAGCCTA  
CATGGAGGTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGC  
GCGAGGACCGACCCAGTGGCTGGTGTGGGGGGGTTCGTATCACTTTGAC  
TACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGA
```

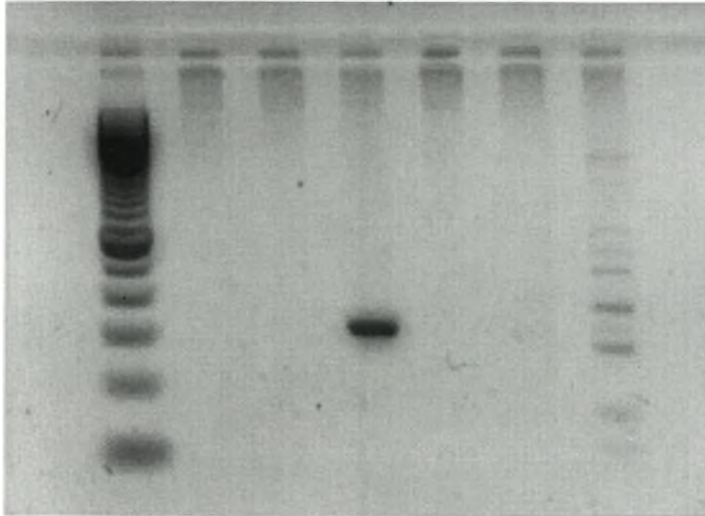
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 6,15% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

9^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG  
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT  
ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG  
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGATT  
ACGACTACGGTGACTACGTTTCGGAGTTGGGGCTGGAATATCGGCTCCAC  
GTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTA
```

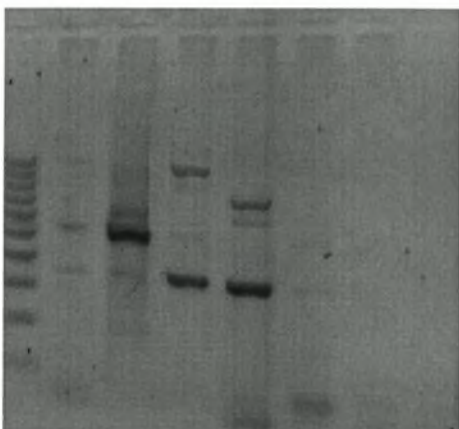
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 3 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

10^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
TGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTG
CACSTTGTCTGGGTTCTCACTCAACACTAGAGAAGTGGCTGTGGGCTGG
ATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGACCCTGGAGTGGATTGCACTCATTTATT
GGGATGATGATAAGCGCTACAGCCCTTCTCTGAAGAGCAGACTCACCAT
CACCAAGGACACCTCCAAAAACCGGGTACTCCTTACAATGACCAACATG
GACCSTGTGGACACAGGCACATATTTACTGTGCACACAGAGGGACTAACT
GGAATTACGATTTATACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTAATGA
```

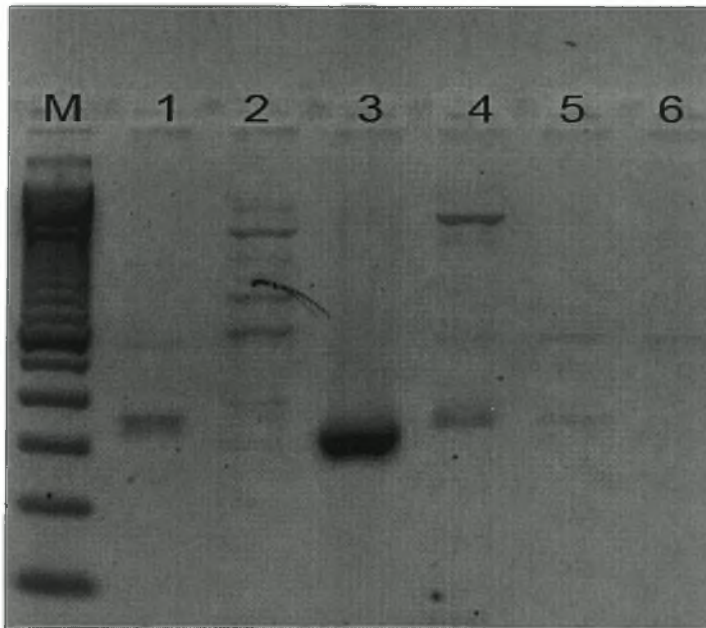
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H2 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 2 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 5,22% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

11^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
CATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGTTGCTATATTAGAAGGTG
ATTCATGGAGAACTAGAGATATTGAGTGTGAATGGGCATGAATGAGAGA
AACAGTGGGTATGTGTGGCAATTCTGACTTTTGTGTCTCTGTGTTTGCAG
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC
AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCGGATTCACTTCA
GTAGCTACGACGCACTGGGTCCGCCAACAGGAAAGGTCTGGAGTGGGT
CTCATATAGGAATAGTTGGTGACCACACTATCCAGGCTCCGTGAAGGGC
CGATTCACACATACTCCAGAGAAAATGCCAAGAACTCCTGGTTATCTACG
AAGTGAACAGCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGCATCACGGTGCAA
GACTGGAACGCTCCTAGAGTGTTTCTTTGACTCAAGAGGGCCCGATTGG
TTTTGATATAGGGGCC
```

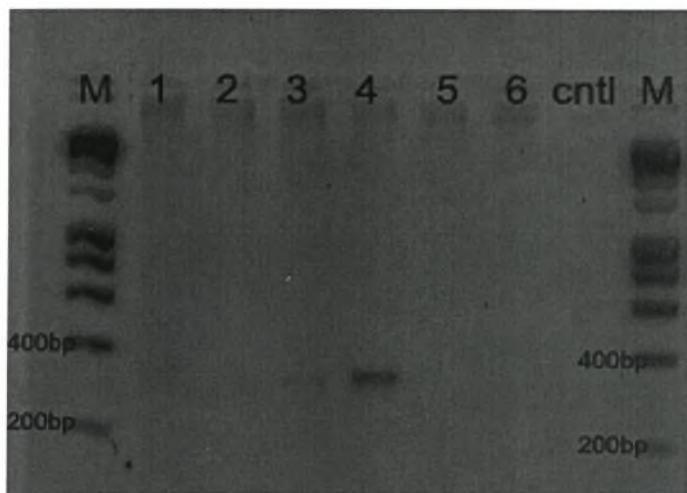
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 3 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 6,12 % σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

12^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Ηλεκτροφόρηση ασθενούς:



Αλληλουχία ασθενούς:

```
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAG
ACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACT
ACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG
GGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCTAGAG
TCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAG
CTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
GGCTCGTTGTGGGATAGTAGTGGTTATTACTCGAGTTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCTGGTAGT
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,41% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

13^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAG
CTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
GATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAG
TTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAGTAGCAGGATGGCTACAATTTATACCTACTACTACTACTACG
GTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTA
AGA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,82% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

14^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H 5 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
TACCGCCCAGGGGTTTTTCCCAGGTCACGACGTTGTAAAAACGACGGG
CCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCC
GCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATGCCCCCGGGCTGCAGCCCA
ATGTGGGATTCGCCCTTCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT
CTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCAGCTGGGTGCGCCAGATGCC
CGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGAGGATTGATCCTAGTGACTCTTAT
ACCAACTACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCACGTCACCATCTCAGCTGACA
AGTCCATCAGCACTGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGG
ACACCGCCATGTATTA CTGTGCGAGACATATGGGGATAGCAGCAGCTGG
TACGTGGGATTA CTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H5 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 5 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,40% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

15^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H 3 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTAG  
TAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCACACTCCAGGGAAGGGGCTGGA  
GTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGAC  
TCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAACAACCTCAC  
TGTATCTACAGATGAGCAGCCTCAGAGCCGACGACACGGCTCTATATTA  
CTGTGCCGAGAGGATATTGTAGTATTGCCACCTGCTATGGGGGCCGGTTC  
TTTGACTGCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 3 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 4,84% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

16^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
TCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGC  
TTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGC  
ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAG  
CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT  
GTATTACTGTGCGAGAGGATATTGTAATAATGGTGTATGCTATGCCTTAG  
GCCTTGGTCGGCGACCGGGGCCGAAGGGAGTATTACGATATTTTGACTG  
GTTATTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGG
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0 % σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

17^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGC  
TATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGG  
ATGGGATGGATCAACGCTGGCAATGGTAACACAAAATATTCACAGAAGTT  
CCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTA  
CATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTA  
GCTGTGCGAGACTCCAGTGGCTGTCACTTCACTACTTTGACTACTGGGGCCAGG  
GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,41% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

18^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGA  
AGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGACTGTCTATGGTGGGTCTT  
CAGTGGTTACTATTGGACCTGGATTCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCG  
GAGTGGCTTGGGGAAATTAATCATAGTGGAAGCAGCAACTACAATCCGC  
CCCTCAAGAGTCGAGTAACACTATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTT  
CTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTATTTACTTC  
TGTGCGAGACACGGTTACCGGGAACAGCAGCTGGGTCTGTCTACATTACT  
TCGGCTTGGACGTAGGCAGAGGGGGCGGGCGCAGGTTACTGCTCAAGAC  
CAGCAGGTGGCGCGCGGCCAAGCA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 7,02% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

19^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTAT  
GCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATATGTTT  
CAGCTATTAGTAGTAATGGGGGTAGCACATATTATGCAGACTCTGTGAAG  
GGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCA  
AATGGGCAGCCTGAGAGCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA  
GAACACATTGTGGTGGTGACTGCTATAACTTTGACTACTGGGGCCAGGG  
AACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGGTTAG
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H3 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 3 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

20^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTCGAA  
CCAGCGACTATCATTTATCGCCAGTACAATATTCACTCTCCACAGTAAT  
ACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTACAGAAATTCAGACTCAGGGAGAACT  
GGTTCTTGGACGTGTCTACTGATATGGTGACCCGACTCTTGAGGGACGG  
GTTGCAGTTGGTGCTCCCACTATGATTGATTTCCCAATCCACTCCAGCC  
CCCTTCCTGGGGGCTGGCGGATYCAGCTCCAGTTGTAACCACTGAAGGA  
GCCACCATAGACAGCGCAGGTGAGGGACAGGGTCTCCGAAGA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 4,88% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

21^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
ACTAACCTGAGGAGACGGTGACCGCGGTCCCTCGGCCCCAGACGTCAC
ATAGCGTCTGTTCGAGGAGCAGCTGCCACCACTACAACCGGGGCCTCTC
GCACAGAAATACACAGCCGTGTCCGCGGCGGTCAGCGAGTTCATCTACA
GGGADAACCTGGTTCTTGGACGTGTCTACTGATATGGTGACTCGACTCCT
GTGGTTCGACTCTTGAGGGACGGGTGTAGTTGGTGCTTCCACTATAATC
GATTTCCCCGATCCACTCCAGCCCCTTCCCAGGGGGCTGGCGAACCCA
GCTCCAGTAGTGCCCACTGAAGGACCCACCATAGACAGCGCAGGTGAG
GTGACAGGGTCTCCGAAGT
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H4 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H4 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 22,81% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία. Το υψηλό ποσοστό των μεταλλάξεων οφείλεται στη ύπαρξη μιας επιπλέον αλληλουχίας βάσεων (insert ACCACAGGGTCG) στη θέση 214 της γενωμικής αλληλουχίας του γονιδίου V_H4 . Για την επιβεβαίωση του ποσοστού των μεταλλάξεων και της ύπαρξης της επιπλέον αλληλουχίας, έγιναν εκ νέου:

- δύο ανεξάρτητες PCR για την ενίσχυση των βαριών αλυσίδων ανοσοσφαιρινών,
- Τεκμηρίωση μονοκλωνικότητας στην οικογένεια V_H4,
- Κλωνοποίηση των μονοκλωνικών PCR προϊόντων σε TA vector
- Διαμόλυνση E. Coli (TOP10F) και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από 12 συνολικά αποικίες
- Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων πλασμιδίων (Beckman-Coulter CEQ8000)

22^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H2 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
CTTACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTCGAA  
CCAGTTCGTTTCGTTCCCGATAACCACTCCAAAAATCGTAATACACCCTAG  
TCCGTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCAT  
GGTAAGGACCACCTGGCTTTTGGAGGTGTCCTTGGAGATGGTGAGCCTG  
CTCTTCAGAGATGTGCTGTAGGATTTTTTCGTCATTCGAAAAAATGTGTGC  
AAGCCACTCCAGGGCCTTCCCTGGGGGCTGACGGATCCAGCTCACACC  
CATTCTAGCATTGCTGAGTGAGAACCCAGAGACGGTGCAGGTCAGCGTG  
AGGGTCTCTGTGGGTTTCACCAGCGTAGGACCAGAC
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H2 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 2 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0,73% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

23^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: περιφερικό αίμα

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAG
CTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
GATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAG
TTCCAGGGCAGAGTACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGAGATCGGGGGTATAGCAGCTCGTGGCTGGGTGGGGAGAAC
AGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC
AGGTAAG
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 0.82% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

24^{ος} ΑΣΘΕΝΗΣ:

Είδος δείγματος: Μυελός (Το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από μυελό είναι κοινό με αυτό για απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα)

Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι ο ασθενής φέρει μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια.

Αλληλουχία ασθενούς:

```
AGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACTACGCACA  
GAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCAC  
AGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA  
TACTGTGCGAGAGGTATCGGATATTcGTAGCTAGTACCAGCTGCTATGG  
CCCTATGGATGTCTACTACTACTACATGGACGTA CTGGGGCAAAGGGAC  
CACGGTCACCGTACTCCTCAGGTAA
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Τεκμηριώθηκε μονοκλωνικότητα στη V_H1 οικογένεια. Από την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων προέκυψε ότι η V_H 1 αλληλουχία του ασθενούς φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό 6,12% σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι μία ασθένεια που εμφανίζεται συχνότερα από οποιαδήποτε άλλη μορφή λευχαιμία. Στις Η.Π.Α μόνο, διαγιγνώσκονται 10.000 νέες περιπτώσεις το χρόνο, πολύ μεγάλο νούμερο αν λάβει κανείς υπ'όψιν του τη σοβαρότητα της νόσου. Παρόλο που η συχνότητα είναι αυξημένη σε ηλικίες άνω των 70, η διάγνωση σε μικρές ηλικίες δεν θεωρείται καθόλου σπάνια. Μάλιστα ο μέσος όρος ηλικίας ασθενών στους οποίους διαγιγνώσκεται η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι τα 55 έτη.

Όπως αναφέρθηκε, ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος που χαρακτηρίζει τη νόσο θεωρείται η μεγάλη ετερογένεια των συμπτωμάτων και οι απρόβλεπτες συνέπειες στην επιβίωση του ασθενούς. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες οι συνέπειες της νόσου μπορεί να είναι τέτοιες που να οδηγήσουν το νοσούντα στο θάνατο σε ελάχιστο χρονικό διάστημα, καθώς και περιπτώσεις στις οποίες είναι ήπιες και στις οποίες η επιβίωση του ασθενή επιμηκύνεται για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η χρήση συστημάτων σταδιοποίησης των Rai και Binet είναι ουσιαστικά μία προσπάθεια κατάταξης του ασθενούς σε μία ομάδα επικινδυνότητας που βασίζεται σε κλινικά χαρακτηριστικά. Για πολλά χρόνια οι αιματολόγοι χρησιμοποιούν τα δύο αυτά συστήματα για εκτίμηση της σοβαρότητας της κατάστασης και για την έναρξη της θεραπείας. Θεραπεία δίδεται στους ασθενείς μετά από εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου. Συγκεκριμένα, απαραίτητη θεωρείται η θεραπεία σε ασθενείς που βρίσκονται είτε στο στάδιο 3 ή 4 κατά Rai ή στο στάδιο 2 ή 3 κατά Binet.

Στους ασθενείς που βρίσκονται σε πρωιμότερα στάδια η τακτική που ακολουθείται είναι αυτή της στένυς παρακολούθησης καθώς η θεραπεία σε αυτά τα στάδια δεν είναι απαραίτητη, εκτός εάν παρατηρηθεί γρήγορη εξέλιξη της νόσου με πολύ έντονα συμπτώματα, όπως μειωμένη αντοχή σε δραστηριότητα ή επιπλοκές λόγω προβλημάτων στο σπλήνα, στο ήπαρ και στους λεμφαδένες.

Ουσιαστικά, τα συστήματα σταδιοποίησης από μόνα τους, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως επαρκή προκειμένου να σχηματιστεί μια πλήρης εικόνα για την κατάσταση του ασθενούς και την πορεία της νόσου. Για το λόγο αυτό, απαραίτητη θεωρείται η μελέτη και άλλων παραμέτρων. Έρευνες διεξάγονται σε διεθνές επίπεδο με στόχο τη δυνατότητα συσχέτισης της πορείας της νόσου με μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά.

Οι κυριότερες παράμετροι που μελετώνται και θεωρούνται δείκτες κακής πρόγνωσης είναι τα κάτωθι:

1. Ελλείψεις στα χρωμοσώματα 11q και 17p
2. Απουσία υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης
3. Έκφραση κυτταροπλασματικής ZAP 70
4. Μικρός χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων
5. Αυξημένα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης
6. Αυξημένα επίπεδα διαλυτής CD 23
7. Αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης θυμιδίνης
8. Έκφραση πρωτεΐνης επιφανείας CD 38

Οι τέσσερις πρώτες παράμετροι είναι αποδεδειγμένα χρήσιμες στην εκτίμηση για την πορεία της νόσου ανεξαρτήτως σταδίου, ενώ η διαγνωστική αξία των υπολοίπων δεν είναι απολύτως αποδεδειγμένη.

Παρόλα αυτά, η μελέτη των αποδεδειγμένα χρήσιμων παραμέτρων σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολη και δεν πραγματοποιείται εύκολα σε ένα εργαστήριο.

Οι κυτταρογενετικές μεταβολές μελετώνται με φθορίζων *in situ* υβριδισμό, τεχνική χρονοβόρα και ακριβή και η ανίχνευση των υπερμεταλλάξεων γίνεται με ένα συνδυασμό τεχνικών, η διεξαγωγή των οποίων είναι επίσης ακριβή και χρονοβόρα.

Ένα ακόμη θέμα που προκύπτει είναι ότι οι μελέτες για τα μοριακά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκαν σε περιορισμένα αριθμητικά δείγμα ατόμων και συνήθως η κάθε παράμετρος εξεταζόταν ξεχωριστά και όχι σε σχέση με τις υπόλοιπες. Επομένως, μέχρι στιγμής δεν μπορεί να αποφασιστεί η έναρξη θεραπείας με βάση μόνο τους προγνωστικούς δείκτες που προαναφέραμε. Πρέπει λοιπόν να καθοριστεί εάν ασθενείς με κακή πρόγνωση ευνοούνται από τη θεραπεία ανεξάρτητα από το στάδιο στο οποίο βρίσκονται, καθώς και αν η θεραπεία αυτή μπορεί να εμποδίσει τη συμπτωματολογία της νόσου και να καθυστερήσει την εξέλιξη της στα επόμενα στάδια. Επιπρόσθετα, πρέπει να μελετηθούν πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ των προγνωστικών παραμέτρων και της θεραπευτικής προσέγγισης που ακολουθείται.

Ο προγνωστικός παράγοντας που μελετήθηκε με αφορμή την παρούσα πτυχιακή εργασία, οι υπερμεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες. Βέβαια, κανένας προγνωστικός παράγοντας δε δύναται να δώσει σημαντικά αποτελέσματα εάν μελετηθεί ξεχωριστά από τους υπολοίπους και ξεχωριστά από την κλινική εικόνα του ασθενούς.

Έχουν ήδη δημιουργηθεί ομάδες κλινικού ελέγχου ασθενών που βρίσκονται σε πρώιμα στάδια της νόσου. Στις μελέτες αυτές οι ασθενείς εξετάζονται για τις παραμέτρους που προαναφέραμε και κατόπιν εκείνοι που φέρουν αρνητικούς προγνωστικούς παραγοντες χωρίζονται σε δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα δε λαμβάνει αγωγή – καθότι είναι σε πρώιμο στάδιο, ενώ η δεύτερη λαμβάνει κανονικά. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών θα είναι διαφωτιστικά όσον αφορά τη σχέση πρόγνωσης-θεραπείας που βέβαια θα καθορίσει και τη μελλοντική τους χρήση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999;17(1):399–408.

Linet MS. Chronic lymphocytic leukemia. In: Polliack A, Catovsky D, editors. *The epidemiology of chronic lymphocytic leukemia*. Chur: Harwood Academic Publishers; 1988. p. 11–32.

Sgambati M, Linet MS, Devesa S. Chronic lymphoid leukemias. In: Cheson BD, editor. *Chronic lymphoid leukemias*. 2nd ed. New York: M. Dekker; 2003. p. 33–62.

Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1996;92(1):97–103.

Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 1992;176(5):1319-26.

RAI KR Introduction: Chronic lymphocytic leukemia in perspective. *Best Pract Res Clinical Haematology*. 2007 Sep;20(3):363-5.

Yair Herishanu, Aaron Polliack: *Chronic lymphocytic leukemia: A review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options*. Elsevier. 2005;32:85-97.

Brian L. Abbott: Chronic Lymphocytic leukemia:Recent Advances in Diagnosis and Treatment.The Oncologist.2006;11:21-30

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975;46: 219-234.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981;48:198-206.

Marco Montillo, Terry Hamblin, Michael Hallek, Emili Montserrat, Enrica Morra: Chronic Lymphocytic Leucemia: Novel prognostic factors and their relevance for risc adapted therapeutic strategies.Haematologica.2005;90:391-399.

Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. Br J Haematol 1986;62:567–575.

Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. Cancer 1987;60:2712–2716].]

Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. Blood. 2007 Aug 7

Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999;94:1840–1847.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848–1854.

Lin K, Sherrington PD, Dennis M et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1404–1409.

Krober A, Seiler T, Benner A et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410–1416.

Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764–1775.

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944–4951.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910–1916.

Thornton PD, Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA et al. Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J*. 2004;5:47–54.)

Que TH, Marco JG, Ellis J, et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993;82(2):571–575.

Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today*. 1995;16:237–242..

Gerard Tobin, The Immoglobulin Genes and Chronic Lymphocytic Leucemia, *Upsala J Med Sci.* 2004; 109: 97-114.

Kitamura D, Kudo A, Schaal S, et al. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell.* 1992;69:823–831

Korsmeyer SJ, Hieter PA, Sharrow SO, et al. Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med.* 1982;156:975–985.

Brauninger A, Goossens T, Rajewsky K, et al. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 3631–3637

Goldsby RA, Kuby J. *Immunology* (ed 5.). New York: W.H. Freeman; 2003.

Kelsoe G. The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Seminars in Immunology* 1996;8:179–184.

Rajewsky K, Forster I, Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science.* 1987;238:1088–1094

Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 2000;13:37–45.

Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188:1679–1689.

Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102(8):1515–25.

Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840–1847.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94(6):1848–54..

Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, et al. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;96:377–379

Schena M, Larsson LG, Gottardi D, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;79(11):2981–9.

Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194(11):1625–38.

Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99(11):4087–93.

