



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας

Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

---

**Διδακτορική Διατριβή**

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΑΣΙ ΚΑΙ  
ICOS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΜΦΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ"**

**Αντιγόνη Α. Μαμάρα**

Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2014

**Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.**

© 2014 Αντιγόνη Μαμάρα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5<sup>η</sup>/29-01-2014  
ΓΣΕΣ):**

<b>1<sup>ος</sup> Εξεταστής (Επιβλέπων)</b>	<b>Δρ. Ματθαίος Σπελέτας</b> <i>Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>2<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής</b> <i>Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>3<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Ζωή Δανιήλ</b> <i>Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>4<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης</b> <i>Καθηγητής Πνευμονολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>5<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς</b> <i>Καθηγητής Φυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>6<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Λάζαρος Σακκάς</b> <i>Καθηγητής Ρευματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
<b>7<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>Δρ. Γεώργιος Βασιλόπουλος</b> <i>Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>

*Research is to see what everybody else has seen,  
and to think what nobody else has thought.*

Albert Szent-Györgi (1893-1986)

*Στους γονείς μου, Απόστολο και Αρετή*

# **"ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΑΧΙ ΚΑΙ ΙCOC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΛΕΜΦΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ"**

**Αντιγόνη Α. Μαμάρα**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας, (Επιβλέπων),** Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής,** Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ζωή Δανιήλ,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

Βιογραφικό σημείωμα .....	10
Πρόλογος .....	16
Συνοτομογραφίες .....	<b>19</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>21</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>22</b>
1.1 Ανάπτυξη, ωρίμανση και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων .....	22
1.2 Τα μόρια BAFF και APRIL είναι προσδέτες των υποδοχέων BAFFR και TACI .....	25
1.3 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης BAFFR στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων .....	27
1.4 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης TACI στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων .....	31
1.5 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης ICOS στις θυμοεξαρτώμενες ανοσιακές απαντήσεις .....	35
1.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών BAFFR, TACI και ICOS στις αντισωματικές ανοσοανεπάρκειες .....	37
1.7 Ο ρόλος των πρωτεϊνών BAFFR και TACI στα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα .....	42
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>46</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>47</b>
1. Ασθενείς και μάρτυρες .....	48
2. Υλικά .....	52
2.1 Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά .....	52
3. Μεθοδολογία .....	59
3.1 Ανοσοφαινοτυπική μελέτη .....	59
3.1.1 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών BAFFR και TACI στους διάφορους υποπληθυσμούς των φυσιολογικών Β-κυττάρων .....	59
3.1.2 Μελέτη των νεοπλασματικών κυττάρων σε ασθενείς με Β χρόνια λεμφοπαραγωγά σύνδρομα .....	61
3.1.2.1 Τυποποίηση λεμφοπαραγωγών συνδρόμων .....	61

3.1.2.2 Έλεγχος έκφρασης των μορίων IgD και CD27 στα νεοπλασματικά B-κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ.....	62
3.1.2.3 Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης BAFFR στα νεοπλασματικά και στα φυσιολογικά B-κύτταρα .....	63
3.1.2.4 Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης TAC1 στα νεοπλασματικά B-κύτταρα .....	63
3.2 Λειτουργική μελέτη.....	64
3.2.1 Απομόνωση μονοπυρήνων περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος .....	64
3.2.2 Καλλιέργεια των B νεοπλασματικών κυττάρων και μελέτη της απόπτωσης .....	64
3.3 Ορολογική μελέτη .....	66
3.3.1 Ανοσονεφελομετρία για τη μέτρηση της συγκέντρωσης τάξεων και υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών .....	66
3.3.2 Προσδιορισμός των επιπέδων BAFF και ARPIL στον ορό .....	67
3.4 Μοριακή μελέτη .....	68
3.4.1 Απομόνωση RNA.....	68
3.4.2 Σύνθεση cDNA .....	68
3.4.3 Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων <i>TNFRSF13B</i> και <i>TNFRSF13C</i> σε μεταγραφικό επίπεδο .....	69
3.4.4 Απομόνωση DNA .....	71
3.4.5 Μελέτη του επιπέδου υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλυσού της ανοσοσφαιρίνης.....	72
3.4.6 Αλληλούχιση βάσεων του γονιδίου <i>TNFRSF13B</i> /TAC1.....	73
3.4.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψη με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP) για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών <i>TNFRSF13B</i> -P251L, <i>TNFRSF13B</i> -V220A, <i>TNFRSF13C</i> -P21R και <i>TNFRSF13C</i> -H159Y .....	75
3.4.8 Μελέτη ελλείψεων του γονιδίου ICOS με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	77
3.5 Στατιστική ανάλυση .....	78
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>80</b>
4.1.1 Γενετικές βλάβες του <i>TNFRSF13B</i> γονιδίου σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες- Συχνότητα εμφάνισης των βλαβών .....	81
4.1.2 Γενετικές βλάβες του <i>TNFRSF13B</i> γονιδίου σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες- Κλινικές συσχετίσεις.....	82
4.2 Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΧΛΛ.....	87
4.3 Έκφραση των πρωτεϊνών BAFFR και TAC1 στους διάφορους υποπληθυσμούς των φυσιολογικών B-κυττάρων με κυτταρομετρία ροής .....	91



4.4 Έκφραση του <i>TNFRSF13C</i> γονιδίου σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στα φυσιολογικά και στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα.....	92
4.5 Έκφραση του <i>TNFRSF13B</i> γονιδίου σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα.....	95
4.6 Συσχέτιση των πρωτεϊνών TACI και BAFFR με την πρωτεΐνη CD38 και το επίπεδο υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλυσού.....	97
4.7 Προσδιορισμός των προσδετών BAFF και APRIL στον ορό ασθενών με ΧΜΛ και φυσιολογικών μαρτύρων.....	98
4.8 Προσδιορισμός των πολυμορφισμών <i>TNFRSF13B-P251L</i> , <i>TNFRSF13B-V220A</i> , <i>TNFRSF13C-P21R</i> και <i>TNFRSF13C-H159Y</i> και ελλείψεων του <i>ICOS</i> στους ασθενείς με ΧΜΛ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες.....	99
<b>5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>102</b>
Περίληψη .....	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	111

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Όνοματεπώνυμο:** Μαμάρα Αντιγόνη  
**Διεύθυνση:** Ασκληπιού 52  
Λάρισα  
41222  
Ελλάδα  
Τηλ.: +30 2410 621493  
Κιν.: +30 6973 346787  
**E mail:** antigoneta@gmail.com  
**Ημερομηνία Γέννησης:** 06 Αυγούστου 1984  
**Τόπος Γέννησης:** Λάρισα  
**Υπηκοότητα:** Ελληνική  
**Οικογενειακή Κατάσταση:** Άγαμη

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**2002 – 2007** Απόφοιτη **Βιολογίας** **Αριστοτελείου** **Πανεπιστημίου**  
**Θεσσαλονίκης**  
*Βαθμός πτυχίου:* 7.17 (Λίαν Καλώς)  
**1999 – 2002** **Απολυτήριο 4<sup>ου</sup> Ενιαίου Λυκείου Λάρισας**  
*Βαθμός Απολυτηρίου:* 18 και 8/10 (Άριστα)

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**7/2008-σήμερα:** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα: Μελέτη των γονιδίων και των πρωτεϊνών TACI και ICOS σε ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Η μελέτη χρηματοδοτείται από το Ερευνητικό Έργο «Ηράκλειτος ΙΙ».

**7/2006-8/2006:** Πρακτική άσκηση, Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**9/2005-5/2006:** Διπλωματική εργασία με θέμα: Χαρακτηρισμός και αντιμικροβιακή δράση ουσιών που παράγονται από το προβιοτικό βακτήριο *Bacillus subtilis*. Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

## ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 2012** Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση, με τίτλο: Μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού ANXA11-R230C με τη σαρκοείδωση και την κοκκιωματώδη νόσο της Κοινής Ποικίλης Ανοσοανεπάρκειας. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
- 2010** Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση, με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος.
- 2010** Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση, με τίτλο: Η έκφραση των υποδοχέων TACI και BAFFR σε ασθενείς με Σαρκοείδωση. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ρόδος.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. A BAFF/APRIL signaling approach to the biology of chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia* 2014 (submitted), (**Mamara A**, et al.).
2. Identification of a STAT5 target gene, Dpf3, provides novel insights in chronic lymphocytic leukemia, *Plos One* 2013, 8(10):e76155. (Theodorou M, Speletas M, **Mamara A**, Papachristopoulou G, Lazou V, Scorilas A, Katsantoni E).
3. Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1 $\beta$  secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes, *Hippokratia* 2013, 17(2):141-5. (Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antonjadi G, Golfinopoulos S, Liakopoulos V, **Mamara A**, Speletas M, Koukoulis G, Stefanidis I).
4. Transient ischemic attacks as the first presentation of JAK2-V617F positive chronic myeloproliferative neoplasm, *Hematol Rep* 2012, 4(2):e12. (Kalala F, **Mamara A**, Ioannou M, Speletas M).
5. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* NCIMB 3610 that exhibits antimicrobial activity against fish pathogens, *Journal of Biological Research-Thess* 2012, 18:310-9. (**Mamara A**, Karamanlidou G, Frydas I, Touraki M).
6. *TNFRSF13B*/TACI Alterations in Greek Patients with Antibody Deficiencies, *J Clin Immunol* 2011, (4):550-9. (Speletas M, **Mamara A**, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, Kanariou M, Germenis AE).

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. **Μαμάρα Α**, Παλασοπούλου Μ, Γιαννακούλας Ν, Μανδαλά Ε, Μπαντή Α, Γερμενής ΑΕ, Σπελέτας Μ. Μελέτη της πρωτεΐνης TAC1 στη Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. 5<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 28-30 Μαρτίου 2013, Λάρισα, Βιβλίο Περιλήψεων, σελ.:117.
2. **Mamara A**, Kalala F, Florou Z, Mandala E, Palasopoulou M, Mpardaka F, Giannakoulas N, Mpanti A, Germenis AE, Speletas M. *TNFRSF13B/TAC1* and *TNFRSF13C/BAFFR* in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). 3<sup>rd</sup> European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, *Immunology*, 137 (Suppl.1):162.
3. **Mamara A**. Mbl deficiency in patients with antibody deficiencies. Workshop: Methods in Primary Immunodeficiency, 13-16 May 2012, Kirchzarten, Germany.
4. **Μαμάρα Α**, Μπαρδάκα Φ, Μανδαλά Ε, Παλασοπούλου Μ, Κάρτσιος Χ, Λιαδάκη Κ, Γιαννακούλας Ν, Τσιόνη Κ, Εφραιμίδου Σ, Παπαδούλης Ν, Καρτάσης Ζ, Ματσουκά Π, Καλαλά Φ, Σπελέτας Μ. Μελέτη της έκφρασης των *TNFRSF13B/TAC1* και *TNFRSF13C/BAFFR* σε ασθενείς με χρόνια Β λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα. 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2011, 2 (Suppl.4):143.
5. **Μαμάρα Α**, Καλαλά Φ, Κάρτσιος Χ, Λιαδάκη Κ, Μπαρδάκα Φ, Εφραιμίδου Σ, Παπαδούλης Ν, Ματσουκά Π, Γερμενής ΑΕ, Σπελέτας Μ. Ταυτόχρονη έκφραση κ και λ ελαφρών αλύσων σε Β-λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29 Απριλίου-2 Μαΐου 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:176.
6. **Μαμάρα Α**, Μπαρδάκα Φ, Λιαδάκη Κ, Μπούκας Κ, Γερμενής ΑΕ, Σπελέτας Μ. Χαμηλή έκφραση BAFF-R ως αίτιο κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 29 Απριλίου-2 Μαΐου 2010, Αργοστόλι Κεφαλλονιάς, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, Βιβλίο περιλήψεων, σελ.:18.
7. **Μαμάρα Α**, Καλαλά Φ, Λιαδάκη Κ, Παπαδούλης Ν, Μανδαλά Ε, Παπαδάκης Ε, Γιαννακούλας Ν, Παλασοπούλου Ν, Λαφιωνιάτης Σ, Κιουμή Α, Κοραντζής Ι, Καρτάσης Ζ, Ιωάννου Μ, Ματσουκά Π, Σπελέτας Μ. Μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B* σε ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, 19-22 Νοεμβρίου 2008, Αθήνα, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2008, 11 (Suppl.1):122.
8. **Mamara A**. Expression and molecular analysis of *TNFRSF13B* gene in B-cell chronic lymphoproliferative disorders (LPDs) – Preliminary results. 1<sup>ο</sup> Σεμινάριο στην

Ανοσολογία (Summer School in Immunology), 28 Ιουλίου-1 Αυγούστου 2008, Χανιά, Ελληνική Ακαδημία Ανοσολογίας.

9. **Μαμάρα Α**, Τουλούπη Α, Τουράκη Μ, Καραμανλίδου Χ. Ανασταλτική δράση των προβιοτικών βακτηρίων *Bacillus subtilis* και *Lactococcus lactis* στην ανάπτυξη στελεχών διαφόρων μικροοργανισμών. 28<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Βιολογίας, 18-20 Μαΐου 2006, Ιωάννινα, Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Βιβλίο Περιλήψεων, σελ.:239.

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. Speletas M, Moschovi M, Argentou N, Kolokotsa E, **Mamara A**, Pieper K, Adamaki M, Eibel H, Germenis AE. *TNFRSF13B/TAC1* and *TNFRSF13C/BAFFR* expression in acute lymphoblastic leukemia. 18<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, 13-16 June 2013, Stocholm, *Haematologica* 2013, 98 (Suppl.1):509.
2. Αργέντου Ν, **Μαμάρα Α**, Βασιλόπουλος Γ, Βλαχοστέργιος Π, Παπαχαραλάμπος Κ, Ιωάννου Μ, Γερμενής ΑΕ, Σπελέτας Μ. Ταχεία ανίχνευση της μετάλλαξης MYD88-L625P με PCR-RFLP, που σχετίζεται αιτιολογικά με την μακροσφαιριναιμία Waldenstrom. 5<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 28-30 Μαρτίου 2013, Λάρισα, Βιβλίο Περιλήψεων, σελ.:118.
3. Σπελέτας Μ, Κολοκοτσά ΕΝ, Αργέντου Ν, **Μαμάρα Α**, Αθανασιάδου Α, Αδαμάκη Μ, Μοσχόβη Μ. Μελέτη της έκφρασης των *TNFRSF13B/TAC1* και *TNFRSF13C/BAFFR* στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ). 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 22-24 Νοεμβρίου 2012, Θεσσαλονίκη, *Haema* 2012, 3 (Suppl.4): 29.
4. Speletas M, Iordanakis G, **Mamara A**, Florou Z, Papadopoulou-Alataki E & Germenis AE. Influence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency on the clinical presentation of patients with antibody deficiencies. 3<sup>rd</sup> European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, *Immunology*, 137 (Suppl.1):196.
5. Σπελέτας Μ, **Μαμάρα Α**, Καλαλά Φ, Λιαδάκη Κ, Μπαρδάκα Φ, Νικούλης Δ, Γερμενής ΑΕ. Επίπτωση ασυμπτωματικών εκλεκτικών ανεπαρκειών των ανοσοσφαιρινών στους υπερήλικες. 4<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 29-31 Μαρτίου 2012, Λάρισα, Βιβλίο Περιλήψεων, σελ.:95.
6. Μπουρδάκης Ε, Γκάσταρη Β, Κατωδρύτου Ε, **Μαμάρα Α**, Χατζηαγγελίδου Χ, Τσιόνη Κ, Καλαλά Φ, Μανδαλά Ε, Σπελέτας Μ. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της οστεοπροτεγερίνης (*OPG*) και πολλαπλούν μυέλωμα. 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2011, 2 (Suppl.4):84.
7. Γιαμούρης Ε, Μπεφάνη Μ, **Μαμάρα Α**, Παλασοπούλου Μ, Καλαλά Φ, Τσέζου Α,

- Μπατσουκά Π, Σπελέτας Μ. Μελέτη του γονιδίου *FLT3* σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Πρόδρομα Αποτελέσματα. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 10-12 Νοεμβρίου 2010, Θεσσαλονίκη, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2010, 1 (Suppl.3):52.
8. Γιαννακούλας Ν, Παλασοπούλου Μ, **Μαμάρα Α**, Μπεφάνη Μ, Ζησάκη Κ, Μπουρονίκου Ε, Βασιλόπουλος Γ, Σπελέτας Μ, Γερμενής Α, Ματσουκά Π. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 10-12 Νοεμβρίου 2010, Θεσσαλονίκη, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, *Haema* 2010, 1 (Suppl.3):111.
9. Μπαρδάκα Φ, Δανιήλ Ζ, Αντωνίου Κ, **Μαμάρα Α**, Λιαδάκη Κ, Μάλλη Φ, Βάσσαλου Ε, Γουργουλιάνης ΙΚ, Σπελέτας Μ. Η έκφραση των πρωτεϊνών ΤΑCΙ και ΒΑFF-R σε ασθενείς με σαρκοείδωση. 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. 21-24 Οκτωβρίου 2010, Ρόδος, *ΠΝΕΥΜΩΝ* 2010, 23 (Suppl.1):13.
10. Speletas M, **Mamara A**, Bardaka F, Liadaki K, Argentou N, Tsitsami E, Gourgoulianis K, Germenis AE. BAFF-R deficiency due to *TNFRSF13C-P21R* homozygosity resulting in mild immunodeficiency phenotype. 14<sup>th</sup> Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 6-9 October 2010, Istanbul, Turkey, Book of Abstracts, p.:86.
11. Bardaka F, Daniil Z, **Mamara A**, Liadaki K, Malli F, Gourgoulianis KI, Speletas M. TACI and BAFFR expression in sarcoidosis. European Respiratory Society Conference, 18-22 September, Barcelona, Spain 2010, Book of Abstracts, p.:196.
12. Speletas M, **Mamara A**, Iordanakis Γ, Papadopoulou-Alataki E, Tsitsami E, Germenis AE. TACI expression and mutational status in Greek patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. 2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology. 13-16 September 2009, Berlin, *Immunology* 2009, 39 (Suppl.1):457.
13. Speletas M, **Mamara A**, Kalala F, Liadaki K, Papadoulis N, Kioumi A, Giannakoulas N, Lafioniatis S, Loukidis K, Matsouka P, Kartasis Z, Germenis AE. *TNFRSF13B* gene expression and molecular analysis in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. 14<sup>th</sup> European Hematology Association Congress. 4-7 June 2009, Berlin, *Haematologica* 2009, 94 (Suppl.2):593.

## **ΑΛΛΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ**

- **Αγγλικά** (ικανοποιητικό επίπεδο)
  
- **Γαλλικά** (ικανοποιητικό επίπεδο)
  
- **Γνώσεις Η/Υ**

## Πρόλογος

Τα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα (χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, Non-Hodgkin λεμφώματα υψηλού και χαμηλού βαθμού κακοήθειας, κλπ) αποτελούν τη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια στο Δυτικό κόσμο, με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Αν και η πρόγνωση των ασθενών έχει βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, με την προσθήκη στοχευμένων θεραπειών (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα), ωστόσο αρκετά ερωτήματα που αφορούν την παθογένεση και το φαινότυπό τους, με συνέπειες στη θεραπευτική προσέγγιση και αντιμετώπιση των ασθενών, παραμένουν αναπάντητα. Πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι ο φαινότυπος και η πρόγνωση των λεμφοπαραγωγών συνδρόμων σχετίζεται με το γονότυπο διαφόρων ανοσογονιδίων (π.χ. IL-10) και ιδιαίτερα της υπεροικογένειας του TNF (π.χ. CD40). Τα γονίδια της τελευταίας οικογένειας, *TNFRSF13B/TACI* και *TNFRSF13C/BAFFR* αλλά και γονίδια της CD28 οικογένειας όπως το *ICOS*, τα οποία φαίνεται να έχουν κομβική συμμετοχή στις θυμοανεξάρτητες και θυμοεξαρτώμενες ανοσιακές απαντήσεις αντίστοιχα, έχουν πρόσφατα συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, στο βαθμό που κλινικές δοκιμές με αντι-TACI μονοκλωνικά αντισώματα βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη. Γενετικές βλάβες στα γονίδια αυτά είχαν συσχετιστεί στο παρελθόν με τις αντισωματικές ανεπάρκειες, ενώ παράλληλα οι ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης λεμφώματος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Παρά ταύτα, ο ακριβής βιολογικός ρόλος των μορίων και η σχέση τους με τα παραπάνω νοσήματα δεν έχουν ακόμη διελευκανθεί επαρκώς.

Με την παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η έκφραση των μορίων TACI και BAFFR σε επίπεδο μεταγραφικό και πρωτεϊνικό στους ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα, με κύρια την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) και έγινε συσχέτισή τους με τα κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου αλλά και την πρόγνωσή της. Παράλληλα ανιχνεύθηκαν οι προσδέτες των συγκεκριμένων υποδοχέων, BAFF και APRIL, στον ορό των ασθενών με ΧΛΛ και των φυσιολογικών μαρτύρων αλλά και τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών τους. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε το γονίδιο *TNFRSF13B* σε Έλληνες ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες και ελέγχθηκε εάν μεταλλάξεις σε αυτό, σχετίζονται με την εμφάνιση και τον φαινότυπο της νόσου. Τέλος, ερευνήθηκε η συχνότητα εμφάνισης των κοινών πολυμορφισμών (P251L και V220A) του γονιδίου *TNFRSF13B*, των πολυμορφισμών (P21R και H159Y) του γονιδίου *TNFRSF13C* και η ύπαρξη ελλείψεων στο γονίδιο *ICOS* τόσο σε ασθενείς με ΧΛΛ όσο και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.



Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και χρηματοδοτήθηκε από το Ερευνητικό Έργο «Ηράκλειτος ΙΙ». Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, της Δ΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, του Αιματολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης, του Αιματολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου Χαλκίδας και του Αιματολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης. Αρχικά, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον Αναπληρωτή καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ματθαίο Σπελέτα, επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, τη συνεχή υποστήριξη, γενικότερη συμπαράσταση, καθοδήγηση, επίβλεψη, επιμονή, υπομονή του και την άψογη συνεργασία μας. Όλα όσα μου δίδαξε με όρεξη και ενδιαφέρον και οι πολύτιμες συμβουλές του με ενέπνευσαν, όχι μόνο όσον αφορά στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, αλλά και στη ζωή μου γενικότερα.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αναστάσιο Γερμενή, που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, για την ευκαιρία που μου έδωσε και για τη βοήθεια που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου και στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ζωή Δανιήλ, για την άψογη συνεργασία που είχαμε αυτά τα χρόνια. Επίσης, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς επιτροπής παρακολούθησης, τον Καθηγητή Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, τον Καθηγητή Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Πασχάλη Αδάμ Μολυβδά, τον Καθηγητή Ρευματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Λάζαρο Σακκά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Βασιλόπουλο.

Η έρευνα αυτή, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των πειραμάτων, δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη σημαντική υποστήριξη πολλών ανθρώπων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Γεώργιο Βασιλόπουλο, τον Επίκουρο Καθηγητή Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Νικόλαο Γιαννακούλα, την Ιατρό Αιματολόγο, Επιμελήτρια Β΄ ΕΣΥ, κ. Μαρία Παλασοπούλου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας ΑΠΘ, κ. Ευδοκία Μανδαλά, την Ιατρό Αιματολόγο, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Αιματολογικού Τμήματος

Νοσοκομείου Παπαγεωργίου, κ. Άννα Κιουμή, τον Ιατρό Αιματολόγο, Επιμελητή Α' Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας Γενικού Νοσοκομείου Χαλκίδας, κ. Ζαφείρη Καρτάση και τον Ιατρό Αιματολόγο, Επιμελητή Α' Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας Γενικού Νοσοκομείου Βόλου, κ. Στυλιανό Λαφιωνιάτη, για τη βοήθειά τους κατά τη συλλογή των δειγμάτων.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τη Φανή Καλαλά, που μοιράστηκε τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής και για όλα όσα μου προσέφερε, τη συνοδοιπόρο μου όλα αυτά τα χρόνια Νίκη Αργέντου, τη Φωτεινή Μπαρδάκα, τον Γιώργο Χατσιόδη, τον Κώστα Μπούκα, τη Φαίη Σούκου, τη Λίτσα Καραμούτη, την Κυριακή Λιαδάκη, τη Μαρία Ζαμανάκου, τη Μαριάννα Μπεφάνη, την Καλλιόπη Ζησάκη και τον Νίκο Τσιούγκο, για την όμορφη και μεστή από κέφι και ενθουσιασμό συνεργασία μας, αλλά και για την ανεκτίμητης αξίας φιλία που αναπτύχθηκε ανάμεσά μας.

Ευχαριστώ την Κατερίνα Καμηνιώτη, την Εύα Κουβάτα, την Αγγελική Μπάρδα, την Εύα Γραμμουσιάνου, τον Γεδεών Λουλέ, τον Στέφανο Τσόχα, τον Γιώργο Ιορδανάκη, τον Κώστα Τσολή, την Ελένη Κλέτσου, τη Γεθσημανή Καραϊσκού και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τον αδερφό μου Δημήτρη και την Κωνσταντίνα, τα ξαδέρφια μου, Ελένη, Θάλεια, Γλυκερία, Δήμητρα, Γιώργο και Κωνσταντίνο αλλά και τους αγαπημένους μου φίλους Καλλιόπη, Μάρω, Ντίνα, Βάλια, Λία, Μαρία, Ντίνα και τον Νίκο, που με στήριξαν και που ομορφαίνουν τη ζωή μου.

## Συντομογραφίες

<b>AP-1</b> (Activator protein-1)	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1
<b>APRIL</b> (A proliferation inducing ligand)	Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
<b>b2m</b> (b2-microglobulin)	β2-μικροσφαιρίνη
<b>BAFF</b> (B-cell activating factor)	Παράγοντας ενεργοποίησης των Β-κυττάρων
<b>BAFFR</b> (B-cell activating factor receptor)	Υποδοχέας του BAFF
<b>BCMA</b> (B Cell Maturation Antigen)	Αντιγόνο ωρίμανσης των Β-κυττάρων
<b>BcR</b> (B-cell receptor)	Υποδοχέας των Β-κυττάρων
<b>BlyS</b> (B-lymphocyte stimulator)	Διεγέρτης των Β-κυττάρων
<b>Bp</b> (Base pairs)	Ζεύγη βάσεων
<b>CAML</b> (Calcium modulating ligand)	Συνδέτης που συμμετέχει στην ρύθμιση του ασβεστίου
<b>CRDs</b> (Cysteine rich domains)	Πεδία πλούσια σε κυστεΐνες
<b>CSR</b> (Class switch recombination)	Ισοτυπική μεταστροφή
<b>CVID</b> (Common variable immunodeficiency)	Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
<b>DNA</b> (Deoxyribonucleic acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>ELP</b> (early lymphoid progenitors)	Προγονικά κύτταρα λεμφικής σειράς
<b>IgA</b> (Immunoglobulin A)	Ανοσοσφαιρίνη Α
<b>IgAD</b> (IgA Deficiency)	Ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgA
<b>IgG</b> (Immunoglobulin G)	Ανοσοσφαιρίνη Γ
<b>IgHV</b> (immunoglobulin heavy chain variable region)	Μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσού
<b>IgM</b> (Immunoglobulin M)	Ανοσοσφαιρίνη Μ
<b>IQR</b> (interquartile range)	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος
<b>FA-PBS</b> (Formaldehyde-PBS)	Διάλυμα φορμαλδεΰδης-PBS
<b>FITC</b> (Fluorescein)	Φλουοροσκεΐνη
<b>FLT3</b> (fms-related tyrosine kinase)	Κινάση της τυροσίνης σχετιζόμενη με το μόριο fms
<b>Fo</b> (follicle)	Λεμφοζίδιο
<b>HS</b> (human serum)	Ορός ανθρώπου
<b>HSC</b> (hematopoietic stem cell)	Αιμοποιητικό στελεχιαίο κύτταρο
<b>ICOS</b> (Inducible T-cell co-stimulator)	Επαγόμενος συνδιεγέρτης των Τ-κυττάρων
<b>JNK</b> (c-Jun amino-terminal kinase)	Jun-κινάση
<b>LMMP</b> (lymphoid-primed multipotent progenitor)	Πολυδύναμα προγονικά κύτταρα λεμφικής σειράς
<b>LT-HSC</b> (long-term haematopoietic stem cells)	Στελεχιαία κύτταρα μικρής διάρκειας

<b>MPP</b> (multipotent hematopoietic progenitors)	Πολυδύναμα προγονικά κύτταρα
<b>MZ</b> (marginal zone)	Οριακή ζώνη
<b>NF-AT</b> (Nuclear factor of activated T-cells)	Πυρηνικός παράγοντας ενεργοποιημένων T-κυττάρων
<b>NHL</b> (Non Hodgkin lymphoma)	Λέμφωμα Non-Χότζκιν
<b>NF-κB</b> (Nuclear factor-kappa B)	Πυρηνικός παράγοντας-κB
<b>NIK</b> (NF-kappa-B-inducing kinase)	Κινάση που επάγει τον NF-κB
<b>PALS</b> (periarteriolar lymphocyte sheath)	Περιοτριδιακή λεμφική θήκη
<b>PBMCs</b> (Peripheral blood mononuclear cells)	Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
<b>PBS</b> (Phosphate Buffered Saline)	Ουδέτερο διάλυμα φωσφορικού άλατος
<b>PC</b> (Plasma cell)	Πλασματοκύτταρο
<b>PC5</b> (Phycoerythrin-Cyanine-5)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5
<b>PCD</b> (programmed cell death)	Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
<b>PCR</b> (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PE</b> (Phycoerythrin)	Φυκοερυθρίνη
<b>PS</b> (phosphatidylserine)	Φωσφατιδυλσερίνη
<b>Rcf</b> (relative centrifugal force)	Σχετική φυγόκεντρος δύναμη
<b>RFLP</b> (Restriction fragment length polymorphism)	Πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους
<b>Rpm</b> (Rounds per minute)	Στροφές ανά λεπτό
<b>RT</b> (Room Temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
<b>Sca1</b> (plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase)	ΑΤΡάση ρύθμισης ασβεστίου
<b>SD</b> (standard deviation)	Τυπική απόκλιση
<b>sIgG4D</b> (selective IgG4 deficiency)	Επιλεκτική IgG4 ανεπάρκεια
<b>ST-HSC</b> (short-term haematopoietic stem cells)	Στελεχιαία κύτταρα μεγάλης διάρκειας
<b>TAC1</b> (transmembrane activator & CAML interactor)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το CAML
<b>TdT</b> (terminal deoxynucleotidyl transferase)	Τελική δεσοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση
<b>THI</b> (Transient hypogammaglobulinemia of infancy)	Παροδική υπογαμμασφαιριναιμία νεογνικής ηλικίας
<b>TNF</b> (Tumor necrosis factor)	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων
<b>TLRs</b> (Toll-like receptors)	Ανάλογοι των Toll υποδοχείς
<b>VCAM1</b> (vascular cell adhesion molecule 1)	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1
<b>ΧΑΠ</b>	Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
<b>ΧΛΛ</b>	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
<b>ΧΠΠ</b>	Χρόνια περιοριστική πνευμονοπάθεια

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

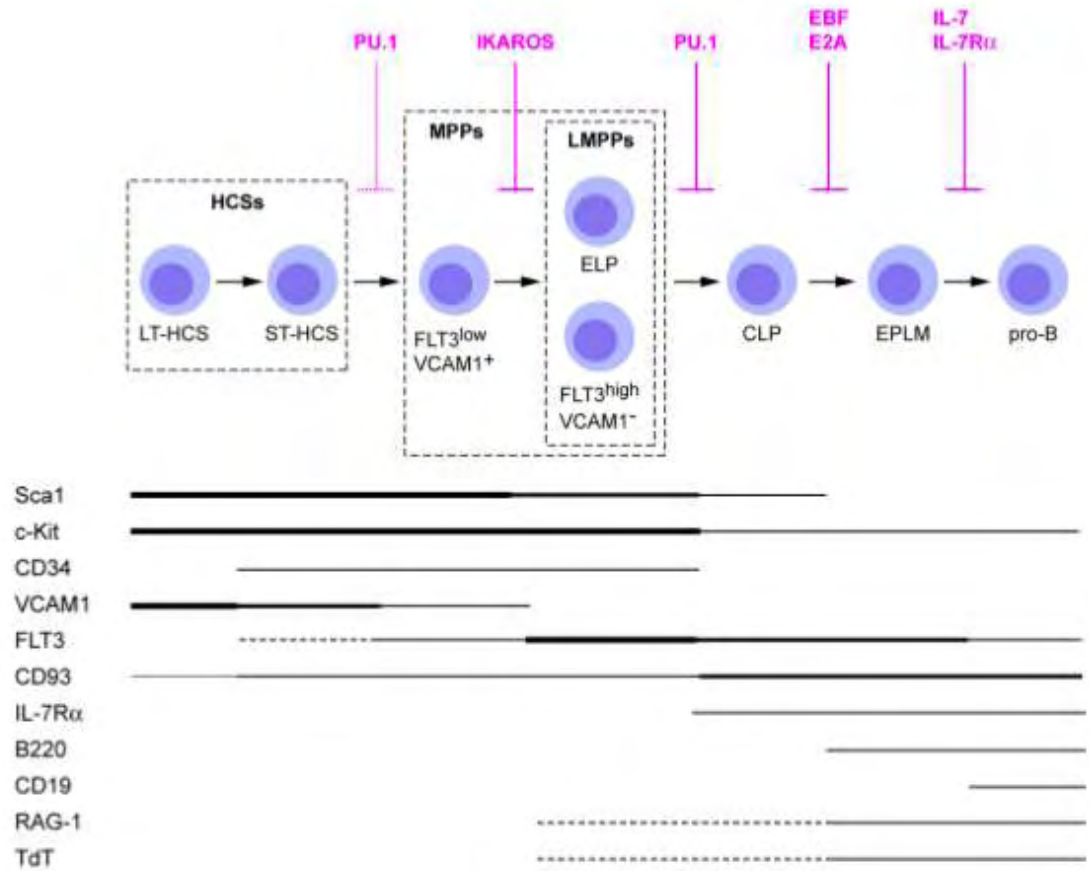
---

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ανάπτυξη, ωρίμανση και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων

Η χυμική ανοσία μεσολαβείται από τα Β-κύτταρα, τα οποία μέσω των αντισωμάτων που παράγουν, προστατεύουν τον οργανισμό από μεγάλη ποικιλία παθογόνων. Η καταστροφή των διάφορων αντιγόνων επιτυγχάνεται με την κινητοποίηση διαφορετικών κατά περίπτωση δραστικών μηχανισμών, οι οποίοι εξαρτώνται από την τάξη των παραγόμενων αντισωμάτων αλλά και από την ανατομική θέση στην οποία λαμβάνει χώρα η ανοσιακή απάντηση. Η ανεπαρκής ανάπτυξη, διαφοροποίηση ή λειτουργία των Β-κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια, κακοήθεια, αυτοανοσία και αλλεργία.<sup>1</sup>

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, αποτελούμενη από μεγάλο αριθμό διακριτών σταδίων, καθένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων επιφανειακών και ενδοκυττάρων μορίων. Πιο συγκεκριμένα, τα Β-κύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στα Β1-κύτταρα, που αποτελούν ένα μικρό υποπληθυσμό και τα Β2-κύτταρα, που αποτελούν τον κύριο υποπληθυσμό τους. Αρχικά, τα στελεχιαία κύτταρα μεγάλης διάρκειας του μυελού (LT-HSC), τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μορίων Sca1, c-Kit, VCAM1,<sup>2</sup> διαφοροποιούνται σε στελεχιαία κύτταρα μικρής διάρκειας (ST-HSC), ενώ η έκφραση στη συνέχεια των μορίων CD34 και FLT3 συμβάλλει στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους σε πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (MPP).<sup>3</sup> Για τη μετάβαση από το επίπεδο των στελεχιαίων κυττάρων μικρής διάρκειας στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα σημαίνοντα ρόλο διαδραματίζει η υπερέκφραση του μορίου FLT3 και η υποέκφραση του μορίου VCAM, ενώ παράλληλα συμβαίνει βαθμιαία μείωση της ικανότητας αυτοανανέωσης και της δυναμικής διαφοροποίησης των κυττάρων.<sup>4,5</sup> Ένας υποπληθυσμός των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων προσανατολίζεται προς τη λεμφική σειρά εκφράζοντας Sca1, c-Kit, Flt3 και CD34 (LMMP) και η δέσμευση στη σειρά συμβαίνει όταν εκφράζονται και τα μόρια RAG-1 ή/και το TdT (ELP).<sup>6,7</sup> Τα στάδια της ωρίμανσης, που οδηγούν στη Β-λεμφική σειρά, χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα από την έκφραση των μορίων Flt3, CD93 και IL-7 Ra και έπειτα από την έκφραση και του B220 μορίου. Ακολούθως, η έκφραση του CD19 μορίου προσδιορίζει το προ-προ-Β-κύτταρο. Το CD19 μόριο λειτουργεί ως συνυποδοχέας του BCR και η έκφρασή του ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα Pax5, ο οποίος θεωρείται υπεύθυνος για τη δέσμευση των κυττάρων στη Β-σειρά<sup>8</sup> (Εικόνα 1).

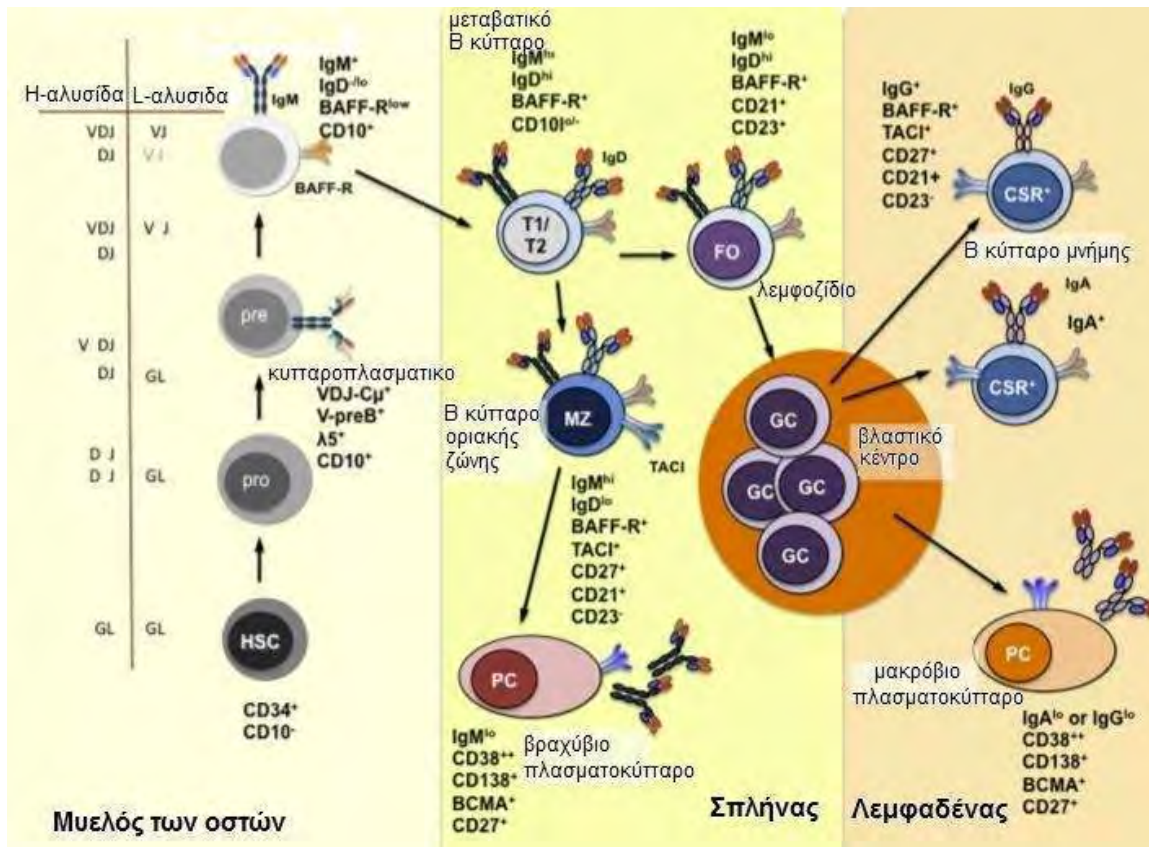


### Εικόνα 1: Δέσμευση στη Β-κυτταρική σειρά

Τα αιμοποιητικά κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω διακριτών σταδίων σε πρόδρομα κύτταρα δεσμευμένα στη Β-κυτταρική σειρά και στη συνέχεια σε προ-προ-Β-κύτταρα. Η έκφραση των διαφόρων ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μορίων δηλώνεται με οριζόντιες γραμμές, όπου η ένταση των γραμμών είναι ανάλογη του βαθμού έκφρασης των μορίων. Παράγοντες, που μπορεί να προκαλέσουν ολοκληρωτικό ή μερικό μπλοκάρισμα της διαφοροποίησης παρουσιάζονται με ροζ χρώμα (από Welner και συν.).<sup>9</sup>

Οι DNA αναδιατάξεις που οδηγούν στο σχηματισμό των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, εμφανίζονται στα πολύ αρχικά στάδια ωρίμανσης του Β-κυττάρου και ακολουθούν αυστηρή σειρά. Στο στάδιο του προ-προ-Β-κυττάρου έχει ήδη ολοκληρωθεί η σύνδεση των  $D_H$  και  $J_H$  γονιδιακών τμημάτων, η οποία συνήθως συμβαίνει και στα δύο χρωμοσώματα. Οι αναδιατάξεις αυτές καταλύονται από τα ένζυμα RAG-1 και RAG-2, ενώ το ένζυμο Tdt προσθέτει νουκλεοτίδια στις περιοχές συνδέσεων των γονιδιακών τμημάτων. Οι DNA αναδιατάξεις που οδηγούν στη σύνδεση των  $V_H/D_H/J_H$  γονιδιακών τμημάτων συνεχίζονται στο ένα μόνο χρωμόσωμα και ολοκληρώνονται με τη δημιουργία ενός λειτουργικού γονιδίου που παράγει μ βαριές αλυσίδες, ενώ παράλληλα εκφράζονται τα μόρια VpreB και λ5 που όταν ενώνονται, συνιστούν τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες. Η σύνδεση των βαριών μ αλυσίδων με τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες συνιστούν τον πρόδρομο υποδοχέα του Β-κυττάρου (προ-BCR) και το προ-Β-κύτταρο εκφράζει το μόριο CD25 και εισέρχεται στον κυτταρικό κύκλο. Ο προ-BCR μπλοκάρει τη λειτουργία των RAG με αποτέλεσμα να αποτρέπονται οι αναδιατάξεις του 2<sup>ου</sup> αλληλίου (αλληλικός αποκλεισμός) και να επάγεται ο πολλαπλασιασμός.<sup>10</sup> Στη συνέχεια, τα RAG γονίδια ξαναεκφράζονται, ώστε να ξεκινήσουν οι αναδιατάξεις του γονιδίου της ελαφράς αλυσίδας. Μετά από επιτυχή αναδιάταξη, κ ή λ ελαφρές αλυσίδες αντικαθιστούν τις προσωρινές ελαφρές αλυσίδες του προ-BCR, ζευγαρώνουν με τις βαριές και σχηματίζουν την ανοσοσφαιρίνη IgM. Τα επίπεδα έκφρασης της ανοσοσφαιρίνης IgM ποικίλλουν, με την χαμηλή έκφραση να σχετίζεται με μη λειτουργική σηματοδότηση επαγωγίμη από το BCR ή από την ύπαρξη αυτοδραστικού BCR. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της ανοσοσφαιρίνης IgM μεταβάλλουν το επίπεδο έκφρασης πολλών γονιδίων στα ανώριμα Β-κύτταρα, προωθώντας τη μετανάστευση των κυττάρων στην κυκλοφορία. Τα ανώριμα Β-κύτταρα εισέρχονται στο σπλήνα, όπου λαμβάνουν σήματα επιβίωσης μέσω του **BAFFR** και ολοκληρώνουν το πρώτο στάδιο της ανάπτυξής τους ως Β-κύτταρα της οριακής ζώνης ή λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα ανάλογα με την ειδικότητα του BCR τους. Η επαφή με το αντιγόνο και η αλληλεπίδραση με τα ουδετερόφιλα οδηγεί τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα, ενώ τα λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα μετά την επαφή τους με το αντιγόνο και τα βοηθητικά Τ-κύτταρα δημιουργούν την αντίδραση του βλαστικού κέντρου και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα ή σε Β-κύτταρα μνήμης. Η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων επάγει το AID καθώς και άλλα συστατικά του μηχανισμού ισotuπικής μεταστροφής, όπως το **TACI**, ειδικά στα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης, μεταβάλλοντας έτσι τη συγγένεια του BCR και τον ισότυπό του (το IgM σε IgG, IgA ή IgE)<sup>1</sup> (Εικόνα 2).





**Εικόνα 2: Β-κυτταρική διαφοροποίηση**

Τα ανώριμα Β-κύτταρα, μετά την σύνθεση λειτουργικής IgM, εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και εισέρχονται στο σπλήνα, όπου λαμβάνουν σήματα επιβίωσης μέσω του BAFFR. Μετά την επαφή τους με το αντιγόνο, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και Β-κύτταρα μνήμης, ενώ παράλληλα πραγματοποιούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλυσού, αλλά και ισotuπική μεταστροφή με τη βοήθεια και της πρωτεΐνης TAC1, για να αυξηθεί η συγγένεια σύνδεσης (από Píerer και συν.με τροποποιήσεις).<sup>1</sup>

### 1.2 Τα μόρια BAFF και APRIL είναι προσδέτες των υποδοχών BAFFR και TAC1

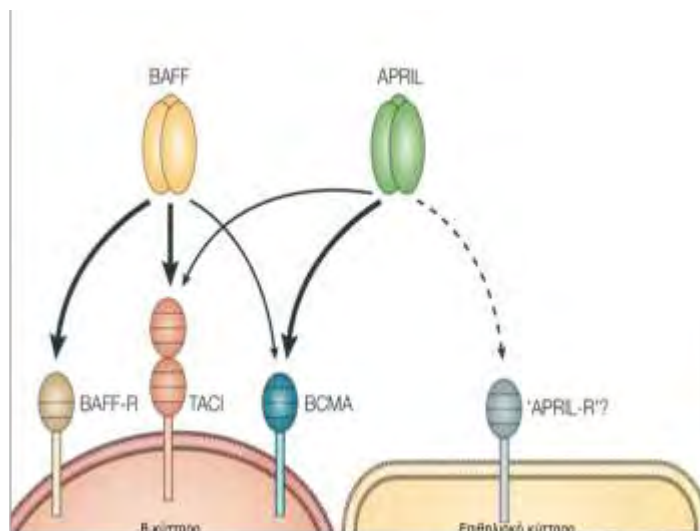
Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL, οι οποίες είναι μεμβρανικές και εκκριτικές πρωτεΐνες τύπου II, αποτελούν προσδέτες των υποδοχών BAFFR και TAC1, αλλά και του υποδοχέα BCMA.<sup>11</sup> Πιο συγκεκριμένα, ο προσδέτης BAFF (γνωστός και ως BLyS, THANK, TALL-1 και zTNF4) προσδέεται και στους τρεις προαναφερόμενους υποδοχείς, ενώ ο προσδέτης APRIL (γνωστός και ως TNSF13A, Tall-2, και TRDL-1), προσδέεται στους υποδοχείς TAC1, BCMA, αλλά και σε πρωτεογλυκάνες.<sup>12</sup> Η κυτταροκίνη BAFF εκφράζεται κυρίως από ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Η

κυτταροκίνη APRIL εκφράζεται επίσης από μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, των ενεργοποιημένων T-κυττάρων, αλλά και των νεοπλασματικών κυττάρων.<sup>11</sup>

Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγγένεια σύνδεσης των BAFF και APRIL στον υποδοχέα TACI είναι παρόμοια,<sup>13</sup> ενώ επιπρόσθετα, ετεροτριμερή των BAFF και APRIL μπορούν να ενεργοποιήσουν τον σηματοδοτικό καταρράκτη του υποδοχέα. Τα BAFF/APRIL ετεροτριμερή μπορούν να προσδένονται στον TACI, αλλά όχι στους άλλους δύο TNFR υποδοχείς BCMA ή BAFFR, στους οποίους οι συνδέτες APRIL και BAFF μπορούν να συνδεθούν αντίστοιχα.<sup>14</sup>

Τέλος, η πρωτεογλυκάνη syndecan-2 μπορεί να δρα ως συνδέτης του TACI, βασιζόμενη αποκλειστικά στις πλευρικές αλυσίδες της. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιείται και από άλλες πρωτεογλυκάνες *in vivo* (π.χ. syndecan-4).<sup>15</sup> Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδέτης APRIL μπορεί να συνδέεται ανεξάρτητα σε πρωτεογλυκάνες όπως η syndecan-1 (CD138), δημιουργώντας ένα βιολογικά ενεργό σύμπλοκο, στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων.<sup>16</sup> Αν και δεν είναι πλήρως γνωστή η χρησιμότητα της σύνδεσης αυτής, πιστεύεται ότι είναι πολύ σημαντική για τον πολυμερισμό του APRIL κατά την σύνδεσή του στον TACI υποδοχέα και ίσως εξηγεί τα εναλλακτικά αποτελέσματα κατά τη σηματοδότηση του στα Β-κύτταρα.

Τα Β-κύτταρα που δεν έχουν δεχθεί αντιγονική διέγερση εκφράζουν κυρίως την πρωτεΐνη BAFFR, ενώ η πρωτεΐνη TACI είναι μόλις ανιχνεύσιμη. Υψηλή έκφραση του υποδοχέα BAFFR έχει βρεθεί στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, ενώ χαμηλή έκφρασή του ανιχνεύθηκε στο μυελό των οστών και στο εμβρυϊκό ήπαρ.<sup>17</sup> Μετά την επαφή τους με το αντιγόνο όμως, τα Β-κύτταρα οδηγούνται σε υπερέκφραση της TACI πρωτεΐνης και μεταγενέστερα σε έκφραση της πρωτεΐνης BCMA, δείκτη των πλασματοκυττάρων.<sup>18</sup> Η πρωτεΐνη TACI δηλαδή ανιχνεύεται αρχικά στα μεταβατικά T1 σταδίου (transitional) Β-κύτταρα, αυξάνεται δεκαπλάσια στα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης και σε μνημονικά Β-κύτταρα (ενεργοποιημένα CD27<sup>+</sup>) κύτταρα, ενώ καταστέλλεται στο στάδιο των πλασματοκυττάρων.<sup>19,20,21</sup> Η ενεργοποίηση του BCR υποδοχέα, παρουσία των κυτταροκινών IL-2 και IL-10, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης TACI στην επιφάνεια των Β-κυττάρων.<sup>22</sup> Τέλος, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ο υποδοχέας TACI ανιχνεύεται και στα μονοκύτταρα, στα οποία ο προσδέτης BAFF προάγει σήματα επιβίωσης και ενεργοποίησης, προκαλώντας τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα.<sup>23</sup>



**Εικόνα 3: Προσδέτες και υποδοχείς της TNF υπερικογένειας**

Ο BAFF δεσμεύεται στους τρεις υποδοχείς (BAFFR, TACI και BCMA), ενώ ο APRIL δεσμεύεται μόνο στους δύο (TACI και BCMA) (από Foster και συν.).<sup>24</sup>

### 1.3 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης BAFFR στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων

Η πρωτεΐνη BAFFR, διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III 184 αμινοξέων, κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF13C* το οποίο στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 22q13.1-13.31. Περιλαμβάνει μόνο τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης στην εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης με τον συνδέτη, με αποτέλεσμα να κατέχει τη μικρότερη CRD επικράτεια στην οικογένεια των υποδοχέων TNF. Δομικά, ο υποδοχέας BAFFR περιέχει μία εξωκυττάρια περιοχή CRD που αλληλεπιδρά με τον συνδέτη και μια ενδοκυττάρια περιοχή αναγνώρισης για το μόριο TRAF3. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις με το TRAF3, μεσολαβούμενες από το BAFFR, ξεκινούν και διατηρούν τη μετέπειτα σηματοδότηση.<sup>25</sup> Οι σηματοδοτικοί αυτοί στόχοι περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση της NIK κινάσης, την ενεργοποίηση του μη κλασικού μονοπατιού του NF-κΒ και μετέπειτα τη θετική ρύθμιση των πολλαπλών μελών της οικογένειας Bcl-2 δεδομένου ότι η υπερέκφραση της διαγονιδιακής Bcl-2 στα BAFFR<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια επέτρεπε την ανάπτυξη των ώριμων Β-κυττάρων.<sup>26</sup> Παρόλο που δεν υπάρχει άμεση σύνδεση του BAFFR υποδοχέα με την TRAF2, έχει διαπιστωθεί ότι απαλοιφή της τελευταίας προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης TRAF3. Οι παρατηρήσεις αυτές θέτουν τη βάση για ένα μοντέλο που εξηγεί λογικά τα αρχικά βήματα της σηματοδότησης του υποδοχέα. Ειδικότερα, απουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται με τη NIK κινάση και στη συνέχεια

αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα, με τη βοήθεια της TRAF2. Επομένως, με αυτόν τον τρόπο, η TRAF3 δε συμμετέχει στην ενεργοποίηση του εναλλακτικού NF-κΒ μονοπατιού. Αντίθετα, παρουσία του BAFF, η TRAF3 συνδέεται στον BAFFR, η NIK κινάση σταθεροποιείται, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ2, που με τη σειρά της θα οδηγήσει στην επιβίωση των Β-κυττάρων (Εικόνα 4).<sup>27</sup>

Η πρωτεΐνη BAFFR είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση των Β-κυττάρων και την ωρίμανσή τους στο σπλήνα, καθώς η κύρια λειτουργία της είναι να παρέχει σήματα επιβίωσης στα ανώριμα και στα ώριμα Β-κύτταρα, ρυθμίζοντας έτσι τον αριθμό των λεμφοζιδιακών Β-κυττάρων.<sup>28,29,30</sup> Ο ρόλος του υποδοχέα BAFFR στην επιβίωση των Β-κυττάρων αποδείχθηκε πρώτα στα ποντίκια.<sup>26,31</sup> Μελέτες έδειξαν πως σε BAFFR<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια έχει διαταραχθεί η ωρίμανση των Β-κυττάρων, κάτι που παρατηρείται και σε BAFF<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια.<sup>32</sup> Πιο συγκεκριμένα, τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν σημαντική μείωση στον αριθμό των Β-κυττάρων, ανικανότητα μετάβασης στο στάδιο T2, μειωμένα επίπεδα Ig και μειωμένες θυμοεξαρτώμενες και θυμοανεξάρτητες ανοσοαποκρίσεις.<sup>11,32</sup> Αυτό υποδηλώνει ότι η σύνδεση BAFF/BAFFR είναι η βασική κινητήρια δύναμη για την επιβίωση των Β-κυττάρων και την ωρίμανσή τους.<sup>32</sup>

Η έκφραση ενός λειτουργικού υποδοχέα Β κυττάρων (BCR) αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιβίωση τους στην περιφέρεια και για πολλά χρόνια τα BCR σήματα πιστεύονταν ότι είναι επαρκή για την επίτευξη της επιβίωσης.<sup>33,34</sup> Ωστόσο, η ανακάλυψη του BAFF/ BAFFR μονοπατιού άλλαξε ριζικά την άποψη αυτή. Η θεραπεία των ποντικών ή των ασθενών με παράγοντες εξουδετέρωσης για το BAFF οδηγεί στην απώλεια των ώριμων Β-κυττάρων.<sup>35,36</sup> Ως εκ τούτου, η διατήρηση της ομοιοστασίας των περιφερικών Β-κυττάρων εξαρτάται από δύο βασικά στοιχεία, το BAFF και έναν λειτουργικό BCR. Η αποσαφήνιση του μυστηρίου της επιβίωσης Β κυττάρων της περιφέρειας δεν είναι απλή, καθώς ο BCR πυροδοτεί ένα πλήθος μονοπατιών μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην επιβίωση, τη διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση ακόμη και στον θάνατο των Β-κυττάρων. Τα μονοπάτια αυτά συχνά ποικίλουν ανάλογα με την κατάσταση ωρίμανσης του Β-κυττάρου, λαμβάνοντας υπόψη τα υποσύνολα των πληθυσμών των περιφερειακών Β-κυττάρων ή την κατάσταση ενεργοποίησής τους.<sup>37,38</sup>

Τα Β-κύτταρα που αποτυγχάνουν να μεταδώσουν σήματα είτε διαμέσου του BCR, είτε του BAFFR πεθαίνουν, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο υποδοχείς είναι αναγκαίοι, αλλά κανένας δεν είναι επαρκής για την επιβίωση των Β-κυττάρων. Για παράδειγμα, η υπό όρους διαγραφή του BCR ή των άμεσων συστατικών του σηματοδοτικού του μονοπατιού οδηγεί στο θάνατο των περισσότερων Β-κυττάρων,<sup>39</sup> παρά τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης των BAFF και BAFFR. Ομοίως, ποντικοί με μεταλλάξεις στο γονίδιο που

κωδικοποιεί τον υποδοχέα BAFFR,<sup>40</sup> ποντικοί ανεπαρκείς στο BAFF ή ποντικοί που υπέστησαν αγωγή με BAFF ανταγωνιστές, έχουν μια αξιοσημείωτη μείωση στον αριθμό των Β-κυττάρων, παρά την έκφραση ενός φυσιολογικού BCR. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι υπάρχει μια πιο σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ της ισχύος του σήματος του BCR, του επιπέδου των διαθέσιμων BAFF μορίων και της έκτασης της ανταγωνισμού με βάση το μέγεθος του πληθυσμού των Β-κυττάρων. Αυτή η τριμερής σχέση αποκαλύφθηκε από μελέτες που έδειχναν ότι αυτοδραστικοί κλώνοι Β-κυττάρων που συνήθως πεθαίνουν κατά το μεταβατικό στάδιο, θα μπορούσαν να διασωθούν από τα υψηλά επίπεδα του BAFF.<sup>41</sup> Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα μιας τέτοιας διάσωσης από την περίσσεια του BAFF, με αυξημένη την ισχύ του σήματος του BCR, φαίνεται μειωμένη. Έτσι, το εύρος της ισχύος του σήματος BCR που είναι συμβατό με την Β-κυτταρική επιβίωση κατά το σημείο ελέγχου στο μεταβατικό στάδιο ποικίλλει ανάλογα με το επίπεδο των διαθέσιμων μορίων BAFF.<sup>42</sup>

Σύμφωνα με έρευνες, ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα Β-κύτταρα για τα περιορισμένα επίπεδα BAFF, έχει υποτεθεί να ευνοεί τα αυτοανεκτικά Β-κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους στην περιφέρεια.<sup>43</sup> Έτσι, η υπερέκφραση του BAFF φαίνεται να διευρύνει τόσο τα Β-κύτταρα του όψιμου μεταβατικού σταδίου, όσο και τα ώριμα Β-κύτταρα της περιφέρειας και να προάγει, εν μέρει, τη Β-κυτταρική αυτοανοσία μέσω της αυξημένης επιβίωσης των αυτοδραστικών Β-κυττάρων χαμηλής συγγένειας.<sup>44</sup>

Επιπρόσθετα, ο BAFFR υποδοχέας συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή, στη διατήρηση των βλαστικών κέντρων των λεμφοζιδίων και την επαγωγή της έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών στα Β-κύτταρα.<sup>45</sup> Μελέτες που έχουν δημοσιευθεί και συνοψίζουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**.

## Πίνακας 1: Μελέτες που καταδεικνύουν τον ρόλο του συστήματος BAFF/BAFFR.

---

### BAFF συνδέτης

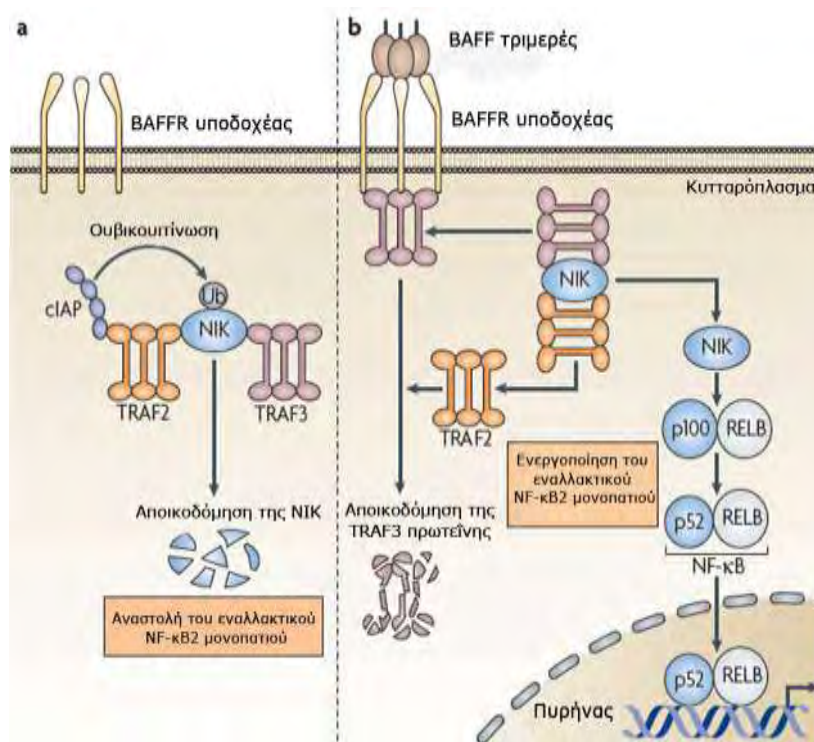
---

- In vitro διέγερση του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων Β-κυττάρων και της παραγωγής ανοσοσφαιρινών<sup>46</sup>
- Παράταση της επιβίωσης ανθρώπινων CD27<sup>+</sup> μνημονικών και CD38<sup>+</sup> Β-κυττάρων<sup>47</sup>
- Αυξημένος αριθμός ώριμων Β-κυττάρων και δραστικών Τ-κυττάρων, αυτοάνοσες εκδηλώσεις και εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στους νεφρούς σε BAFF<sup>+/+</sup> διαγονιδιακά ζώα<sup>48</sup>
- Υποπλασία Β-κυττάρων, μείωση των ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία και μείωση της χυμικής ανοσιακής απόκρισης σε BAFF<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα<sup>49</sup>

### BAFFR υποδοχέας

- Εκδήλωση τύπου-ΣΕΛ συνδρόμου, παρουσία αντι-dsDNA αντισωμάτων, υπεργαμμασφαιριναιμία, ελαττωματική διαφοροποίηση Β-κυττάρων και σπειραματονεφρίτιδα σε επίμυες με μετάλλαξη στο *TNFRSF13C* γονίδιο<sup>50,51,52</sup>
  - Απώλεια περιφερικών Β-κυττάρων και μείωση ανοσοσφαιρινών στην κυκλοφορία σε BAFFR<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα
  - Μείωση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και τον σπλήνα έπειτα από χορήγηση BAFFR αναστολέων<sup>45</sup>
  - Μείωση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια, τους λεμφαδένες και το σπλήνα, έπειτα από χορήγηση αντι-BAFFR αντισώματος σε πρωτεύοντα (*Macaca fascicularis*)<sup>53</sup>
- 

Πλην του ρόλου που διαδραματίζει η πρωτεΐνη BAFFR ως μεμβρανικός υποδοχέας, πρόσφατα ανακαλύφθηκε από τους Fu και συν., η παρουσία του στον πυρήνα των Β-κυττάρων και η δράση του ως μεταγραφικός παραγόντας. Στους υποκινητές αρκετών γονιδίων (όπως των BAFF, CD154, Bcl-xL, IL-8 και Bfl-A1), έχει βρεθεί θέση πρόσδεσης του BAFFR, γεγονός που υποδηλώνει τη σπουδαία δράση που διαδραματίζει η πρωτεΐνη στην επιβίωση τόσο φυσιολογικών, όσο και νεοπλασματικών Β-κυττάρων μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.<sup>54</sup>



**Εικόνα 4: Ο ρόλος των πρωτεϊνών TRAF στην σηματοδότηση του BAFFR**

A) Απουσία της BAFF/BAFFR πρόσδεσης η NIK κινάση συνδέεται με τις TRAF2 και TRAF3 πρωτεΐνες. Η TRAF2 «στρατολογεί» τον cIAP, ο οποίος έχει ως στόχο την NIK κινάση την οποία αποικοδομεί μέσω της ουβικουιτίνωσης, αναστέλλοντας έτσι τον NF-κB2. B) Έπειτα από την BAFF/BAFFR σύνδεση, η TRAF3 πρωτεΐνη συνδέεται με τον BAFFR, ενώ με την σειρά της, η TRAF2 προάγει την αποικοδόμηση της TRAF3. Η NIK κινάση είναι πλέον ελεύθερη να συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB2 εναλλακτικού μονοπατιού, το οποίο προάγει την επιβίωση των κυττάρων (από Mackay & Schneider, με τροποποιήσεις).<sup>27</sup>

#### 1.4 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης TAC1 στη διαφοροποίηση των B-κυττάρων

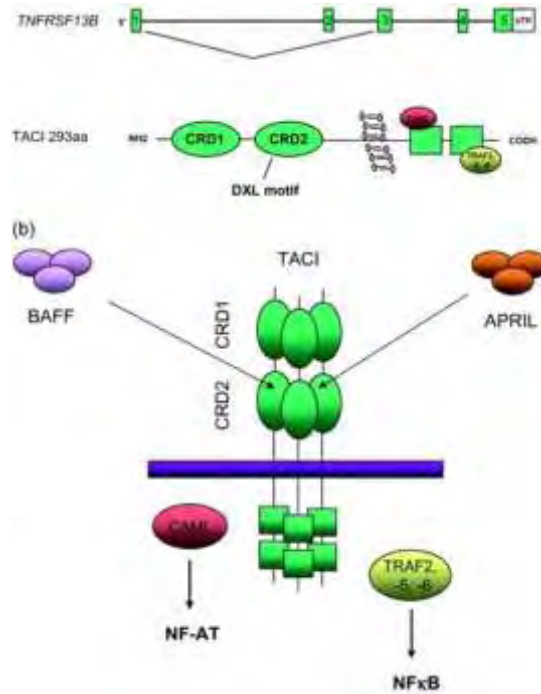
Η πρωτεΐνη TAC1 προστέθηκε στην υπεροικογένεια TNF, όταν διαπιστώθηκε ότι αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη CAML.<sup>55</sup> Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III, αποτελείται από 293 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF13B* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 του ανθρώπου (17p11.2), περιοχή που αποτελεί συχνό στόχο για μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς.<sup>56</sup> Το εξωκυττάριο τμήμα της αποτελείται από 166 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Το πρώτο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-1), το οποίο εκτείνεται από το 32<sup>ο</sup> έως το 67<sup>ο</sup> αμινοξύ, συμμετέχει στον πολυμερισμό (τριμερισμό) του υποδοχέα. Το δεύτερο τμήμα

επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD-2), εκτείνεται από το 68<sup>ο</sup> έως το 106<sup>ο</sup> αμινοξύ και είναι απαραίτητο για την πρόσδεση των κυτταροκινών BAFF και APRIL.<sup>57</sup> Με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτει μια μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνη TACI, η οποία παρόλο που περιέχει μόνο μία επανάληψη κυστεΐνης (CRD-2), οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ. Μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο η δεύτερη επανάληψη κυστεΐνης του υποδοχέα TACI αρκεί για την υψηλής συγγένειας σύνδεση με τους συνδέτες του.<sup>58</sup>

Το χαρακτηριστικό της ύπαρξης δύο μόνο επαναλήψεων κυστεΐνης γενικά, εκ των οποίων η δεύτερη ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τους προσδέτες, κάνει τον TACI υποδοχέα να διαφέρει από άλλα μέλη των TNFR, στην περίπτωση των οποίων απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις κυστεΐνης για την πρόσδεση με τους συνδέτες τους. Η πρωτεΐνη TACI πλην του NF-κΒ ενεργοποιεί και τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1, αλλά και την αμινοτελική κίνηση c-Jun.<sup>59</sup> Το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης TACI, όπως συμβαίνει με τις πρωτεΐνες BAFFR και BCMA, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TRAFs αλλά μόνο η TACI αλληλεπιδρά με την CAML. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη TACI αλληλεπιδρά με τα μόρια TRAF2, TRAF5 και TRAF6.<sup>60</sup>

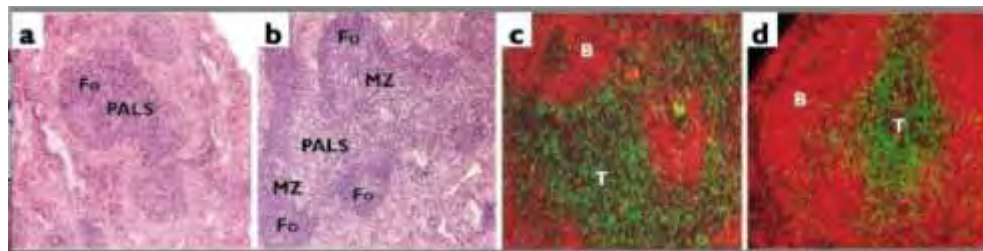
Μεγάλη σειρά μελετών υποστηρίζει τον κύριο ρόλο της πρωτεΐνης TACI στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα.<sup>61</sup> Από την άλλη, έχει αναφερθεί ότι τα TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια εμφανίζουν αύξηση στον αριθμό των κυκλοφορούντων Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα της εκδήλωση σπληνομεγαλίας, λεμφωμάτων και αυτοάνοσων εκδηλώσεων, προτείνοντας ότι η πρωτεΐνη μεταξύ άλλων αποστέλλει και σήματα απόπτωσης συμβάλλοντας στην ομοιοστάση του Β-κυτταρικού πληθυσμού.<sup>62</sup> Μια εναλλακτική εξήγηση για την εμφάνιση αυτοανοσίας και Β-λεμφοϋπερπλασιών είναι ότι η πρωτεΐνη TACI ανταγωνίζεται με την πρωτεΐνη BAFFR για τη σύνδεση του προσδέτη BAFF με αποτέλεσμα να περιορίζει την επίδραση του BAFFR στην επιβίωση των Β-κυττάρων. Απουσία TACI οδηγεί πιθανόν σε αυξημένη BAFFR σηματοδότηση με αποτέλεσμα την εμφάνιση Β λεμφοϋπερπλασίας και την ενεργοποίηση αυτοδραστικών Β-κυττάρων.<sup>63</sup>





**Εικόνα 5: Το γονίδιο TNFRSF13B και η πρωτεΐνη TACI**

Το γονίδιο TNFRSF13B που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, αποτελείται από πέντε εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 293 αμινοξέων. Ο υποδοχέας TACI περιέχει τις πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές 1 και 2 (CRD-1 και CRD-2) στο εξωκυττάριο τμήμα του. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του περιέχει θέσεις δέσμευσης για τις πρωτεΐνες TRAF (TRAF -2, -5 και -6) και την πρωτεΐνη CML. Ένα εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να συμβεί, δίνοντας αφορμή για μια σύντομη πρωτεΐνη TACI από την οποία λείπει το CRD1. (B) ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την δημιουργία τριμερών. Τα BAFF και APRIL είναι οι συνδέτες του TACI (από Bacchelli και συν.).<sup>64</sup>

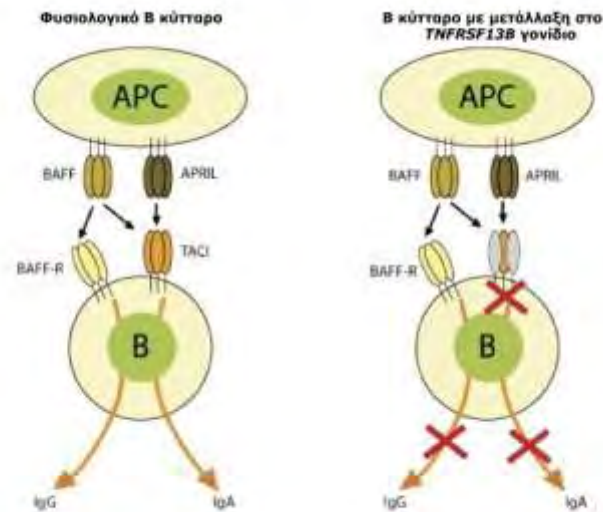


**Εικόνα 6: Δομικές διαφορές του σπλήνα ανάμεσα σε φυσιολογικά και σε TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια**

Τομή σπλήνα a. φυσιολογικού ποντικού. b. TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακού ποντικού, όπου παρατηρείται κυτταρική υπερδραστικότητα, αύξηση των λεμφοζιδίων και επέκταση του λευκού πολφού.

*Ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομή σπλήνα με τα μονοκλωνικά αντισώματα B220 (κόκκινο χρώμα) και CD4 (πράσινο χρώμα) από c. φυσιολογικό ποντικό και d. TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακό ποντικό, όπου παρατηρείται Β-λεμφοϋπερπλασία (από Yan και συν.).<sup>62</sup>*

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη TACI συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή μετά την αλληλεπίδραση της με τους προσδέτες BAFF και APRIL, ανεξάρτητα από τη δράση της πρωτεΐνης CD40.<sup>65</sup> Η μεταστροφή σε IgA φαίνεται μάλιστα να εξαρτάται αποκλειστικά από το TACI, καθώς ποντίκια ανεπαρκή σε TACI και APRIL έχουν μειωμένα επίπεδα IgA στον ορό.<sup>66</sup> Η συμβολή της πρωτεΐνης TACI στη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασμαβλάστες και στην παραγωγή των αντισωμάτων έχει δειχθεί σε κυτταρικές σειρές που είχαν ήδη ενεργοποιημένη την πρωτεΐνη CD40 και τον υποδοχέα TLR4. Έχει μάλιστα δειχθεί ότι η TLR ενεργοποίηση οδηγεί στην υπερέκφραση της TACI πρωτεΐνης στα Β-κύτταρα, αλλά και στην έκφραση των προσδετών BAFF και APRIL από τα δενδριτικά κύτταρα. Η συγκεκριμένη υπερέκφραση της πρωτεΐνης TACI και των προσδετών της από τους ενεργοποιημένους TLR υποδοχείς, συνδέει τη φυσική ανοσία με την μεσολαβούμενη από το TACI ενεργοποίηση των Β-κυττάρων και είναι πιθανό ότι παίζει ρόλο στην συνεργασία μεταξύ TACI και TLRs, με σκοπό την ενεργοποίηση των Β-κυττάρων.<sup>67,68</sup> Τα TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια, σε αντίθεση με τα BAFFR<sup>-/-</sup> και τα BCMA<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια, εκτός από ανεπάρκεια στην ανοσοσφαιρίνη IgA, δεν είναι ικανά και να αντιμετωπίσουν θυμοανεξάρτητα αντιγόνα τύπου II.<sup>45,69</sup> Επιπλέον, η πρωτεΐνη TACI συμμετέχει στην απάντηση έναντι πολυσακχαριτών των μικροβίων. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης του σπλήνα, όταν απαντούν σ'αυτού του είδους τα αντιγόνα, αυξάνουν την επιφανειακή έκφραση της πρωτεΐνης TACI, η οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικά με τους προσδέτές της που εκκρίνονται από τα δενδριτικά κύτταρα. Όπως αποδείχθηκε τα νεογνά αλλά και οι νεογέννητοι ποντικοί, λόγω της μειωμένης έκφρασης TACI που εμφανίζεται στα Β-κύτταρά τους, δεν έχουν την ικανότητα να απαντήσουν αποτελεσματικά έναντι των πολυσακχαριτών του πνευμονιόκοκκου.<sup>70</sup>



### **Εικόνα 7: Η πρωτεΐνη TACI και η συμβολή της στην ισοτυπική μεταστροφή**

Η πρωτεΐνη TACI συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή σε IgA, μετά την αλληλεπίδραση της με τους προσδέτες BAFF και APRIL, αλλά δεν είναι πλήρως κατανοητός ο λόγος που οι μεταλλάξεις στο TNFRSF13B επιδρούν και στην ισοτυπική μεταστροφή σε IgG, μιας και η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης BAFFR αρκεί για την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης IgG *in vitro* (από Berglund και συν.).<sup>71,72</sup>

### **1.5 Η δομή και ο ρόλος της πρωτεΐνης ICOS στις θυμοεξαρτώμενες ανοσιακές απαντήσεις**

Η πρωτεΐνη ICOS είναι ένα ομοδιμερές των 55-60 kDa, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ICOS*. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα με πεδία τύπου ανοσοσφαιρινών (IgV) και μία ενδοκυττάρια ουρά με κατάλοιπα τυροσίνης εντός SH2 μοτίβων.<sup>73,74</sup> Το γονίδιο *ICOS* έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 2q33, γειτνιάζει με τα γονίδια *CD28* και *CTLA4* και περιέχει 5 εξώνια και 4 ιντρόνια, μεγέθους ~20 kb.<sup>75,76</sup> Σε αντίθεση με το *CD28*, το οποίο εκφράζεται σε T-κύτταρα που βρίσκονται σε ανάπαυση, ο υποδοχέας ICOS εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Ειδικότερα, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, ο υποδοχέας ICOS εκφράζεται σε T ζώνες (παραφλοιώδεις περιοχές του λεμφαδένα) και ιδιαίτερα σε βλαστικά κέντρα, δηλαδή περιοχές πολλαπλασιασμού και τελικής διαφοροποίησης των B-κυττάρων. Προσδέτης του υποδοχέα ICOS αποτελεί η πρωτεΐνη ICOS-L που αναφέρεται επίσης ως B7h, B7RP-1, GL50, B7-H2 ή LICOS.<sup>77</sup> Ο συνδέτης ICOS-L εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά,

μονοκύτταρα/μακροφάγα), σε ινοβλάστες στους οποίους έχει χορηγηθεί TNF- $\alpha$ ,<sup>78</sup> καθώς και σε ενδοθηλιακά, επιθηλιακά,<sup>79</sup> B-κύτταρα και T-κύτταρα.<sup>80</sup>

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα ICOS αλληλοεπικαλύπτεται σε μεγάλο βαθμό με αυτό της πρωτεΐνης CD28. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας ICOS συνδέεται με την P13K στο SH2 πεδίο της με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των MAP κινασών (JNK, p38 και ERK).<sup>81</sup> Εντούτοις, ο υποδοχέας ICOS χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία που του προσδίδει την ικανότητα να συνδέεται επίσης με μια παραλλαγή της P13K. Η συγκεκριμένη παραλλαγή αποτελείται από την κανονική p85 καταλυτική και μια περισσότερο ενεργή, p50a υπομονάδα.<sup>82</sup> Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μορφής P13K είναι η αυξημένη δράση της ως «λιπιδικής κινάσης», με αποτέλεσμα να προκαλείται μεγαλύτερη παραγωγή των προϊόντων της και ταυτόχρονη αύξηση της Akt σηματοδότησης.<sup>81,82</sup> Η ισχυρή ενεργοποίηση της Akt σηματοδότησης υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη ICOS διαδραματίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των T-κυττάρων.<sup>83</sup>

Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες CD28 και ICOS συνδιεγείρουν την απελευθέρωση ενός μεγάλου φάσματος κυτταροκινών των T-κυττάρων, μόνο η CD28 προκαλεί την απελευθέρωση άφθονης IL-2.<sup>84</sup> Αντίθετα, ο υποδοχέας ICOS είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην απελευθέρωση της IL-10,<sup>85</sup> η οποία εμπλέκεται στην παραγωγή B-κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων.<sup>86,87,88</sup> Ωστόσο, η έκφραση του ICOS κυρίως σε βλαστικά κέντρα του λεμφικού ιστού, υποδηλώνει την ουσιώδη συμμετοχή του υποδοχέα στη θυμοεξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε, όταν διαπιστώθηκε πως σε ICOS<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα παρατηρείται διαταραχή της χυμικής ανοσιακής απόκρισης.<sup>89,90</sup>



**Εικόνα 8: Προσδέτης της πρωτεΐνης ICOS είναι η πρωτεΐνη B7H**

Η αλληλεπίδραση B7H-ICOS οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAP κινασών, όταν το SH2 πεδίο της πρωτεΐνης ICOS συνδέεται με την P13K (από Rudd & Schneider).<sup>91</sup>

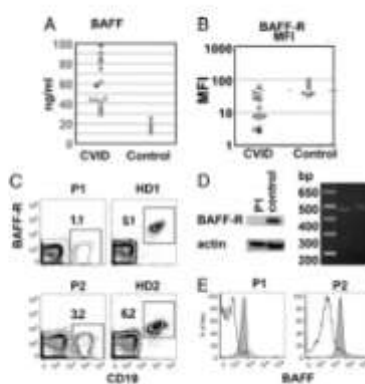
## 1.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών BAFFR, TACI και ICOS στις αντισωματικές ανοσοανεπάρκειες

Οι αντισωματικές ανεπάρκειες είναι οι πιο συχνές ανοσοανεπάρκειες στους ενήλικες. Χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ή απουσία των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA ή IgM στον ορό, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία σε βακτήρια με κάψα, αλλά και την αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων εκδηλώσεων και λεμφοϋπερπλασίας.<sup>92,93</sup> Για κάποιους τύπους ανοσοανεπάρκειας, όπως στο hyper-IgM συνδρόμου, έχουν ενοχοποιηθεί συγκεκριμένες γενετικές βλάβες, ενώ για άλλους τύπους (όπως η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (CVID), η επιλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgA (sIgAD), η ανεπάρκεια των IgG υποτάξεων σε συνδυασμό με την IgA ανεπάρκεια, η ειδική αντισωματική ανεπάρκεια με φυσιολογικά επίπεδα ανοσοσφαιρινών και η παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της βρεφικής ηλικίας), τα γενετικά αίτια παραμένουν άγνωστα.<sup>92</sup>

Οι αντισωματικές ανεπάρκειες εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Μεταξύ αυτών, η CVID και η sIgAD είναι οι πιο κοινές στους ενήλικες, με συχνότητα εμφάνισης 1/50.000 και 1/1.000 αντίστοιχα. Τα συμπτώματα πρωτοεμφανίζονται στην παιδική ή στη νεανική ηλικία. Οι πάσχοντες με CVID, λόγω των μειωμένων επιπέδων ανοσοσφαιρινών, παρουσιάζουν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις κυρίως της αναπνευστικής και σπανιότερα της γαστροεντερικής οδού.<sup>94,95</sup> Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με CVID προσβάλλονται συχνά από βακτήρια με κάψα με πιο κοινά τα *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* και *Moraxella catharralis*.<sup>96</sup> Σχεδόν κάθε ασθενής έχει μακρύ ιστορικό λοιμώξεων του αναπνευστικού με ένα ή περισσότερα επεισόδια πνευμονίας. Χρόνιες λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού προκαλούν βρογχεκτασία, εμφύσημα, ίνωση και πνευμονική ανεπάρκεια. Το γεγονός αυτό δείχνει τον καθοριστικό ρόλο που διαδραματίζει η χυμική ανοσία κατά την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων παθογόνων.<sup>97</sup> Πρόσφατη μελέτη των Carsetti και συν., έδειξε το σπουδαίο ρόλο που διαδραματίζουν τα IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> μνημονικά B-κύτταρα κατά την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια με κάψα και εξηγεί την ευαισθησία των ασθενών με CVID στο *Streptococcus pneumoniae*, αλλά και τη μη απόκρισή τους μετά από εμβολιασμό με πνευμονιόκοκκο με αποτέλεσμα την πνευμονική βλάβη.<sup>98</sup> Τα IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> μνημονικά B-κύτταρα αποτελούν ένα συγκεκριμένο υποπληθυσμό επανακυκλοφορούντων B-κυττάρων, που στοχεύουν στην αντιμετώπιση των εν λόγω βακτηρίων βάσει ενός θυμοανεξάρτητου τρόπου.<sup>99</sup> Σχετικά με την sIgAD, συνήθως είναι ασυμπτωματική, καθώς μόνο το 1/3 των ασθενών εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις και αυτοανοσία.<sup>100</sup> Παρόμοια με την sIgAD, η πλειοψηφία των ασθενών με επιλεκτική

ανεπάρκεια των υποτάξεων της ανοσοσφαιρίνης IgG, δεν εμφανίζει συμπτώματα.<sup>92</sup>

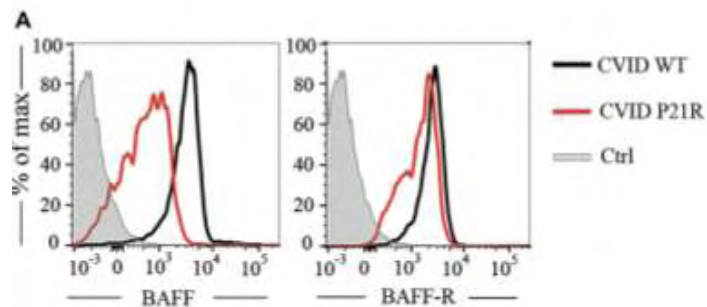
Σε πρόσφατες μελέτες, γενετικές βλάβες των γονιδίων *TNFRSF13C*/BAFFR, *TNFRSF13B*/TAC1 και *ICOS* έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση αντισωματικών ανοσοανεπαρκειών. Σχετικά με το γονίδιο *TNFRSF13C*/BAFFR, κάποιες μεταλλάξεις σε αυτό φαίνεται να συνδέονται με έναν τροποποιημένο φαινότυπο όσον αφορά τον αριθμό των Β-κυττάρων, προτείνοντας ότι η παρουσία τους συμβάλλει στην έλλειψη της χυμικής ανοσίας. Μελέτη των Warnatz και συν., που έγινε σε μεγάλο αριθμό CVID ασθενών και υγιών μαρτύρων έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις του BAFF είναι σημαντικά υψηλότερες στον ορό των ασθενών συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις τους στους μάρτυρες, ενώ η έκφραση του BAFFR βρέθηκε να είναι ασθενέστερη σε οκτώ ασθενείς, σε έναν εκ των οποίων ήταν ιδιαίτερος χαμηλή. Αλληλούχιση του γονιδίου *TNFRSF13C* στον ασθενή αυτόν καθώς και στα μέλη της οικογένειάς του, αποκάλυψε μία ομόζυγη έλλειψη 24 ζευγών βάσεων (del89-96) η οποία βρίσκεται στο εξώνιο 2, σε δύο άτομα. Η ομόζυγη έλλειψη έχει παθολογικό ρόλο, καθώς παρατηρήθηκε πως και τα δύο άτομα παρουσίασαν σοβαρή Β-λεμφοπενία που προκλήθηκε από την διακοπή της ωρίμανσης των Β-κυττάρων στο μεταβατικό στάδιο της διαφοροποίησής τους.<sup>101</sup>



### **Εικόνα 9: Αναγνώριση BAFFR ανεπάρκειας**

*A.* Επίπεδα BAFF (ng/ml) στον ορό ασθενών με CVID και φυσιολογικών μαρτύρων (control). *B.* Μέση ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR στην επιφάνεια των Β-κυττάρων ασθενών με CVID και φυσιολογικών μαρτύρων. *C.* Έκφραση της πρωτεΐνης BAFFR στα Β-κύτταρα 2 ασθενών (P1, P2) και 2 φυσιολογικών μαρτύρων (HD1 και HD2). *D.* Ανοσοϊστοχημική χρώση για BAFFR σε αθανατοποιημένα με EBV Β-κύτταρα ενός ασθενούς με CVID και ενός φυσιολογικού μάρτυρα χρησιμοποιώντας την β ακτίνη (actin) ως γονίδιο αναφοράς. *E.* PCR πραγματικού χρόνου του γονιδίου *TNFRSF13C* σε mRNA ενός ασθενούς με CVID και ενός φυσιολογικού μάρτυρα. *E.* Ικανότητα πρόσδεσης του προσδέτη BAFF στα Β-κύτταρα ασθενών με CVID (Από Warnatz και συν.).<sup>101</sup>

Οι Losi και συν., έπειτα από την ανάλυση αλληλούχισης σε όλο το γονίδιο *TNFRSF13C* σε ασθενείς με CVID και σε υγιή άτομα, περιέγραψαν μεταλλάξεις, αλλά και πολυμορφισμούς. Η παραλλαγή P21R (rs77874543) συμβαίνει στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης του υποδοχέα, όπου φυσιολογικά προσδένεται ο συνδέτης BAFF. Παρουσία του πολυμορφισμού, ο υποδοχέας δεν είναι ικανός να σχηματίσει ομοτριμερή και έτσι το BAFF δεν μπορεί να προσδεθεί φυσιολογικά, για να επάγει την σηματοδότηση. Άρα ο πολυμορφισμός P21R έχει μια αρνητική δράση, αποτρέποντας την επίτευξη της πρόσδεσης του συνδέτη στον υποδοχέα για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος.<sup>102</sup>



**Εικόνα 10: Ο πολυμορφισμός του γονιδίου *TNFRSF13C*-P21R και ο ρόλος της αντικατάστασης αμινοξέος στη δημιουργία BAFFR τριμερών**

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός αντιστοιχεί σε αλλαγή αμινοξέος στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης του υποδοχέα, όπου φυσιολογικά προσδένεται ο συνδέτης BAFF. Παρουσία του πολυμορφισμού, ο υποδοχέας δεν είναι ικανός να σχηματίσει ομοτριμερή και έτσι το BAFF δεν μπορεί να προσδεθεί φυσιολογικά, για να επάγει την σηματοδότηση. Παρατηρείται μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του BAFF σε ασθενείς με CVID συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες, παρόλο που η επιφανειακή έκφραση του υποδοχέα δε διαφέρει πολύ μεταξύ τους (από Piereg και συν.).<sup>103</sup>

Στο 2<sup>ο</sup> εξώνιο έχει βρεθεί η μετάλλαξη G64V, με συχνότητα εμφάνισης περίπου 1% στους ασθενείς με CVID. Τέλος, στο 3<sup>ο</sup> εξώνιο του BAFFR, παρατηρήθηκε η παραλλαγή H159Y (rs61756766) σε έναν ασθενή με CVID, στον φυσιολογικό πατέρα του και σε έναν υγιή μάρτυρα. Η αντικατάσταση του αμινοξέος γίνεται στην ενδοκυττάρια περιοχή και βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τη μετάλλαξη P21R, καθώς δεν έχει βρεθεί μόνη της, αλλά πάντα σε συσχέτιση με τη μετάλλαξη P21R. Παρά το γεγονός ότι στο σύνολο των ασθενών οι μεταλλάξεις/πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν ήταν σε ετεροζυγωτία, η παρουσία τους ωστόσο δεν προκάλεσε κάποια διαταραχή στην έκφραση του BAFFR υποδοχέα.<sup>102</sup>

Γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *TNFRSF13B*/TAC1 σε ομόζυγη, ετερόζυγη ή διπλά ετερόζυγη κατάσταση έχουν αναφερθεί στο 10% των ασθενών με CVID και

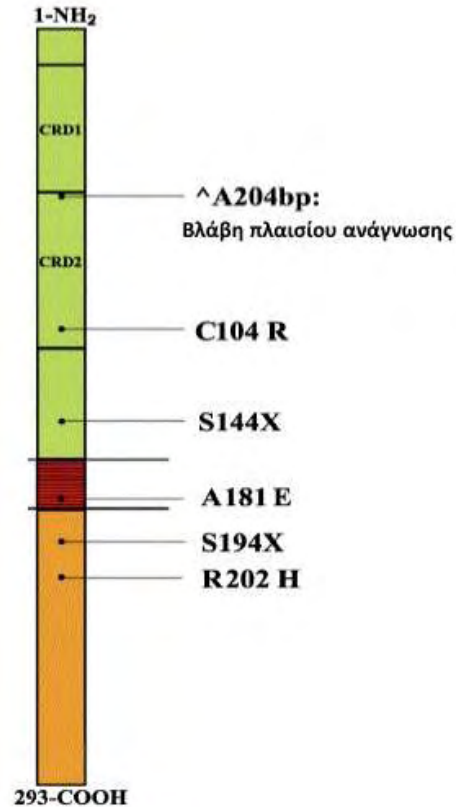
sIgAD<sup>104,105</sup> και η παρουσία τους φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης σπληνομεγαλίας και αυτοανοσίας.<sup>71,106,107</sup> Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη των Salzer και συν. που περιελάμβανε 564 ασθενείς με COVID, έδειξε ότι μεταξύ των μεταλλάξεων του γονιδίου *TNFRSF13B*, δύο από αυτές (οι *TNFRSF13B-C104R* και *TNFRSF13B-A181E*) εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς συγκριτικά με τα φυσιολογικά άτομα. Η συσχέτιση της *TNFRSF13B-C104R* (rs34557412) σε ετερόζυγη μορφή με την ανάπτυξη COVID είναι πιο ισχυρή από την *TNFRSF13B-A181E* (rs72553883).<sup>104</sup>

Ειδικά για την C104R μετάλλαξη, διαπιστώθηκε ότι παρεμποδίζει την πρόσδεση του συνδέτη, ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή.<sup>108</sup> Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη C104R διαταράσσει τον δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys93 και Cys104 και παρεμβαίνει στο σχηματισμό του h2 βρόχου στο CRD-2 του TACI υποδοχέα. Η μετάλλαξη C76R στους επίμυες είναι το ισοδύναμο της μετάλλαξης C104R στον άνθρωπο. Οι Geha και συν., προσπάθησαν να καθορίσουν το αποτέλεσμα της μετάλλαξης C76R σε επίμυες που εκφράζουν τόσο το φυσιολογικό, όσο και το μεταλλαγμένο υποδοχέα (C76R<sup>+</sup>). Οι C76R/TACI (+/-) επίμυες είχαν σημαντικά μειωμένες θυμο-ανεξάρτητες απαντήσεις (παραγωγή αντισωμάτων στα αντιγόνα TNP-Φικόλη) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [B6/129 επίμυες C76R/TACI (+/+)]. Επίσης, τα B κύτταρά τους είχαν μειωμένη ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να εκκρίνουν IgG1 ανοσοσφαιρίνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι σε αντιστοιχία η μετάλλαξη C104R στον άνθρωπο θα μπορούσε να βλάψει τη λειτουργία του υποδοχέα TACI και σε ετεροζυγώτες, μέσω της ανεπάρκειας κατάλληλου απλοτύπου (haploinsufficiency).<sup>109</sup>

---

<sup>i</sup> Ο όρος "haploinsufficiency" ισχύει όταν ένας διπλοειδής οργανισμός έχει μόνο ένα ενιαίο λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου (με το άλλο αντίγραφο να έχει αδρανοποιηθεί λόγω μετάλλαξης), το οποίο δεν παράγει επαρκή ποσότητα πρωτεΐνης, οδηγώντας έτσι σε μια ανώμαλη ή ασθενή ιδιότητα. Είναι υπεύθυνη για ορισμένες, αλλά όχι για όλες τις αυτοσωματικές κυρίαρχες διαταραχές (dominant-negative effect).

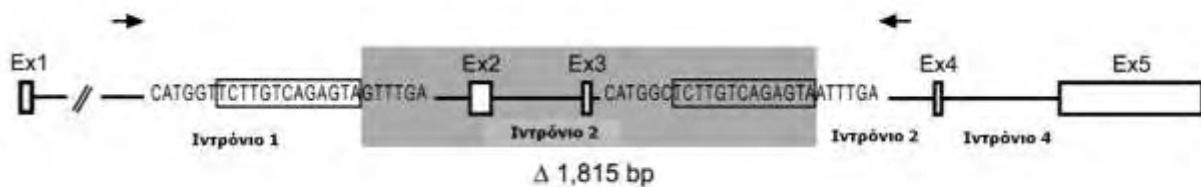




### **Εικόνα 11: Μεταλλάξεις στο γονίδιο TNFRSF13B**

*Κοινές μεταλλάξεις στο γονίδιο TNFRSF13B και η περιοχή που αντιστοιχεί η καθεμιά στην πρωτεΐνη TACI (από Castigli και συν. με τροποποιήσεις).<sup>110</sup>*

Η συσχέτιση της πρωτεΐνης ICOS με την CVID έγινε γνωστή μετά τη μελέτη των Grimbacher και συν., κατά την οποία αναγνωρίστηκε απουσία της έκφρασης του υποδοχέα σε ασθενείς με ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Η γενετική μελέτη που ακολούθησε, έδειξε ότι η απουσία της έκφρασης οφειλόταν σε έλλειψη τμήματος του γονιδίου *ICOS*. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα άτομα αυτά, ενώ τα T-κύτταρα τους ήταν φυσιολογικά ως προς την κατανομή των υποπληθυσμών, την παραγωγή κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό τους, ο αριθμός των B-κυττάρων που είχαν υποστεί ισotypική μεταστροφή είχε μειωθεί σημαντικά.<sup>111</sup> Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι *ICOS*<sup>-/-</sup> και *ICOSL*<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ζώα, είχαν παρόμοιο φαινότυπο (ελαττωματική δημιουργία βλαστικών κέντρων, μειωμένη χυμική απόκριση)<sup>112</sup>, επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό ρόλο του ICOS στην T-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των B-κυττάρων.



**Εικόνα 12: Απαλοιφή 1815 bp στο γονίδιο ICOS.**

Αλληλούχιση (sequencing) του ελλιπούς προϊόντος PCR 1,2 kb αποκάλυψε απαλοιφή των 1.815 bp στο γονίδιο ICOS (μέρος ιντρονίου 1, εξόνιο 2, ιντρονίου 2, εξόνιο 3 και μέρος του ιντρονίου 3). Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 13 βάσεων που προκύπτει φαίνεται περιγεγραμμένη. Η σκιασμένη περιοχή χαρακτηρίζει τα τμήματα του γονιδίου ICOS που έχουν απαλειφθεί. Ex: εξώνιο (από Grimbacher και συν., με τροποποιήσεις).<sup>111</sup>

### 1.7 Ο ρόλος των πρωτεϊνών BAFFR και TAC1 στα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα

Τα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα αποτελούν τις πιο συχνές αιματολογικές κακοήθειες στο δυτικό κόσμο, με τη ΧΛΛ να καταλαμβάνει την πρώτη θέση, καλύπτοντας το 30% του συνόλου των λευχαιμιών. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την προοδευτική μονοκλωνική αύξηση του αριθμού των Β-κυττάρων τα οποία αθροίζονται στους λεμφικούς ιστούς, στο μυελό και στο αίμα. Ορίζεται με βάση το χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο των Β-κυττάρων, ο οποίος είναι CD5+, CD19+, CD23+, FMC7-, ενώ οι δείκτες CD20, CD79b/CD22 και οι επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες ανευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα με ασθενή έκφραση.<sup>113</sup> Το 80% των ασθενών είναι >60 ετών, με μέσο όρο ηλικίας προσβολής τα 69,6 έτη.<sup>114</sup> Το οικογενειακό ιστορικό ΧΛΛ ή άλλης λεμφοϋπερπλαστικής νόσου αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου και ισχύει στο 10% των περιπτώσεων, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για τους πρώτου βαθμού συγγενείς νοσούντων κατά 30 φορές.<sup>115</sup>

Η ΧΛΛ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και ουσιαστικά διακρίνεται σε δύο υποτύπους, με διαφορές μεταξύ τους τόσο καθοριστικές, ώστε να ορίζουν σχεδόν διαφορετική νόσο. Η διάκριση γίνεται ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία μεταλλάξεων στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης (*IGHV*) που αφορά στο τμήμα εκείνο στο γονιδίωμα του λεμφοκυττάρου από το οποίο συντίθεται η περιοχή του ειδικού αντισώματος που έρχεται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο. Ο ανασυνδυασμός αυτού του γονιδίου είναι που δημιουργεί μοναδικά αντισώματα και, επομένως, μοναδικούς κλώνους ενεργοποιημένων Β-κυττάρων. Όταν λοιπόν η αλληλουχία βάσεων του γονιδίου αυτού στα κύτταρα της νόσου διαφέρει >2% σε σύγκριση με το αντίστοιχο γονίδιο των κυττάρων της βλαστικής σειράς (πρώιμα κύτταρα), το γονίδιο θεωρείται μεταλλαγμένο.<sup>116</sup> Οι διαφορές μεταξύ των δύο υποτύπων καλύπτουν όλη την πορεία της νόσου, αρχίζοντας από την

προέλευση του κακοήθους κυττάρου και την παθογένεια, μέχρι τη συμπεριφορά του κυττάρου και τα μετρήσιμα βιολογικά του παράγωγα. Η πλέον χαρακτηριστική διαφορά είναι η σημαντικά χειρότερη πρόγνωση του μη μεταλλαγμένου τύπου, διαπίστωση η οποία καθιέρωσε έκτοτε τη μελέτη των βιολογικών παραμέτρων της νόσου χωριστά και συγκριτικά για τους δύο τύπους.<sup>117</sup>

Στην επιφάνεια των παθολογικών Β-κυττάρων εκφράζεται το μόριο CD5 το οποίο μόνο σε ένα ποσοστό ~20% εκφράζεται στα φυσιολογικά Β-κύτταρα των δευτερευόντων λεμφικών οργάνων των ενηλίκων (π.χ. λεμφαδένες). Αυτό οδήγησε στη σκέψη, ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ προκύπτουν από τα παραπάνω. Η μελέτη των CD5+ φυσιολογικών Β-κυττάρων αποκαλύπτει ότι πρόκειται για κύτταρα που παράγουν χαμηλής συγγένειας (πολυαντιδρώντα) μη ειδικά αντισώματα, όπως και IgM αυτοαντισώματα. Τα τελευταία είναι ανιχνεύσιμα και σε φυσιολογικά άτομα, καθώς και σε ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές (όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο) ή με ΧΛΛ.<sup>118</sup> Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα της ΧΛΛ μπορεί να προέρχονται από τα παραπάνω κύτταρα. Από την άλλη μεριά, επειδή οι πρόγονοί τους θεωρείται ότι έχουν έλθει σε επαφή με ειδικά αντιγόνα, έχει προταθεί ότι τα ΧΛΛ κύτταρα προέρχονται από κύτταρα μνήμης. Την πρόταση αυτή ενισχύει το γεγονός ότι τα παθολογικά ΧΛΛ κύτταρα όταν συγκριθούν με άωρα Β κύτταρα, βλαστικής σειράς, CD5+ Β-κύτταρα και κύτταρα μνήμης, ομοιάζουν περισσότερο στα τελευταία, όπως και ο κοινός δείκτης CD27.<sup>119</sup>

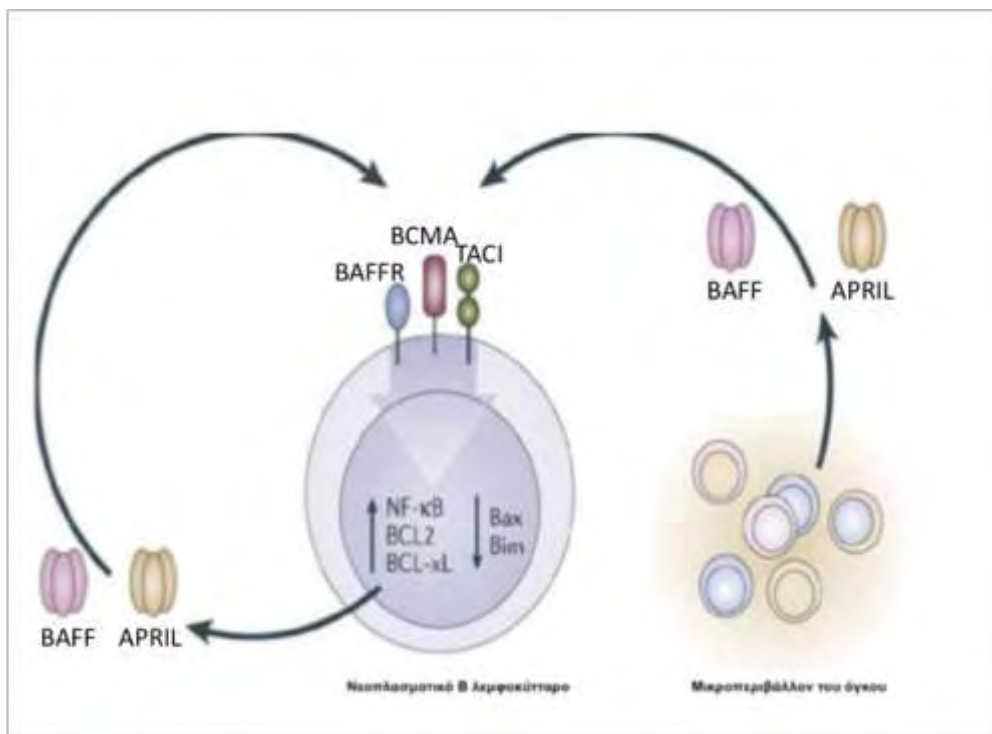
Οι υποδοχείς των Β-κυττάρων σε πολλούς ασθενείς έχουν συχνά δομικές ομοιότητες μεταξύ τους.<sup>120</sup> Αυτό σημαίνει ότι συνδέουν και όμοια αντιγόνα τα οποία παίζουν ρόλο στην παθογένεια. Έτσι, σε κάποιες περιπτώσεις η ομοιότητα εντοπίζεται στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας<sup>121</sup> και σε άλλες στις μεταβλητές περιοχές της βαριάς και της ελαφράς αλυσίδας, στα σημεία υποδοχής του αντιγόνου. Περίπου το 10% όλων των περιπτώσεων νόσου μπορεί να ταξινομηθεί σε κατηγορία κοινών υποδοχέων, αλλά αυτό το φαινόμενο αφορά πολύ περισσότερο στο μη μεταλλαγμένο τύπο, όπου το ποσοστό ανέρχεται στο 20%.<sup>122</sup> Γι' αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να λεχθεί ότι συγκεκριμένα αντιγόνα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακόμα αν πρόκειται για ιούς, βακτήρια, περιβαλλοντικά αντιγόνα ή και αυτοαντιγόνα.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι σήματα που λαμβάνουν τα κύτταρα της ΧΛΛ από το μικροπεριβάλλον τους, συμβάλλουν στην επιβίωσή τους και σ'αυτή τη βάση, το μπλοκάρισμα διάφορων κυτταροκινών που προσδένονται στους υποδοχείς τους έχει προταθεί για τη στοχευμένη θεραπεία της νόσου.<sup>123,124</sup> Τέτοια είναι κυτταροκίνες, όπως η IL-4, η INF-α, η INF-γ, που εκκρίνονται από τα Τ-κύτταρα.<sup>125</sup> Σημαντική είναι και

η οικογένεια κυτταροκινών TNF (παράγοντες νέκρωσης όγκων) που εκκρίνονται επίσης από τα T-κύτταρα και επιδρούν στον κυτταρικό υποδοχέα CD40.<sup>126</sup> Η πρόσδεση των συνδετών BAFF και APRIL στους υποδοχείς των καρκινικών B-κυττάρων έχει δειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει την απόπτωση και να προωθήσει την κυτταρική επιβίωση *in vitro*.<sup>127,128,129,130,131</sup> Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL ενεργοποιούν και στα κύτταρα της ΧΛΛ τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω του κλασικού μονοπατιού, όταν προσδένονται στους υποδοχείς TAC1 και BCMA. Επιπρόσθετα, η κυτταροκίνη BAFF ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού, όταν προσδέεται στον υποδοχέα BAFFR.<sup>132,133</sup>

Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL στη ΧΛΛ έχουν μελετηθεί ευρέως. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά B-κύτταρα που δεν εκφράζουν τα μόρια BAFF και APRIL, τα ΧΛΛ κύτταρα τα παράγουν σε μεμβρανική και εκκριτική μορφή. Η αυτοκρινής, αλλά και παρακρινής δράση των προσδετών στους υποδοχείς τους έχει ενοχοποιηθεί για την προστασία των ΧΛΛ κυττάρων από την απόπτωση.<sup>129</sup> Επιπλέον, τα ενδοκυττάρια επίπεδα BAFF και APRIL θεωρείται ότι έχουν προγνωστική αξία στη ΧΛΛ, καθώς βρέθηκε ότι συσχετίζονται με τους προγνωστικούς δείκτες CD38 και Zap70 και οι ασθενείς με χαμηλότερο επίπεδα ενδοκυττάριας έκφρασης BAFF και APRIL έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής.<sup>134</sup> Σχετικά με τα επίπεδα των μορίων στον ορό και πάντα σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζουν πολύ χαμηλά ως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα BAFF και ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα APRIL.<sup>135,136</sup> Στο πλαίσιο αυτό, οι Planelles και συν. βρήκαν ότι μόνο τα επίπεδα APRIL στον ορό σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών, όπου όσο χαμηλότερα τόσο καλύτερη η έκβαση της νόσου.<sup>135</sup> Ο σπουδαίος ρόλος του APRIL αναφέρεται και από τους Tecchio και συν., όπου από τα επίπεδά του μπορεί να προβλεφθεί ο χρόνος έναρξης της θεραπείας.<sup>136</sup> Παρόλο που τα επίπεδα του BAFF δε φαίνεται να σχετίζονται με τη ΧΛΛ, δεν ισχύει το ίδιο για τα NHL, καθώς έχει αναφερθεί ότι ευρίσκεται στους αντίστοιχους ασθενείς και οι συγκεντρώσεις του αυξάνονται όσο το νόσημα γίνεται πιο επιθετικό. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το BAFF έχει συσχετιστεί με την επιβίωση αλλά και την εκδήλωση των συμπτωμάτων.<sup>137</sup>

Οι μελέτες της έκφρασης των υποδοχέων BAFFR, TAC1 και BCMA στα κύτταρα της ΧΛΛ, παρόλο που έχουν συμπεριλάβει μικρό αριθμό ασθενών (από 10 έως 25 άτομα), έχουν δείξει ότι ο BAFFR εκφράζεται με μικρότερη ένταση φθορισμού συγκριτικά με τα φυσιολογικά B-κύτταρα, ο TAC1 παρουσιάζει ποικίλα επίπεδα έκφρασης του, ενώ ο BCMA είναι μη ανιχνεύσιμος.<sup>138,139,140</sup> Ωστόσο, η συσχέτιση των πρωτεϊνών με την κλινική πορεία της νόσου και την πρόγνωση της δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.



**Εικόνα 13: Η δράση των κυτταροκινών BAFF και APRIL στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα**

Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL συνδεδεμένες στους υποδοχείς των καρκινικών Β-κυττάρων μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση και να προωθήσουν την κυτταρική επιβίωση *in vitro*, δρώντας είτε παρακρινώς είτε αυτοκρινώς (από Dillon και συν. με τροποποιήσεις).<sup>141</sup>

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι μεταλλάξεις σε ανοσογονίδια έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ανοσοανεπαρκειών, αρχικός σκοπός μας αποτέλεσε η μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B* σε Έλληνες ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες και η συσχέτιση μεταλλάξεων του με την εμφάνιση και τον φαινότυπο της νόσου. Επεκτείνοντας τη μελέτη και βασιζόμενοι στο γεγονός ότι ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια έχουν 80 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν λεμφοϋπερπλαστική νόσο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, προχωρήσαμε στον έλεγχο του συγκεκριμένου ανοσογονιδίου, αλλά και των ανοσογονιδίων *TNFRSF13C* και *ICOS* σε ασθενείς με Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, που αποτελεί την πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια στο δυτικό κόσμο. Εκλεκτικοί αναστολείς των υποδοχέων TACI, BAFFR αλλά και των προσδετών τους, που χρησιμοποιούνται ήδη θεραπευτικά έναντι αυτοάνοσων νοσημάτων, έχουν προταθεί και για τη θεραπεία της ΧΛΛ. Για αυτόν το λόγο, η συσχέτιση της έκφρασης των υποδοχέων σε επίπεδο μεταγραφικό και πρωτεϊνικό με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα της νόσου, την πρόγνωσή της, αλλά και η σημασία της στόχευσής τους, αποτέλεσαν καίρια ερωτήματα της παρούσας μελέτης.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

---

## 1. Ασθενείς και μάρτυρες

Η μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B*/TACI πραγματοποιήθηκε αρχικά σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια. Συγκεκριμένα, τα δείγματα ελήφθησαν από 16 άτομα με CVID (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 7/9, μέση ηλικία: 26.4 έτη, διακύμανση: 2-60), 16 άτομα με επιλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgA, sIgAD (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 7/9, μέση ηλικία: 20.1 έτη, διακύμανση: 4-79), οι 4 εκ των οποίων είχαν και ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgG4, 11 άτομα με επιλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgG4, sIgG4 (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 5/6, μέση ηλικία: 49.1 έτη, διακύμανση: 4-80) και 4 άτομα με παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της νεογνικής ηλικίας (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 3/1, μέση ηλικία: 9 μήνες, διακύμανση: 5-12). Οι περιπτώσεις στην πλειοψηφία τους ήταν σποραδικές, με εξαίρεση τρεις ασθενείς, όπου στο οικογενειακό τους ιστορικό είχαν περιστατικά ανοσοανεπάρκειας. Στην πρώτη οικογένεια, οι τρεις ασθενείς υπέφεραν από CVID και τρεις άλλοι από sIgG4. Στη δεύτερη οικογένεια, οι δύο ασθενείς υπέφεραν από CVID και στην τρίτη οικογένεια, δίδυμα αδέρφια υπέφεραν από sIgAD. Τα μέλη των οικογενειών με αντισωματική ανεπάρκεια επίσης συμπεριλήφθησαν στη μελέτη, με αποτέλεσμα να εξεταστούν τελικά 53 ασθενείς (18 με CVID, 17 με sIgAD, 14 με sIgG4 και 4 με παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της νεογνικής ηλικίας). Οι ασθενείς με CVID πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια που περιελάμβαναν τα χαμηλά επίπεδα των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA ή/και IgM στον ορό τα οποία ήταν δύο φορές ή και πιο χαμηλά από το κατώτερο φυσιολογικό όριο, φτωχή ή απύσχα απόκριση στους εμβολιασμούς και απόκλιση των άλλων αιτιών που προκαλούν υπογαμμασφαιριναιμία.<sup>142</sup> Οι 9 από τους 17 ασθενείς με sIgAD (52,9%) διαγνώστηκαν κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων λοιμώξεων ή αυτοανοσίας, ενώ οι υπόλοιποι 8 (47,1%) συμπεριλαμβανομένων των δίδυμων αδερφών, διαγνώστηκαν τυχαία. Τα δίδυμα αδέρφια επιπλέον έπασχαν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Από τους 14 ασθενείς με sIgG4, μόνο οι 3 (21,4%) εμφάνιζαν επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, ενώ η διάγνωση για τους υπόλοιπους έγινε τυχαία. Μεταξύ αυτών, μια γυναίκα 71 έτους έπασχε από σαρκοειδωση για 5 χρόνια και ένας άνδρας 80 ετών έπασχε από χρόνια πνευμονική ανεπάρκεια. Τέλος, η διάγνωση της παροδικής υπογαμμασφαιριναιμίας της νεογνικής ηλικίας έγινε έπειτα από την καταγραφή επαναλαμβανόμενων λοιμώξεων του αναπνευστικού κατά την νεογνική ηλικία. Όλοι οι ασθενείς με CVID υποβάλλονταν σε θεραπεία αποκατάστασης ενώ από τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών, μόνο ένας ασθενής με παροδική ανοσοανεπάρκεια της νεογνικής ηλικίας έχρηζε θεραπείας. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών καταγράφονται στον πίνακα 2.



Για τη μελέτη των μορίων BAFFR, TACI και ICOS στους ασθενείς με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα, περιφερικό αίμα ή/και δείγμα μυελού των οστών λήφθηκε από 94 ασθενείς με ΧΛΛ (αναλογία ανδρών/ γυναικών: 53/41, μέση ηλικία: 68,6, διακύμανση: 39-87) οι οποίοι πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια.<sup>143</sup> Το υλικό τους συλλέχθηκε από τον Νοέμβριο του 2007 μέχρι τον Δεκέμβριο του 2012. Εξ'αυτών των ασθενών, οι 54 μελετήθηκαν κατά τη διάγνωση της νόσου, οι 21 είχαν λάβει θεραπεία κατά το παρελθόν, ενώ οι υπόλοιποι 19 αναλύθηκαν κατά την υποτροπή της νόσου τους. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυελού των οστών από 30 ασθενείς με λεμφοπαραγωγά νοσήματα, χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας, διαφορετικά της ΧΛΛ (όπως η μακροσφαιριναιμία Waldenström, το σπληνικό λέμφωμα, το MALT λέμφωμα και η λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα), (αναλογία ανδρών/ γυναικών: 18/12, μέση ηλικία: 75,7, εύρος: 51-91) Στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα των ασθενών της ομάδας ελέγχου πραγματοποιήθηκε ανοσοφαινοτυπική μελέτη των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων και ανάλυση της έκφραση των μορίων TACI και BAFFR σε επίπεδο πρωτεϊνικό. Επιπρόσθετα, συλλέχθηκε υλικό από 315 εθελοντές δότες (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 170/145, μέση ηλικία: 68, εύρος: 19-92) το οποίο αποτέλεσε τη δεύτερη ομάδα ελέγχου. Στα δείγματα των 78 φυσιολογικών μαρτύρων (αναλογία ανδρών/ γυναικών: 41/37, μέση ηλικία: 68,4, εύρος: 39-81) αναλύθηκαν οι υποπληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων τους, η έκφραση των μορίων TACI και BAFFR σε επίπεδο πρωτεϊνικό, ενώ στους υπόλοιπους 19 (αναλογία ανδρών/ γυναικών : 7/12, μέση ηλικία: 62,8, διακύμανση: 29-84) πραγματοποιήθηκε μια πιο λεπτομερής ανάλυση της TACI πρωτεϊνικής έκφρασης στους διάφορους υποπληθυσμούς των Β-κυττάρων (στα παρθένα Β και τα Β-κύτταρα μνήμης) και επιπροσθέτως στον ορό τους έγινε προσδιορισμός των κυτταροκινών BAFF και APRIL. Σε μεγάλο μέρος των φυσιολογικών μαρτύρων έγινε προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης των πιο κοινών πολυμορφισμών των γονιδίων *TNFRSF13B* και *TNFRSF13C*. Από όλους τους ασθενείς ελήφθη πλήρες ιατρικό ιστορικό στο οποίο καταγραφόταν η συχνότητα και ο τύπος λοιμώξεων, η παρουσία αυτοαντισωμάτων και αυτοάνοσων εκδηλώσεων, υπογαμμασφαιριναιμίας, μονοκλωνικού κλάσματος, καθώς και η θεραπεία που έλαβαν οι ασθενείς στο παρελθόν και που δείγματά τους λήφθησαν κατά την υποτροπή της νόσου τους. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Κανένας ασθενής, ούτε φυσιολογικός μάρτυρας, δεν έλαβε χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτικά έξι μήνες πριν συμπεριληφθούν στη μελέτη. Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη έγινε σχετική ενημέρωση και παραλήφθηκε ενυπόγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη συνθήκη του Ελσίνκι 2.

**Πίνακας 2: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες**

<b>Κλινικές εκδηλώσεις</b>	<b>CVID (18)</b>	<b>IgAD (17)</b>	<b>sIgG4 (14)</b>	<b>TH1 (4)</b>
Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις				
Αναπνευστικού, αρ.(%)	15 (83,3)	5 (29,4)	3 (21,4)	4 (100)
Γαστροεντερικού, αρ.(%)	5 (27,7)	1 (5,8)		
Ουροποιητικού, αρ.(%)	3 (13,3)	2 (11,5)		
Σπληνομεγαλία, αρ.(%)	5 (27,7)			
Λεμφαδενοπάθεια, αρ.(%)	5 (27,7)			
Κοκκιωματώδης νόσος, αρ.(%)	2 (11,1)			
Αυτοάνοσια, αρ.(%) <sup>1</sup>	5 (27,7)	5 (29,4)		
Χωρίς συμπτώματα, αρ.(%)		8 (47,1)	11 (78,6)	
Βρογχιεκτασίες, αρ.(%)	4 (22,2)			
ΧΠΠ, αρ.(%)	1 (5,6)	2 (11,5)		
ΧΑΠ, αρ.(%)	2 (11,1)			
Δυσκολία ακοής, αρ.(%)	1 (5,6)			
Υπερσπληνισμός, αρ.(%)	1 (5,6)			
Καθυστέρηση ανάπτυξης, αρ.(%)		1 (5,8)		
Νεοπλασία, αρ.(%) <sup>2</sup>	2 (11,1)			

<sup>1</sup> Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις των ασθενών με CVID περιελάμβαναν αρθρίτιδα, επαναλαμβανόμενη αυτοάνοση (ιδιοπαθή) θρομβοπενική πορφύρα, ατοπική δερματίτιδα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, υποθυρεοειδισμό. Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις των ασθενών με IgAD περιελάμβαναν αυτοάνοση (ιδιοπαθή) θρομβοπενική πορφύρα, θυρεοειδίτιδα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, σύνδρομο Raynaud και αρθρίτιδα.

<sup>2</sup> Και οι 2 ασθενείς εμφάνισαν νόσο Hodgkin 7 και 13 χρόνια μετά τη διάγνωση της νόσου.

**Πίνακας 3: Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ**

	Συνολικά	Στη διάγνωση	Σε επανέλεγχο	
			Χωρίς θεραπεία	Κατά την υποτροπή <sup>1</sup>
Αριθμός ασθενών (%)	94 (100,0)	54 (57,4)	21 (22,3)	19 (20,3)
Φύλο (Α/Γ)	53/41	34/20	10/11	9/10
Ηλικία(έτη, μέση τιμή±διακύμανση)	68,6±10,0	68,7±10,5	65,7±9,9	71,3±7,8
Λευκά αιμοσφαίρια (x10 <sup>9</sup> /L) (μέση τιμή±διακύμανση)	28,4±20,0	25,1±15,0	25,0±18,1	41,3±28,5
B λεμφοκύτταρα (x10 <sup>9</sup> /L) (μέση τιμή±διακύμανση)	19,4±16,8	14,5±12,4	16,0±15,3	23,4±18,5
Ταξινόμηση κατά Rai				
Στάδιο 0 (αρ./%)	42/44,7	28/51,9	8/38,0	6/31,6
Στάδιο I (αρ./%)	22/23,4	9/16,6	10/47,7	3/15,8
Στάδιο II (αρ./%)	11/11,7	7/13,0	2/9,5	2/10,5
Στάδιο III (αρ./%)	10/10,6	8/14,8	0/0	2/10,5
Στάδιο IV (αρ./%)	9/9,6	2/3,7	1/4,8	6/31,6
Κατά τη διάγνωση και τον επανέλεγχο				
Αυτοάνοσες εκδηλώσεις	18/19,1	10/18,5	1/4,8	7/36,8
Coombs άμεση (αρ./%) <sup>2</sup>	7/7,4	4/7,4	0/0	3/15,8
Άλλες (αρ./%) <sup>3</sup>	11/11,7	6/11,3	1/4,8	4/21,0
Λοιμώξεις (αρ./%) <sup>4</sup>	19/20,2	8/14,8	1/4,8	10/52,6
Αναπνευστικού (αρ./%)	10/10,6	3/5,5	1/4,8	6/31,6
Ουροποιητικού (αρ./%)	2/2,1	0/0	0/0	2/10,5
Ερπητοϊώσεις (αρ./%) <sup>5</sup>	5/5,3	2/3,7	0/0	3/15,8
Μονοκλωνικό Μ κλάσμα <sup>7</sup>	7/7,4	2/3,7	2/9,5	3/15,8
Θάνατος (αρ./%)	20/21,3	11/20,3	2/9,5	7/36,8

<sup>1</sup> Οι ασθενείς που εξετάστηκαν κατά την υποτροπή είχαν λάβει στο παρελθόν chlorambucil (10 ασθενείς), fludarabine (3 ασθενείς), κορτικοστεροειδή (1 ασθενής), cyclophosphamide/vincristine (2 ασθενείς), ή συνδυασμό φαρμάκων (3 ασθενείς). Anti-CD20 (rituximab) χορηγήθηκε σε 6 ασθενείς σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα.

<sup>2</sup> Ένας ασθενής κατά τη διάγνωση και ένας κατά την υποτροπή της νόσου εκδήλωσε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.

<sup>3</sup> Αυτοάνοσες εκδηλώσεις: ρευματοειδή πολυμυαλγία (1 ασθενής), νόσος του Crohn (1 ασθενής), θρομβοπενική πορφύρα (1 ασθενής), υποθυρεοειδισμός (αντι-θυρεοσφαιρίνης/αντι-TG αντισώματα; 1 ασθενής), ενώ 7 ασθενείς είχαν αυτοαντισώματα χωρίς να έχουν αυτοάνοσες εκδηλώσεις (ANA, ANCA, ASMA, ENA, APA).

<sup>4</sup> 3 ασθενείς κατά την υποτροπή εμφάνισαν παραπάνω από 2 διαφορετικούς τύπους λοιμώξεων

<sup>5</sup> Λοίμωξη από herpes simplex (1 ασθενής) και varicella zoster virus (4 ασθενείς).

<sup>6</sup> Λοιμώξεις: σήψη (2 ασθενείς), εγκεφαλίτιδα (1 ασθενής), σαλμονέλωση (1 ασθενής) και φυματίωση (1 ασθενής).

<sup>7</sup> IgG (5 ασθενείς), IgM (2 ασθενείς)

## 2. Υλικά

### 2.1 Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

#### α) Μονοκλωνικά αντισώματα

Στις κυτταρομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε πληθώρα μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα χαρακτηριστικά τους αναγράφονται στους πίνακες 4-5.

#### β) Λοιπά αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

Στο σύνολο των διεργασιών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους πίνακες 6 και 7, αντίστοιχα.

**Πίνακας 4: Τα ισотυπικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό ασθενών και μαρτύρων**

mab	Φθορ <sup>a</sup>	Αριθμός καταλόγου	Ισοτυπικό αντίσωμα για την ανίχνευση:	Προέλευση
IgG <sub>2a</sub> -K	PE	12-4321-42	του TACI υποδοχέα	eBioscience, USA
Fab-τμήματα ανοσοσφαιρινών	FITC	X092901	του μορίου IgD	Dako, Denmark
IgG <sub>1</sub>	PE	A07796	του BAFFR υποδοχέα	Beckman Coulter, USA
IgG <sub>1</sub>	PC5	A07798	του μορίου CD27	Beckman Coulter, USA
IgG <sub>1</sub> /IgG <sub>1</sub>	FITC/PE	A07794	αντιγόνων σημασμένων με διπλά FITC/PE αντισώματα	Beckman Coulter, USA

<sup>a</sup>Φθοριόχρωμα

**Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη των επιφανειακών αντιγόνων**

<b>Αντιγόνο</b>	<b>Κλώνος</b>	<b>Φθορ<sup>α</sup></b>	<b>Αριθμός Καταλόγου</b>	<b>Προέλευση</b>
CD45	J33	PC5	A07785	Beckman Coulter, USA
CD3	UCHT1	PC5	A07749	Beckman Coulter, USA
		FITC	A07768	Beckman Coulter, USA
CD19	J3-119	PE		
		ECD	A07769	Beckman Coulter, USA
		PC5		
CD5	BL1a	FITC	A08932	Beckman Coulter, USA
CD10	ALB1	PE	A07759	Beckman Coulter, USA
CD11c	BU15	PE	IM1760	Beckman Coulter, USA
CD20	B9E9	FITC	A07772	Beckman Coulter, USA
CD23	9P25	FITC	IM0529	Beckman Coulter, USA
CD38	T16	FITC	A07778	Beckman Coulter, USA
CD43	DFT1	FITC	IM3264	Beckman Coulter, USA
CD79b	CB3-1	PE	IM1612	Beckman Coulter, USA
FMC7	FMC7	FITC	A07791	Beckman Coulter, USA
CD27	1A4CD27	PC5	6607107	Beckman Coulter, USA
IgD	<b>ΜΔ<sup>β</sup></b>	FITC	F0059	Dako, Denmark
Kappa/lamda		FITC/PE		Dako, Denmark
BAFFR	11C1	FITC/PE	316906	BioLegend, USA
TACI	1A1	PE	ab5994	Abcam, USA
CD45/14	Immuno 19.2	FITC/PE	A07738	Beckman Coulter, USA
CD3/CD4	UCHT1/ 13B8.2	FITC/PE	A07733	Beckman Coulter, USA
CD3/CD8	UCHT1/ B9.11	FITC/PE	A07734	Beckman Coulter, USA

**Πίνακας 6: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους**

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όνομα προϊόντος</b>	<b>Αρ.Καταλόγου</b>	<b>Προέλευση</b>
Αλβουμίνη βοδινού ορού	10x BSA	B9001S	New England Biolabs, USA
Αμινοξύ L-αργινίνη, L-ασπαραγίνη, L-γλουταμίνη	<b>MEM</b> , Non Essentials aminoacids solution 10mM	11140-035	Gibco, USA
Αντιβιοτικά (γλουταμίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη)	PSG (100X Solution)	10378-016	Gibco, USA
Αντίστροφη μεταγραφάση MMLV	MMLV-RT	28025-021	Invitrogen, Life Technologies, UK
Νεφελομετρικός αντιορός	N Latex CardioPhase hsCRP Reagent	OQIY21	Siemens, Germany
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, Eu
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αραιωτικό διάλυμα	N Diluent D	OUMT65	Siemens, Germany
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα PBS	PBS	508002	INOVA Diagnostics, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer,	15581-028	Invitrogen,UK
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW1	19081	Qiagen, Germany
Διάλυμα πλύσης	Buffer AW2	19072	Qiagen, Germany
Διάλυμα εκχύλισης	<b>Elution Buffer AE</b>	19077	Qiagen, Germany
Διάλυμα λύσης	Lysis Buffer AL	19075	Qiagen, Germany
Διάλυμα ελέγχου	N/T Protein Control SL/M	OQIO135	Siemens, Germany
Διάλυμα Novex TBE	<b>Novex® TBE Running Buffer (5X)</b>	LC6675	Invitrogen, UK
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	Rnase ZAP	AM9780	Ambion, USA
Διάλυμα λύσης	VersaLyse™ Lysing Solution	A09777	Beckman Coulter, USA

---

**Πίνακας 6 (Συνέχεια)**

Διάλυμα Supplementary	N Supplementary Reagent/Precipitation	OUMU15	Siemens, Germany
Διάλυμα Diluent	N Diluent	OUMT 65	Siemens, Germany
Διάλυμα DMSO	Dimethyl sulfoxide > 99,5%	D5879-1L	Sigma-Aldrich, EU
Διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης	<b>N Protein Standard</b> SL	OQIM13	Siemens, Germany
Διάλυμα Tango	<b>10x Buffer Tango</b>	BY5	Fermentas, Germany
Διάλυμα TRIzol	TRIzol Reagent	15596-026	Invitrogen, Life Technologies, UK
Διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης	Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction	X0903	Dako, Denmark
Διάλυμα NEB 2	10xNEBuffer 2 Restriction Endonuclease Buffer	B7002S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 3	10x NEB Buffer 3 Restriction Endonuclease Buffer	B7003S	New England Biolabs, USA
Διάλυμα NEB 4	10x NEB Buffer 4 Restriction Endonuclease Buffer	B7004S	New England BioLabs, USA
Διάλυμα REACT 2	RE <sub>ACT</sub> <sup>®</sup> 2	16302-010	Invitrogen, UK
Ισοπροπανόλη	2-propanol	AL03232500	Scharlau
Κυτταροκίνη BAFF	rhBAFF/ TNFS13B recombinant human/ NSO-derived	2149-BF/CF	R&D Systems, Mineapolis, USA
Κυτταροκίνη APRIL	rhAPRIL A proliferation-inducing	884-AP	R&D Systems, Mineapolis, USA

---

	Ligand recombinant human/ NSO-derived		
<b>Πίνακας 6 (Συνέχεια)</b>			
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	<b>E-Gel® Low Range</b> Quantitative DNA Ladder	12373-031	Invitrogen, UK
Νερό ελεύθερο Ρηασών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Νεφελομετρικός αντιορός	IgM	OSAR09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgG	OSAS09	Siemens, Germany
Νεφελομετρικός αντιορός	IgA	OSAT09	Siemens, Germany
Πακέτο dNTPs	100 mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, Life Technologies, UK
Περιοστική ενδονουκλεάση Bve I	BveI (BspMI) RestrictionEnzyme	ER1741	Fermentas, Germany
Περιοστική ενδονουκλεάση Eag I	EagI Restriction Enzyme	R0505S	New England Biolabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση Mnl I	Mnl I Restriction Enzyme	R0163L	New England Biolabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση MscI	MscI Restriction Enzyme	R0534S	New England Biolabs, USA
Πολυακρυμίδη	20% TBE Gels 1.0 mm, 15well	EC63155BOX	Invitrogen, UK
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Πρωτεϊνάση	Qiagen Protease	19131	Qiagen, Germany
Τυχαία εξανουκλεοτίδια	Primer Random p(dN)	14292421	Roche, Eu
Φορμαλδεΰδη	Formaldehyde, solution 37%	FO0011	Scharlau, Spain
Φυκόλη	Ficoll 1,077 g/mL	1077-1	Sigma Aldrich, UK
Φυσιολογικός ορός αρουραίου	Normal Rat Serum	24-5555	eBioscience, USA
Χλωροφόρμιο	Acid phenol	112250	Euroclone, Italy



Chloroform

**Πίνακας 6 (Συνέχεια)**

Χρωστική	<b>10X BlueJuice™ Gel</b> LoadingBuffer	10816-015	Invitrogen, UK
Χρωστική	Platinum SYBR-Green PCR Supermix	11733-038	Invitrogen, UK
DNA kit	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
DNA Kit καθαρισμού	QIA quick gel extraction/purification kit	28704	Qiagen, Germany
DNA Kit αλληλούχισης	Big Dye Terminator DNA sequencing kit	4337456	Applied Biosystems, USA
FBS	Foetal Bovine Serum	10108-157	Gibco, USA
IMDM	<b>Iscove's</b> Modified Dulbecco's Medium	21980-065	Gibco, USA
Kit Αννεξίνης/ 7-AAD	Annexin V-FITC/7- AAD (7-AAD) kit	PNIM 3614	Beckman Coulter, USA
Kit προσδιορισμού διαλυτού BAFF	kit BAFF Soluble (human) ELISA Kit (hypersensitive),	Cat. No. AG-45B-0001-K101	Adipogen Liestal, Switzerland
Kit προσδιορισμού διαλυτού APRIL	Kit APRIL ELISA	IB49674	IBL, Minneapolis, USA
PCR kit	Taq PCR Master Mix Kit	201445	Qiagen, Germany

**Πίνακας 7: Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους**

<b>Αναλώσιμα</b>	<b>Όνομα προϊόντος</b>	<b>Αρ.Καταλόγου</b>	<b>Προέλευση</b>
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene, Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	10 µL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 µL	1000 µL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	200 µL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL, με φίλτρο	200 µL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 µL, με φίλτρο	30 µL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σύριγγα 21G	2.5 ml syringe		Elviony
Σωληνάρια πολυστυρενίου 5 mL	FACS tube, EasySep	3520105	StemCellTechn, Canada
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTA tubes	454087	Vacurette, USA
Σωληνάριο ορού	Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST)	367954	BD Vacutainer, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA

### 3. Μεθοδολογία

#### 3.1 Ανοσοφαινοτυπική μελέτη

Η Κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων κυτταρικών πληθυσμών βάσει της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών δεικτών είτε στην επιφάνεια των κυττάρων ή ενδοκυττάρια. Βασίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης και ανάλυσης κάθε μεμονωμένου κυττάρου ως προς τις διάφορες παραμέτρους, όπως το μέγεθος του κυττάρου, την πολυπλοκότητα επιφάνειας, το βαθμό ενδοκυττάριας κοκκίωσης και την έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων (μετά από σήμανση με ειδικά προς αυτά αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα). Αρχικά, τα λευκοκύτταρα διακρίνονται σε κυτταρικούς πληθυσμούς ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωσή τους βάσει του πρόσθιου (Forward scatter, FS) και πλάγιου σκεδασμού (Side scatter, SS) αντίστοιχα και στη συνέχεια πραγματοποιείται ο περαιτέρω χαρακτηρισμός τους με τη χρήση των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στη διαδικασία αυτή, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων με επικείμενη λύση τους, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός των λευκοκυττάρων στο κυτταρόμετρο. Η λύση των ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται με λυτικά διαλύματα που δεν επηρεάζουν τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων και την ακεραιότητα της κυτταρικής τους επιφάνειας. Ο λόγος που η λύση των ερυθροκυττάρων καθίσταται απαραίτητη σε όλες τις διαδικασίες της Κυτταρομετρίας είναι διότι ο σίδηρος (Fe) της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών φθορίζει, δίνοντας μη ειδικό σήμα.

##### 3.1.1 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών BAFFR και TACI στους διάφορους υποπληθυσμούς των φυσιολογικών Β-κυττάρων

Αρχικά, στα δείγματα των 19 φυσιολογικών μαρτύρων, προσδιορίστηκε ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, με αδρή διάκριση των υποπληθυσμών τους στον αιματολογικό αναλυτή MD-II Hematology Analyzer (Beckman/Coulter) και στη συνέχεια προστέθηκαν τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα στα αντίστοιχα σωληνάρια. Συγκεκριμένα, για τον χαρακτηρισμό των βοηθητικών (CD4<sup>+</sup>) και των κυτταροτοξικών (CD8<sup>+</sup>) T-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα αντισώματα CD3-FITC/CD4-PE και CD3-FITC/CD8-PE. Για τον χαρακτηρισμό των μονοκυττάρων και των Β-κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα αντισώματα CD45-FITC/CD14-PE και CD3-FITC/CD19-PE. Σε κάθε σωληνάριο, ακολουθώντας πρωτόκολλο διπλού φθορισμού, προστέθηκαν 10μl από τα προαναφερθέντα αντισώματα και έως 10<sup>6</sup> κύτταρα περιφερικού αίματος. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι, λύση των ερυθροκυττάρων με την προσθήκη 1ml ειδικού λυτικού διαλύματος και κυτταρομετρική ανάλυση με τον

κυτταρομετρητή FC 500 (Epics XL-MCL, 4 color analysis, Beckman-Coulter/BC, Hialeah, FL, USA).

Για την ανίχνευση παρθένων (naïve), μη μετεστραμμένων (non-switched) και Β-κυττάρων μνήμης (memory), χρησιμοποιήθηκαν τα IgD και τα CD27 μονοκλωνικά αντισώματα. Τους IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> πληθυσμούς χαρακτηρίζουν τα παρθένα Β-κύτταρα, τους IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> χαρακτηρίζουν τα μη μετεστραμμένα (memory non switched) Β-κύτταρα μνήμης, ενώ τα IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> χαρακτηρίζουν τα Β-κύτταρα μνήμης που έχουν υποστεί ισοτυπική-μεταστροφή.<sup>144</sup>

Σε καθέναν από τους τρεις αυτούς υποπληθυσμούς των φυσιολογικών Β-κυττάρων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών BAFFR και TACI. Το μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο είναι επισημασμένο με φθοριόχρωμα και συνδέεται στην επιφανειακή πρωτεΐνη BAFFR, παράγεται από ποντίκια (mouse anti-human monoclonal antibody, Biolegend), ενώ το μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη TACI παράγεται από αρουραίους (Rat anti-human monoclonal antibody, Biolegend). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 4 σωληνάρια πολυστυρενίου στα οποία εναποτέθηκαν 10<sup>6</sup> κύτταρα περιφερικού αίματος και εναιωρήθηκαν σε 1mL λυτικού διαλύματος VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter) για 10 min σε RT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min, ενώ μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 4mL 1x PBS. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Negative control rabbit immunoglobulin fraction (DAKO) που είναι ορός αρουραίου, για 20 min στους 37°C, ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές συνδέσεις. Έπειτα, προστέθηκαν σε όλα τα σωληνάρια 10μL μονοκλωνικού αντισώματος CD19-ECD. Στο σωληνάριο ελέγχου για το BAFFR το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του ειδικού από το μη ειδικό φθορισμό, προστέθηκαν 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα Fab-FITC, IgG1-PE και IgG1-PC5 ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα IgD-FITC, BAFFR-PE και CD27-PC5. Στο σωληνάριο ελέγχου για το TACI προστέθηκαν 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα Fab-FITC, IgG2a-PE και IgG1-PC5, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα IgD-FITC, TACI-PE και CD27-PC5. Σε κάποιες περιπτώσεις, αντί για τα αντισώματα BAFFR-PE και IgD-FITC χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα BAFFR-FITC και IgD-PE. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15 min στους 4°C και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600 rpm για 5 min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική έκπλυση, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1mL διαλύματος 1% FA-PBS και ακολούθησε η κυτταρομετρική ανάλυση.

### **3.1.2 Μελέτη των νεοπλασματικών κυττάρων σε ασθενείς με Β χρόνια λεμφοπαραγωγά σύνδρομα**

#### **3.1.2.1 Τυποποίηση λεμφοπαραγωγών συνδρόμων**

Η τυποποίηση των λεμφοπαραγωγών συνδρόμων στηρίχθηκε στην ταξινόμηση κατά WHO. Συγκεκριμένα, για την ανοσοφαινοτυπική μελέτη των νεοπλασματικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα τριπλού φθορισμού (πίνακας 8), όπου συμπεριελάμβαναν τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα CD3, CD19, CD45, CD5, CD20, CD23, CD38, CD43, CD10, CD11c, CD79b και FMC7, όλα της Beckman Coulter. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων αναμείχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 10μl από το κάθε αντίσωμα και  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος. Η επώαση αντισωμάτων - δείγματος έγινε σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία δωματίου για 15 min, ενώ η λύση των ερυθρών που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1ml ειδικού λυτικού διαλύματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαση διάρκειας 10 min σε RT. Ο έλεγχος της κλωνικότητας των B-κυττάρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα της DAKO (High Wycombe, UK) έναντι των κ και λ ελαφρών αλύσων των ανοσοσφαιρινών τα οποία παράγονται σε αρουραίους και για τον λόγο αυτό, της προσθήκης των αντισωμάτων προηγήθηκε η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η προσθήκη ορού από αρουραίο, ώστε να παρεμποδιστεί η μη ειδική σύνδεση. Πιο συγκεκριμένα, σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια πολυστυρενίου (το ένα εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκε ως σωληνάριο ελέγχου) εισήχθησαν  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος. Η λύση των ερυθρών πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1ml ειδικού λυτικού διαλύματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαση διάρκειας 10 min. Για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και επακόλουθη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα 1xPBS στις 1600 rpm για 5 min. Στο ίζημα που προέκυψε από τη δεύτερη φυγοκέντρηση έγινε προσθήκη ορού αρουραίου (20μl ορού σε 100μl δείγματος). Η επώαση διαρκούσε 15 min, στους 37°C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, στο δοκιμαστικό σωλήνα ελέγχου προστέθηκαν 20μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα Dual Control IgG1-FITC/ IgG1-PE και CD19-PC5, ενώ στο δοκιμαστικό σωλήνα δοκιμασίας 20μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-kappa-FITC, anti-lambda-PE και CD19-PC5. Η επώαση διαρκούσε 15 min σε σκοτεινό μέρος και RT. Ακολουθούσε έκπλυση με 1xPBS, φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και κυτταρομετρική ανάλυση του δείγματος.

### Πίνακας 8: Πρωτόκολλο τυποποίησης λεμφοπαραγωγών συνδρόμων

IgG1-FITC	IgG1-PE	CD45-PC5
CD3-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD5-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD20-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD23-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD38-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD43-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
FMC7-FITC	CD19-PE	CD45-PC5
CD19-FITC	CD10-PE	CD45-PC5
CD19-FITC	CD11c-PE	CD45-PC5
CD19-FITC	CD79b-PE	CD45-PC5

#### 3.1.2.2 Έλεγχος έκφρασης των μορίων IgD και CD27 στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ

Για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων IgD και CD27 στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάρια πολυστυρενίου στα οποία εναποτέθηκαν  $10^6$  κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος και εναιωρήθηκαν σε 1mL λυτικού διαλύματος για 10 min σε RT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min, ενώ μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 4mL 1xPBS. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε ορός αρουραίου για 20 min στους 37°C, ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές συνδέσεις. Έπειτα, προστέθηκαν σε όλα τα σωληνάκια 10μL μονοκλωνικού αντισώματος CD19-PE. Στο σωληνάριο ελέγχου, στο οποίο προστέθηκαν 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα Fab-FITC και IgG1-PC5, ενώ στο σωληνάριο δοκιμασίας 10μL από τα μονοκλωνικά αντισώματα IgD-FITC και CD27-PC5.

Ακολούθησε ανάδευση, επώαση 15 min στους 4°C και μια τελευταία έκπλυση με 1xPBS στις 1600 rpm για 5 min, όπως παραπάνω. Μετά την τελική έκπλυση, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1mL διαλύματος 1% FA-PBS και ακολούθησε η κυτταρομετρική ανάλυση.

### **3.1.2.3 Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης BAFFR στα νεοπλασματικά και στα φυσιολογικά B-κύτταρα**

Για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης BAFFR, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο επιφανειακής χρώσης. Σε ειδικό δοκιμαστικό σωληνάριο πολυστερενίου εισήχθησαν 10μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα (CD19-FITC, BAFFR-PE και CD45-PC5) και 10<sup>6</sup> κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος. Η επώαση διήρκεσε 15 min και ακολουθούσε λύση των ερυθρών με κατάλληλο λυτικό διάλυμα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η κυτταρομετρική ανάλυση του δείγματος. Για το διαχωρισμό του μη ειδικού από τον ειδικό φθορισμό, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 άσχετης ειδικότητας το οποίο είχε επισημανθεί με το ίδιο φθοριόχρωμα, με το οποίο επισημαίνεται το μονοκλωνικό αντι-BAFFR αντίσωμα (το δοκιμαστικό σωληνάριο ελέγχου δηλαδή περιείχε τα μονοκλωνικά αντισώματα CD19-FITC, IgG1-PE και CD45-PC5). Σε 2 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ, πραγματοποιήθηκαν επανέλεγχοι της έκφρασης 1 και 3 χρόνια μετά, για να οριστεί εάν εκείνη παραμένει σταθερή, στη διάρκεια του χρόνου.

### **3.1.2.4 Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης TACI στα νεοπλασματικά B-κύτταρα**

Ο κυτταρομετρικός προσδιορισμός του TACI υποδοχέα στα νεοπλασματικά B-κύτταρα έγινε με την χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων, έπειτα από προεργασία κάθε δείγματος. Για την ανίχνευση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης εισήχθησαν σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια πολυστερενίου (ένα σωληνάριο ελέγχου και ένα σωληνάριο δοκιμασίας) 10<sup>6</sup> κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος. Η λύση των ερυθρών πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 1ml ειδικού λυτικού διαλύματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαση διάρκειας 10 min. Για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και επακόλουθη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα 1xPBS στις 1600 rpm για 5 min. Στο ίζημα που προέκυψε από τη δεύτερη φυγοκέντρηση, προστέθηκε ορός αρουραίου, ώστε να παρεμποδιστεί η μη ειδική σύνδεση (3μl ορού σε 100μl δείγματος). Η επώαση διήρκεσε 15 min, στους 4°C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, στο δοκιμαστικό σωληνάριο ελέγχου προστέθηκαν 20μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα CD19-FITC, IgG2a-PE και CD45-PC5, ενώ στο δοκιμαστικό σωληνάριο δοκιμασίας 20μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα CD19-FITC, TACI-PE και CD45-PC5. Η επώαση διήρκεσε 15 min σε σκοτεινό μέρος και σε RT. Ακολούθησε έκπλυση

με 1XPBS, φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min και κυτταρομετρική ανάλυση του δείγματος.

### **3.2 Λειτουργική μελέτη**

#### **3.2.1 Απομόνωση μονοπυρήνων περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος**

Τα μονοπύρρηνα κύτταρα διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας. Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα των κυτταρικών συστατικών του αίματος σε σχέση με το μέσο διαχωρισμού (Φυκόλη- Ficoll: ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς με πυκνότητα 1,077g/mL). Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, όταν έρχονται σε επαφή με τη φυκόλη, σχηματίζουν συσσωματώματα, γεγονός που αυξάνει το ρυθμό καθίζησης. Αντίθετα, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια δεν είναι αρκετά πυκνά ώστε να διεισδύσουν το στρώμα της φυκόλης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη 4ml περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος σε κατάλληλο δοχείο με αντιπηκτικό μέσο (ηπαρίνη). Το αίμα επιστρώθηκε προσεκτικά σε όγκο 4ml φυκόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 30 min. Τα κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ της φυκόλης και του πλάσματος συλλέχθηκαν με μια πιπέτα και μεταφέρθηκαν σε ένα νέο σωληνάριο. Η στιβάδα φυγοκεντρήθηκε 1 φορά ακόμη, χρησιμοποιώντας διάλυμα 1xPBS στους 4°C για 5 min στις 1200 rpm με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος από αιμοπετάλια και φυκόλη. Στην συνέχεια, στο ίζημα προστέθηκε 1ml 1xPBS, μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο χωρητικότητας 1.5ml (eppendorf) και ακολούθησε μια τελευταία φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 min, 4°C). Η υγρή φάση αφαιρέθηκε και τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για τη φύλαξη των ζωντανών μονοπυρήνων, ώστε να καλλιεργηθούν σε δεύτερο χρόνο, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 80% θρεπτικού υλικού Iscove's, (SF-IDc) το οποίο περιείχε τα αμινοξέα L-αργινίνη (116mg/L), L-ασπαραγίνη (36mg/L) και L-γλουταμίνη (216mg/L), τα αντιβιοτικά γλουταμίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη (PSG), και μερκαπτοαιθανόλη (2-ME), 10% θερμικά αδρανοποιημένο ανθρώπινο ορό (HS) και 10% DMSO (Sigma). Η εναιώρηση των απομονωμένων κυττάρων στο ψυκτικό διάλυμα έγινε με βάση τον αριθμό των κυττάρων, συνήθως 15-20x10<sup>6</sup> PBMCs/ φιαλίδιο/ mL ψυκτικού διαλύματος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν σε ψυγείο -80°C, όπου και παρέμεναν για τουλάχιστον 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα αποθηκεύονταν, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στους -196°C σε δοχείο υγρού αζώτου (LN<sub>2</sub>).

#### **3.2.2 Καλλιέργεια των Β νεοπλασματικών κυττάρων και μελέτη της απόπτωσης**

Για να ελεγχθεί ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης TAC1 στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια μονοπυρήνων 3 ασθενών με ΧΜΛ που στα νεοπλασματικά τους κύτταρα εξέφραζαν TAC1 και 3 που δεν εξέφραζαν, παρουσία των



κυτταροκινών BAFF και APRIL. Αρχικά, έγινε απόψυξη των κυττάρων ( $2-4 \times 10^6$  κύτταρα/φιαλίδιο) τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο και εναιώρησή τους σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 1% FBS (Gibco), ώστε να διαλυθεί το τοξικό για αυτά DMSO τουλάχιστον 0.5% v/v. Αμέσως ακολούθησε φυγοκέντρηση (1200 rpm, 5 min, 20°C) και επαναδιάλυση των κυττάρων σε ζεστό (37°C) θρεπτικό μέσο 10% FBS-IDc. Τα κύτταρα παρέμειναν στο πλήρες θρεπτικό μέσο 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να ανακάμψουν και να διαχυθεί το υπολειπόμενο DMSO από τις μεμβράνες τους. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση του αριθμού των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην πλάκα Neubauer και υπολογισμός της βιωσιμότητας του δείγματος. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων και τοποθέτησή τους σε πλάκες 96 πηγαδιών (σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνταν  $0.5 \times 10^6$  κύτταρα αραιωμένα σε 0,5ml θρεπτικού υλικού 10% FBS-IDc). Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  της ανασυνδυασμένης κυτταροκίνης BAFF (R&D Systems) ή με 200  $\text{ng}/\text{mL}$  της κυτταροκίνης APRIL (R&D Systems) σε 0,1ml θρεπτικού υλικού IMDM (Life Technologies). Παράλληλα, κύτταρα κάθε ασθενούς καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό και χωρίς την παρουσία διεγέρτη ως δείγματα εσωτερικού ελέγχου. Η καλλιέργεια έγινε στους 37°C παρουσία 10%  $\text{CO}_2$  για 24h. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ικανότητα των κυττάρων να αποπίπτουν με δοκιμασίας αννεξίνης (Annexin V-FITC/7-AAD (7-AAD) kit, Beckman Coulter).

Η απόπτωση μπορεί να οριστεί ως μια φυσιολογική διαδικασία κυτταρικής αυτοκαταστροφής κατευθυνόμενη από το γονιδίωμα. Αναφέρεται συχνά και ως «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος» ή τύπου I PCD. Τα κλασικά αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν βάσει ενός χαρακτηριστικού προτύπου μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών αλλαγών. Μια από αυτές τις αλλαγές είναι και η έκθεση των καταλοίπων φωσφατιδυλσερίνης (PS).<sup>145</sup> Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα κατάλοιπα PS βρίσκονται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα κατάλοιπα PS μεταπηδούν στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης. Γενικά, αλλά όχι πάντοτε, αυτό είναι ένα πρώιμο γεγονός κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και θεωρείται ότι μεταδίδει σήματα στα γειτονικά κύτταρα, ότι ένα κύτταρο είναι έτοιμο να φαγοκυτταρωθεί. Η Annexin-V είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται ειδικά στα κατάλοιπα PS και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων. Επειδή η Annexin-V δεσμεύεται τόσο στα πρώιμα αποπτωτικά, όσο και στα όψιμα αποπτωτικά/ νεκρωτικά κύτταρα (τα οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα αποπτωτικών και νεκρωτικών γεγονότων), τα κύτταρα προς ανάλυση πρέπει να σημανθούν επιπροσθέτως και με μια χρωστική που επιτρέπει την διάκριση νεκρών κυττάρων, όπως το 7-AAD.<sup>146</sup>

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα: Τα

κύτταρα της καλλιέργειας συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια RIA ( $0.5 \times 10^6$  κύτταρα/ σωληνάριο), επαναιωρήθηκαν σε 4ml 1xPBS και φυγοκεντρήθηκαν (500 rcf, 5 min). Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 10μl CD19-PC7. Η επώαση διήρκεσε 15 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100μl 1x Binding Buffer και τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο. Στα σωληνάρια δοκιμασίας προστέθηκαν ακολούθως 1μl annexin V-FITC και 10μl 7-AAD. Η επώαση διήρκεσε 15 min και έγινε σε σκοτεινό μέρος, στους 4°C. Τέλος, στα σωληνάρια προστέθηκαν 400μl 1xbinding buffer και ακολούθησε η κυτταρομετρική ανάλυση.

### **3.3 Ορολογική μελέτη**

#### **3.3.1 Ανοσονεφελομετρία για τη μέτρηση της συγκέντρωσης τάξεων και υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών**

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM σε ασθενείς με ΧΛΛ και σε φυσιολογικά άτομα. Η νεφελομετρία είναι μια εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραπάνω και πραγματοποιήθηκε με την χρήση κατάλληλων αντιορών, αφού πρώτα στα δείγματα έγινε αυτόματα αρχική αραιώση με ειδικό διάλυμα (N Diluent D).

Ο νεφελομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά υγρά στηρίζεται στη σχέση της τελευταίας με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης (αντιγόνου) και του προστιθέμενου αντίστοιχου αντισώματος. Συγκεκριμένα, τα συμπλέγματα αυτά, <<διασκορπίζουν>> μια δέσμη φωτός που διαπερνά το δείγμα προς ανάλυση, όπου η ένταση του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της υπό εξέτασης πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αξιολογείται έπειτα από σύγκριση με μια γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Η διαδικασία απομόνωσης ορού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα τεχνική περιελάμβανε λήψη περιφερικού αίματος σε ειδικά σωληνάρια και φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 5min, ενώ τα δείγματα ορού που ελήφθησαν, αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Τα δείγματα ορού, έπειτα από την απόψυξή τους και πριν τη χρήση τους, παρέμειναν στους 4°C για 2-4 hrs και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ειδικά διάφανα σωληνάρια RIA.

Η καμπύλη αναφοράς (reference curve), βάσει της οποίας γίνεται ο νεφελομετρικός προσδιορισμός, σχηματίζεται ως συνάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και της γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα πρότυπα διαλύματα (standards). Συγκεκριμένα, η καμπύλη αναφοράς προκύπτει με βαθμονόμηση πολλαπλού σημείου, έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις μιας πρωτεΐνης συγκέντρωσης (N Protein Standard SL). Μετά τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, γίνεται

εσωτερικός έλεγχος ποιότητας με τη χρήση των N/T Protein Controls SL/M τα οποία αναλύονται και εκτιμώνται, όπως αναλύονται και τα δείγματα των ασθενών.

### **3.3.2 Προσδιορισμός των επιπέδων BAFF και APRIL στον ορό**

Τα επίπεδα των διαλυτών κυτταροκινών BAFF και APRIL προσδιορίστηκαν στον ορό 57 ασθενών με ΧΛΛ και 19 φυσιολογικών μαρτύρων με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA τύπου sandwich, χρησιμοποιώντας τα kit BAFF Soluble (human) ELISA Kit (hypersensitive), (Adipogen) και APRIL ELISA, (IBL, Minneapolis), αντίστοιχα. Ο συγκεκριμένος τύπος ανοσοπροσοφθητικής δοκιμασίας βασίζεται στο γεγονός ότι, καταρχάς το αντίσωμα προς διερεύνηση συνδέεται με το αντίστοιχο αντιγόνο στερεάς φάσης και έπειτα προστίθεται σ' αυτό το σύμπλοκο, δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι σεσημασμένο με κάποιο ένζυμο και ειδικό μόνο για την κυτταροκίνη BAFF ή την κυτταροκίνη APRIL. Τέλος, προστίθεται στο σύστημα το υπόστρωμα του ενζύμου του οποίου σύνδεση με το ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του από ένα άχρωμο υπόστρωμα σε έγχρωμο προϊόν αντιδράσεως. Η ένταση του χρώματος μετρείται φωτομετρικά και καθορίζει τη συγκέντρωση του αντισώματος προς ανάλυση.

Αναλυτικά, το kit για το BAFF περιείχε μια πλάκα 96 κελιών, στα οποία ήταν δεσμευμένα αντισώματα BAFF σε στερεά φάση. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη 100μl δείγματος ορού και επώαση για 3 hrs σε RT. Ακολούθησαν 5 πλύσεις με Wash Buffer 1x και προσθήκη 100μl του βιοτινιλυσμένου αντισώματος BAFF και επώαση 1 hr σε RT. Μετά το τέλος της επώασης, τα κελιά εκπλύθηκαν 5 φορές και προστέθηκαν 100μl υποστρώματος ενζύμου HRP με δεσμευμένη στρεπταβιδίνη για άλλα 30 min σε RT και ακολούθησαν άλλες 5 πλύσεις. Στο τελικό στάδιο προστέθηκαν στα κελιά 100μl υποστρώματος χρωμογόνου TMB του οποίου η επώαση έγινε στο σκοτάδι και διακόπηκε μετά από 15 min με την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού. Η κατώτερη ανιχνεύσιμη τιμή της κυτταροκίνης BAFF ανερχόταν στα 8 pg/ml. Η φωτομέτρηση έγινε σε διάστημα 30 min στα 450 nm.

Το kit για το APRIL περιείχε μια πλάκα 96 κελιών, στα οποία ήταν δεσμευμένα αντισώματα APRIL σε στερεά φάση. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη 50μl δείγματος και 50μl του βιοτινιλυσμένου αντισώματος APRIL και επώαση 2 hrs σε αναδευτήρα στις 400 rpm. Μετά το τέλος της επώασης, τα κελιά εκπλύθηκαν 6 φορές και προστέθηκαν 100μl υποστρώματος ενζύμου HRP με δεσμευμένη στρεπταβιδίνη για 1 hr σε αναδευτήρα στις 400 rpm και ακολούθησαν άλλες 6 πλύσεις. Στο τελικό στάδιο, προστέθηκαν στα κελιά 100μl υποστρώματος χρωμογόνου TMB του οποίου η επώαση έγινε στο σκοτάδι και διακόπηκε μετά από 10 min με την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού. Η κατώτερη ανιχνεύσιμη τιμή της κυτταροκίνης BAFF ανερχόταν στα 0.4 ng/ml. Η φωτομέτρηση έγινε σε διάστημα 30 min στα 450 nm.

### 3.4 Μοριακή μελέτη

#### 3.4.1 Απομόνωση RNA

Η εκχύλιση RNA έγινε με τη χρήση TRI λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων που ήταν διαθέσιμα. Τα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε μορφή ιζήματος μετά την απόψυξή τους, τοποθετήθηκαν απευθείας σε TRI ( $5-10 \times 10^6$  κύτταρα/mL) και ομογενοποιήθηκαν με ισχυρή ανακίνηση του σωληναρίου για 20 sec και εισαγωγή του δείγματος 5 φορές μέσα από σύριγγα 21G (2.5ml syringe, Elviongy). Το υλικό επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rcf για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο (1.5mL RNase-free tubes, Ambion, USA) και ακολούθησε προσθήκη 100μL χλωροφορμίου (Sigma). Τα δείγματα ανακινήθηκαν με αναστροφή του σωληναρίου, επώαστηκαν σε RT για 8 min και φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 rcf για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέα σωληνάρια και προστέθηκαν 500μL ισοπροπανόλη. Ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου για 10 sec, επώαση σε RT για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12000 rcf για 8 min στους  $20^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL αιθανόλη 75% με αναστροφή των σωληναρίων. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 7600 rcf για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ , το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα σωληνάρια παρέμειναν ανοικτά σε RT για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμιστεί η εναπομένουσα αιθανόλη. Προστέθηκαν 30μL νερό ελεύθερο RNAσών (Qiagen) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας σε πάγο. Μία μικρή ποσότητα RNA (2μL) χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση (BioPhotometer, Eppendorf). Σαν τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAσών σε κυβέτες UVette (Eppendorf). Στην ίδια κυβέτα τοποθετήθηκε το άγνωστο δείγμα σε αραιώση 1/50 και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σε ng/μL. Επαλήθευση της συγκέντρωσης και έλεγχος της ποιότητας του δείγματος για την παρουσία γενομικού DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% με βρωμιούχο αιθίδιο. Εφόσον η συγκέντρωση του δείγματος υπερέβαινε τα 100ng/μL, γινόταν προσαρμογή της συγκέντρωσης με νερό RNase-free και τα δείγματα αποθηκεύονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.2 Σύνθεση cDNA

Προκειμένου να μετατραπούν τα μόρια mRNA σε συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA), απαιτείται η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Qiagen (Omniscrypt RT kit, Qiagen) που περιελάμβανε: 10xRT buffer, διάλυμα dNTPs, Omniscrypt RT και  $\text{H}_2\text{O}$  ελεύθερο DNAσών και RNAσών. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν εξαμερή ως τυχαίοι εκκινητές (Primer random p[dN]6, Roche) και αναστολέας των RNAσών.

Τα δείγματα RNA και τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αρχικά, προετοιμάστηκε το μείγμα αντιδραστηρίων, όπως φαίνεται στον πίνακα 9.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.** Αντιδραστήρια για την σύνθεση cDNA

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος ανά δείγμα (μL)</b>
10xRT buffer	2.5
dNTP mix	2.5
RNAsin	0.31
Omniscript RT	1.25
RNase-free H <sub>2</sub> O	4.44

Στη συνέχεια, σε σωληνάρια PCR (Corning) τοποθετήθηκαν 3.5μL νερό με 4μL τυχαία εξαμερή και 6.5μL RNA. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 72°C για 2 min και στη συνέχεια προστέθηκαν 11μL μείγματος αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 42°C για 60 min και στη συνέχεια για 10 min στους 65°C, ώστε να επέλθει αδρανοποίηση των ενζύμων. Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 25μL νερό H<sub>2</sub>O και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **3.4.3 Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *TNFRSF13B* και *TNFRSF13C* σε μεταγραφικό επίπεδο**

Με χρησιμοποίηση του cDNA που προήλθε από το RNA των μονοπύρηνων 19 ασθενών με ΧΜΛ και από το RNA απομονωμένων Β-κυττάρων 2 φυσιολογικών μαρτύρων, μετά από μαγνητικό διαχωρισμό τους με τη χρήση kit Easy Sep Kit και του διαχωριστή Robosep™ instrument (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada), πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) στον αυτόματο κυκλικό μετατροπέα θερμοκρασίας RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia), με σκοπό να καθοριστεί ποσοτικά η έκφραση των γονιδίων *TNFRSF13B*/TAC1 και *TNFRSF13C*/BAFFR σε μεταγραφικό επίπεδο.

Η ποσοτική PCR βασίζεται στη σήμανση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού (η οποία είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος) που εκπέμπεται καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η PCR πραγματικού χρόνου ποσοτικοποιεί την παραγωγή προϊόντος κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης, γιατί μόνο κατά τη λογαριθμική φάση η ποσότητα του παραγόμενου

προϊόντος είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας DNA στο δείγμα. Το μέγεθος που χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος κατά τη λογαριθμική φάση της PCR είναι ο λεγόμενος <<κύκλος κατώφλιου>>,  $C_t$  (Cycle threshold). Ως κατώφλι ορίζεται το ελάχιστο σήμα φθορισμού που είναι στατιστικά σημαντικότερο από το υπόβαθρο της αντίδρασης (περίπου 3 φορές το SD του σήματος υποβάθρου). Ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο η καμπύλη φθορισμού της αντίδρασης τέμνει το κατώφλι, ορίζεται ως  $C_t$ . Οι τιμές  $C_t$  παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων, καθώς διαφορές στην αρχική ποσότητα του DNA μεταφράζονται σε διαφορές στις τιμές  $C_t$ , με το πιο εμπλουτισμένο σε DNA- στόχο δείγμα να παρουσιάζει μικρότερη τιμή  $C_t$ . Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων υπολογίζονται βάσει της συγκριτικής  $\Delta\Delta C_t$  μεθόδου και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του γονιδίου στόχου ομαλοποιημένη ως προς τα ενδογενή γονίδια αναφοράς. Για αντιδράσεις οι οποίες έχουν βελτιστοποιηθεί σωστά, η απόδοση πλησιάζει κοντά στο 1 (100%) και ως εκ τούτου, η ποσότητα του γονιδίου-στόχου, ομαλοποιημένη ως προς την ενδογενή αντίδραση αναφοράς και σχετικά με το βαθμονομητή, δίνεται από τη σχέση: σχετική ποσότητα έκφρασης =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Για να είναι έγκυροι οι υπολογισμοί βάσει της μεθόδου  $\Delta\Delta C_t$ , θα πρέπει η απόδοση της αντίδρασης πολυμερισμού του γονιδίου- στόχου να είναι ίδια με την απόδοση για το γονίδιο αναφοράς.

Η αποδοτικότητα της κάθε αντίδρασης κυμάνθηκε από 0.9 μέχρι 1.05. Για να ελεγχθεί η ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης, έγινε καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) στην οποία τα ειδικά προϊόντα έδιναν έντονες κορυφές, ενώ τα παραπροϊόντα και τα διμερή των εκκινητών έδιναν μικρότερες κορυφές σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (γύρω στους 70°C). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η  $\beta 2$  μικροσφαιρίνη και το GAPDH ενώ η χημεία των αντιδράσεων διαβαζόταν βασισμένη στην παρουσία στο ρυθμιστικό της χρωστικής Platinum-SYBR-Green PCR Supermix. Χρησιμοποιήθηκε αραιώση 1/20 του cDNA και όλες οι αντιδράσεις ήταν διπλές. Οι εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* και *GAPDH* σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Oligo 6.0 software (NBI, Plymouth, MN, USA) και αναγράφονται στον πίνακα 10, ενώ οι εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου της  $\beta 2$  μικροσφαιρίνης προήλθαν από την Qiagen. Οι συνθήκες των αντιδράσεων αναγράφονται στον πίνακα 11. Η έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε σε σύγκριση με την έκφρασή τους στην κυτταρική σειρά Jurkat (T-λεμφοβλάστες), όπου είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη.

### Πίνακας 10: Εκκινητές των qRT-PCR αντιδράσεων

---

<i>TNFRSF13B</i> -Q-	5' - TCTGCCTGTGTGCCGTCCTC - 3'
Πρόσθιος	
<i>TNFRSF13B</i> -Q-	5' - CGGCTTCCATCGCGTGAT - 3'
Οπίσθιος	
<i>TNFRSF13C</i> -Q-	5' - GAGACAAGGACGCCCCAGA - 3'
Πρόσθιος	
<i>TNFRSF13C</i> -Q-	5' - GGTCACCAGTTCAGTGGAGC - 3'
Οπίσθιος	
<i>GAPDH</i> - Πρόσθιος	5' - ACGGATTTGGTCGTATTGGGC - 3'
<i>GAPDH</i> - Οπίσθιος	5' - TTGACGGTGCCATGGAATTTG - 3'

---

### Πίνακας 11: Συνθήκες των qRT-PCR αντιδράσεων

---

<i>TNFRSF13B</i>	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec και 64°C για 60 sec
<i>TNFRSF13C</i>	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec, 60°C για 15 sec και 72°C για 45 sec
$\beta$ 2μ	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec και 60°C για 60 sec
<i>GAPDH</i>	50°C για 2min, 95°C για 2min, 40 κύκλοι 95°C για 15 sec και 60°C για 60 sec

---

#### 3.4.4 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενομικού DNA περιφερικού αίματος ή/ και μυελικού ελαιωρήματος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με εμπορικά διαθέσιμο kit (QIAGEN, QIAamp DNA Blood Mini Kit, USA). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας ήταν η απομόνωση καθαρού DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, αφού είχαν απομακρυνθεί πρωτεΐνες, άλατα και άλλα μόρια που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ανασταλτικά στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το DNA που λήφθηκε, μετά από μέτρηση σε φωτόμετρο, είχε μέση συγκέντρωση 100-150ng/μL. Αρχικά, σε ειδικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5ml εναποτέθηκαν 20μL Qiagen πρωτεάσης. Σκοπός του ενζύμου

αυτού είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Στο ίδιο σωληνάριο, προστέθηκαν 200μL δείγματος (περιφερικό αίμα ή μυελικό εναιώρημα) και 200μL διαλύματος λύσης (Buffer AL) το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Qiagen). Μετά από ανάδευση (vortex) του παρασκευάσματος, ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 min και στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%. Το άνω μίγμα εναποτέθηκε σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column, Qiagen) και φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 1 min. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8000rpm για 1 min και 14000 rpm για 3 min, αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά μέσω των αλάτων τους, προκαλούν αλλαγή του pH ώστε να διασφαλίσουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που πιθανόν να παρεμποδίσουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της ποιότητας του DNA. Έπειτα, αφού προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολούθησε επώαση 1 min και τελική φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 min. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200ng/μL. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη.

### **3.4.5 Μελέτη του επιπέδου υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλύσου της ανοσοσφαιρίνης**

Για τον έλεγχο του επιπέδου υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλύσου της ανοσοσφαιρίνης στα δείγματα των ασθενών με ΧΛΛ, πραγματοποιήθηκε αρχικά μια πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Multiplex PCR) και τα προϊόντα αυτής της 1<sup>ης</sup> αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν σε μία 2<sup>η</sup> Multiplex PCR. Στα προϊόντα της 2<sup>ης</sup> αντίδρασης έγινε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή τους από την πηκτική αгарόζης με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (QIAGEN, QIAquick gel extraction kit). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν από το πρόγραμμα IgBLAST- Basic Local Alignment Search Tool (NCBI). Οι εκκινητές των αντιδράσεων έχουν προηγουμένα δημοσιευτεί από τους Hojo et al<sup>147</sup> και παρουσιάζονται στον πίνακα 12. Στην 1<sup>η</sup> αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές FR1C, FR2A και LJH, ενώ στη 2<sup>η</sup> αντίδραση οι εκκινητές FR2A, VH1, VH2, VH3, VH4 και VLJH. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 13. Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μl και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 62.5μM από κάθε dNTP, 20pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0.8u SuperHot Taq- πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O.



### Πίνακας 12: Εκκινητές των qRT-PCR αντιδράσεων

---

FR2A	5' TGG(A/G)TCCG(C/A)CAG(G/C)C(T/C)(T/C)C(A/G/T/C) 3'
FR1C	5' AGGTGCAGCTG(C/G)(A/T)G(CG)AGTC(A/G/T)GG 3'
VH1	5' ACTAGTCGACCTCAGTGAAGGT 3'
VH2	5' ACTAGTCGACGTCCTGVGCTGGTGAAA(G/C)CCACAC 3'
VH3	5' ACTAGTGACGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 3'
VH4	5' ACTAGTCGACCCTGTCCCTCACCTGC(A/G)CTGTC 3'
LJH	5' TGAGGAGACGGTGACC 3'
VLJH	5' GTGACCAGGGT(A/G/C/T)CCTTGGCCCCAG 3'

---

### Πίνακας 13: Συνθήκες των Multiplex-PCR αντιδράσεων

---

1 <sup>η</sup>	96°C για 2 min, 5 κύκλοι: 96°C για 30 sec, 63°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, 25 κύκλοι: 96°C για 30 sec, 57°C για 30 sec και 72°C για 30 sec
2 <sup>η</sup> semi-nested	96°C για 2 min, 30 κύκλοι: 96°C για 30 sec, 63°C για 30 sec και 72°C για 30 sec

---

#### 3.4.6 Αλληλούχιση βάσεων του γονιδίου *TNFRSF13B/TAC1*

Στα δείγματα των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες πραγματοποιήθηκε αρχικά ενίσχυση των 5 εξωνίων του γονιδίου *TNFRSF13B* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing). Οι εκκινητές των αντιδράσεων σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Oligo-6 software (NBI, Plymouth, MN, USA) και παρουσιάζονται στον πίνακα 14, ενώ οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 15. Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μl και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 62.5μM από κάθε dNTP, 20pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0.8u Taq-πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

**Πίνακας 14: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR**

Εξώνια	Εκκινητές	Αλληλουχία
1	Πρόσθιος	5' TGCCTTTCATATAGCCATTG 3'
	Οπίσθιος	5' AGTCATTTTGCCTTTCATCTTT 3'
2	Πρόσθιος	5' GCAACAGAGATGACTTTATGCATTGA 3'
	Οπίσθιος	5' CTGCATCTAAGTGAACCTCCAA 3'
3	Πρόσθιος	5' AAGCCCTTCTATAAACACATT 3'
	Οπίσθιος	5' TGTCTCCCTGTTGGTCAA 3'
4	Πρόσθιος	5' TGGGGGATATTCTTTTGGTC 3'
	Οπίσθιος	5' TCTAGAATTAGGCCTTGGAGATGTT 3'
5	Πρόσθιος	5' GTGTATGAAAGGCAATGGAGAGG 3'
	Οπίσθιος	5' AGAATGCTGGCCCATTAAGATGAT 3'

Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από διάφορες προσμίξεις με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (QIAGEN, QIAquick gel purification kit). Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Αναλυτικότερα, σε πρώτη φάση προστέθηκε σε κάθε προϊόν PCR που προοριζόταν για καθαρισμό, διάλυμα (PBI buffer) σε ποσότητα τρεις φορές μεγαλύτερη από τον αρχικό όγκο του προϊόντος PCR. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIAquick column) η οποία περιέχει μεμβράνη, έτσι ώστε να γίνει προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI το οποίο εξασφαλίζει την απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10000 rcf για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, ακολούθησε πλύση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αιθανόλη (PE buffer) και φυγοκέντρηση στις 10000 rcf για 1 min. Ακολούθησε τρίτη φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη

άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αιθανόλης στα τοιχώματα της στήλης. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρησης 1,5ml, προστέθηκαν 35μl διαλύματος εκχύλισης (EB buffer), παρέμεινε για 1 min σε RT και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρηση στις 10000 rcf για 1 min.

Η αλληλούχισή τους που ακολούθησε, απαιτούσε τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator DNA sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Πίνακας 15: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR

Εξώνια	Συνθήκες
1	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 62°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (31 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
2	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 64°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (30 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
3	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 62°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (31 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
4	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 60°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (35 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min
5	Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 min, αποδιάταξη: 94°C για 30 sec, υβριδισμός: 55°C για 30 sec, επέκταση: 72°C για 30 sec (30 κύκλοι), τελική επέκταση: 72°C για 5 min

#### 3.4.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψη με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP) για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών *TNFRSF13B*-P251L, *TNFRSF13B*-V220A, *TNFRSF13C*-P21R και *TNFRSF13C*-H159Y

Η ανίχνευση των P251L, V220A, P21R και H159Y παραλλαγών έγινε με AS-PCR ακολουθούμενη από RFLP στο σύνολο των ασθενών με ΧΜΛ και σε φυσιολογικά άτομα. Με τη συγκεκριμένη τεχνική έγινε αρχικά ενίσχυση τμημάτων DNA των γονιδίων *TNFRSF13B*

και *TNFRSF13C* στα οποία εμπεριέχονται οι παραπάνω γενετικές παραλλαγές. Ωστόσο, η αλληλουχία του DNA στη θέση που ανιχνεύεται η V220A παραλλαγή του *TNFRSF13B* γονιδίου, δεν περιελάμβανε θέση πέψης για κανένα ένζυμο περιορισμού. Γι' αυτόν τον λόγο, χρειάστηκε ειδικός σχεδιασμός και τροποποίηση του πρόσθιου εκκινητή με στόχο τη δημιουργία αλληλουχίας πέψης από κατάλληλο ένζυμο περιορισμού παρουσία της παραλλαγής. Η συγκεκριμένη τροποποίηση δεν εμπόδιζε τη σύνδεση του εκκινητή στην αλληλουχία του DNA, δεδομένου ότι δεν αφορά την τελευταία βάση του. Στον πίνακα 16, παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών.

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μίγματος ήταν 30μl και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR Buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 62.5μM από κάθε dNTP, 20pmoles από κάθε εκκινητή (Thermo Fisher Scientific), 0.8u Taq-πολυμεράση, 100-200ng DNA και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O. Οι συνθήκες των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φαίνονται στον πίνακα 17.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονταν ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.

#### **Πίνακας 16: Εκκινητές των PCR αντιδράσεων**

---

TACI- 33544 Πρόσθιος	5' ACGCGATGGAAGCCGGCAGC(A)CCTG 3'
TACI-33772 Οπίσθιος	5' CATTTATGCACCTGGGCCCCCCTC 3'
BAFFR 1- Πρόσθιος	5' GTTCTCCCCGCAGCTGCCG-3'
BAFFR 1- Οπίσθιος	5' AGCCTCAGTCCCCGCAGCT 3'
BAFFR 3- Πρόσθιος	5' CCT CCA GAG GAG TCT TCT AG 3'
BAFFR 3- Οπίσθιος	5' TCC AAG CCC CTG ACT GGG 3'

---

### Πίνακας 17: Συνθήκες των PCR αντιδράσεων

TNFRSF13B	94°C για 2 min, 30 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 68°C για 30 sec και 72°C για 5 min
TNFRSF13C exon I	94°C για 2 min, 35 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 60°C για 30 sec, 72°C για 30 sec και 72°C για 5 min
TNFRSF13C exon III	94°C για 2 min, 39 κύκλοι με 94°C για 15 sec και 51°C για 15 sec, 72°C για 40 sec και 72°C για 5 min

Για την ανίχνευση της V220A παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού Bve I (BspMI) το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E.Coli, το οποίο φέρει το *bveIR* γονίδιο που προέρχεται από το πρωτεοβακτήριο *Brevundimonas vasicularis*. Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου BveI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 10xBuffer Tango, το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas).

Για την ανίχνευση της P251L παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού MnlI το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E. Coli, το οποίο φέρει το *MnlI* γονίδιο που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Moraxella nonliquefaciens*. Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου MnlI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 2 και 10xBSA. Η χρησιμότητα της BSA πρωτεΐνης έγκειται αφενός στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ενζύμου στα σωληνάρια ή άλλες επιφάνειες, (π.χ ρύγχη πιπετών) αφετέρου στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της αντίδρασης.

Για την ανίχνευση της P21R παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο EagI το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E.Coli, το οποίο φέρει το *EagI* γονίδιο που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Enterobacter agglomerans*. Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου EagI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 3 το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas).

Για την ανίχνευση της H159Y παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο MscI το οποίο απομονώνεται από ένα στέλεχος E.Coli, το οποίο φέρει το *MscI* γονίδιο που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Micrococcus species*. Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 1,25u του ενζύμου MscI παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 1xNEB Buffer 4 το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή (Fermentas).

#### 3.4.8 Μελέτη ελλείψεων του γονιδίου ICOS με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την ανίχνευση των ελλείψεων του γονιδίου ICOS ενισχύθηκε συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 2.914 bp, στην οποία περιλαμβάνονταν μέρος του ιντρονίου 1, το

εξώνιο 2, το ιντρόνιο 2, το εξώνιο 3 και μέρος του ιντρονίου 3. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση έχουν προηγούμενα δημοσιευτεί από τους Grimbacher και συν.,<sup>111</sup> και παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

### **Πίνακας 18: Εκκινητές της PCR αντίδρασης**

---

Πρόσθιος ICOS-LS      5' TGGGGCTTTATCTTTATTATCAGG 3'

Οπίσθιος ICOS-LAS      5' TGGGCGCTATCTCATTCTCT 3'

---

Η αντίδραση έγινε με τη βοήθεια ενός προπαρασκευασμένου διαλύματος που περιέχει Taq DNA πολυμεράση, PCR Buffer και dNTPs σε βελτιστοποιημένες συγκεντρώσεις. Το Taq PCR Master Mix Kit παρέχει μια τελική συγκέντρωση 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> και 200μM από κάθε dNTP και συμβάλλει στην ενίσχυση προϊόντων PCR μεγάλου μεγέθους το οποίο μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 7,3 kb. Για κάθε αντίδραση ο όγκος του μίγματος ήταν 30μL και περιείχε 15μL του προπαρασκευασμένου Taq PCR Master Mix διαλύματος, 10pmoles από κάθε εκκινητή, 100-200ng DNA και H<sub>2</sub>O. Η αντίδραση διεξαγόταν σε 36 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη (denaturation) στους 94°C για 45 sec, σύζευξη (annealing) των εκκινητών στους 55°C για 40 sec και δράση της Taq στους 68°C για 3,5 min. Στο τέλος των 36 κύκλων έγινε τελική επέκταση στους 68°C για 5 min. Αναλυτικά, σε ένα φυσιολογικό δείγμα, κατά την αντίδραση PCR ενισχύθηκε όλη η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου ICOS συνολικού μήκους 2,914 bp. Σε δείγμα με ετερόζυγη έλλειψη των τμημάτων του γονιδίου (ιντρόνιο 1, εξώνιο 2, ιντρόνιο 2, εξώνιο 3, μέρος ιντρονίου 3), αναμενόταν το φυσιολογικό τμήμα των 2,914bp και μια μικρότερου μήκους καθορισμένη αλληλουχία 1,099bp. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης έγιναν ορατά έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% TBE, όπως παραπάνω.

### **3.5 Στατιστική ανάλυση**

Η μη παραμετρική δοκιμασία U των Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να συγκριθούν οι συνεχείς μεταβλητές. Σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν  $p < 0,05$ . Η αναζήτηση συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση TACI και BAFFR και τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ έγιναν με τη χρήση της μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης (univariate logistic regression) και με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient,  $r$ ) κατά Spearman. Η  $\chi^2$  (chi-square) ανάλυση χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκριθούν οι συχνότητες των αλληλίων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων. Όπου χρειάστηκε, χρησιμοποιήθηκε ο ακριβής έλεγχος Fisher. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (Statistical Package for the Social

Sciences 16, SPSS 16, Chicago, IL, USA).

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---

---



#### 4.1.1 Γενετικές βλάβες του *TNFRSF13B* γονιδίου σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες- Συχνότητα εμφάνισης των βλαβών

Η μελέτη του γονιδίου *TNFRSF13B*, κατέδειξε ότι οι γενετικές βλάβες σε αυτό δεν είναι αιτιολογικές για την εμφάνιση αντισωματικών ανεπαρκειών και μπορεί να επηρεάσουν τον φαινότυπό τους, μόνο αν συνδυαστούν με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι βλάβες σε Έλληνες ασθενείς με CVID εμφανίζονται με παρόμοια συχνότητα με τους υπόλοιπους Καυκάσιους πληθυσμούς, ενώ σε ασθενείς με sIgG4D εμφανίζονται σχετικά συχνότερα (18.8%). Αναλυτικότερα, η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου *TNFRSF13B* στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες στο σύνολό τους αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων παρανοηματικών (missense) μεταλλάξεων, μιας προσθήκης βάσης, τριών σιωπηλών πολυμορφισμών και τριών ιντρονικών αντικαταστάσεων που ήδη έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

Πιο συγκεκριμένα, ένας ασθενής με CVID είχε την μετάλλαξη C104R (rs34557412), ένας ασθενής με sIgG4D ανεπάρκεια είχε τη μετάλλαξη A181E (rs72553883) και ένας τρίτος ασθενής με επιλεκτική IgG4 ανεπάρκεια είχε την προσθήκη c.204insA (p.L69TfsX12). Επιπρόσθετα, ένας ασθενής με CVID είχε τον πολυμορφισμό V220A (rs56063729), ενώ ο κοινός πολυμορφισμός P251L (rs34562254) ήταν παρών σε έντεκα ασθενείς (τρεις με CVID, πέντε με IgAD, δύο με sIgG4D και ένας με TH1). Όλοι οι ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες για τις προαναφερόμενες γενετικές βλάβες με μοναδική εξαίρεση έναν ασθενή με IgAD ο οποίος ήταν ομόζυγος για τον πολυμορφισμό P251L. Η συχνότητα εμφάνισης των λειτουργικών πολυμορφισμών στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες αναφέρονται στον πίνακα 19, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των σιωπηλών μεταλλάξεων 27T (rs8072293), 97P (rs35062843), 277S (rs11078355) και των ιντρονικών πολυμορφισμών 24625A>C (rs2274892), 33402T>G (rs11652843) και 33482T>C (rs11652811) παρουσιάζονται στον πίνακα 20.

Στην εικόνα 14 απεικονίζονται γενεαλογικά δένδρα των τριών οικογενειών που στο ιστορικό τους είχαν περιστατικά ανοσοανεπάρκειας. Στην 1<sup>η</sup> οικογένεια, το 1<sup>ο</sup> άτομο που μελετήθηκε γενετικά και έπασχε από CVID, έφερε τον πολυμορφισμό P251L σε ετεροζυγωτία. Στην ίδια οικογένεια, ένα αγόρι ηλικίας 6 ετών με sIgG4D, έφερε τη μετάλλαξη R202H την οποία όμως είχε κληρονομήσει από τον ασυμπτωματικό πατέρα του, μιας και η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε στη μητέρα του που όμως έπασχε από CVID. Στη 2<sup>η</sup> οικογένεια, τα 2 άτομα που έπασχαν από CVID, ήταν ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό P251L. Τέλος, στην 3<sup>η</sup> οικογένεια, τα δίδυμα αδέρφια που έπασχαν από ΧΑΠ και παράλληλα εμφάνισαν sIgAD, δεν έφεραν κάποια από τις λειτουργικές βλάβες του γονιδίου *TNFRSF13B*, παρά μόνο τους συνώνυμους πολυμορφισμούς 27T και 277S αλλά και τις ιντρονικές βλάβες, 24625A>C, 33402T>G και 33482T>G, όλες σε ετεροζυγωτία.

Στην εικόνα 15 παρουσιάζονται παραδείγματα αλληλούχισης του γονιδίου αλλά και αναλύσεις εντοπισμού των πιο κοινών πολυμορφισμών P251L και V220A με PCR-RFLP.

#### **4.1.2 Γενετικές βλάβες του *TNFRSF13B* γονιδίου σε ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες- Κλινικές συσχετίσεις**

Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν κατέδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ οποιασδήποτε γενετικής παραλλαγής του *TNFRSF13B* γονιδίου και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία μεταλλάξεων και πολυμορφισμών δε συσχετίστηκε με την εμφάνιση κάποιας συγκεκριμένης λοίμωξης, με την παρουσία σπληνομεγαλίας ή λεμφαδενοπάθειας κατά τη διάγνωση, με την ύπαρξη αυτοάνοσων εκδηλώσεων ή κοκκιωματώδους νόσου και κακοήθειας ( $p > 0,05$  σε όλες τις περιπτώσεις). Περαιτέρω ανάλυση στην ομάδα των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες συνολικά, αλλά και σε υποομάδες τους, δεν αποκάλυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ των βλαβών V220A, P251L, rs8072293, rs35062843, rs2274892, rs11652843 και rs11652811 με τον απόλυτο αριθμό των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους, των Β-κυττάρων, των NK-κυττάρων, των μονοκυττάρων και των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών στο περιφερικό τους αίμα κατά τη διάγνωση. Από την άλλη μεριά, η παρουσία του πολυμορφισμού 277S (rs11078355) φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με το ποσοστό και τον απόλυτο αριθμό των περιφερικών IgD+CD27+ Β-κυττάρων ( $r=0.591$ ,  $p=0.001$ ) κυρίως στους ασθενείς με COVID. Ακόμη, παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με IgA ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα των πολυμορφισμών P251L και rs2274892 συγκριτικά με τους ασθενείς με IgAD που διαγνώστηκαν τυχαία. Ωστόσο, ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός και στις 2 περιπτώσεις (5 και 7 ασθενείς, αντίστοιχα) με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή κάποια στατιστική ανάλυση.

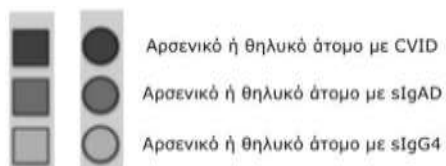
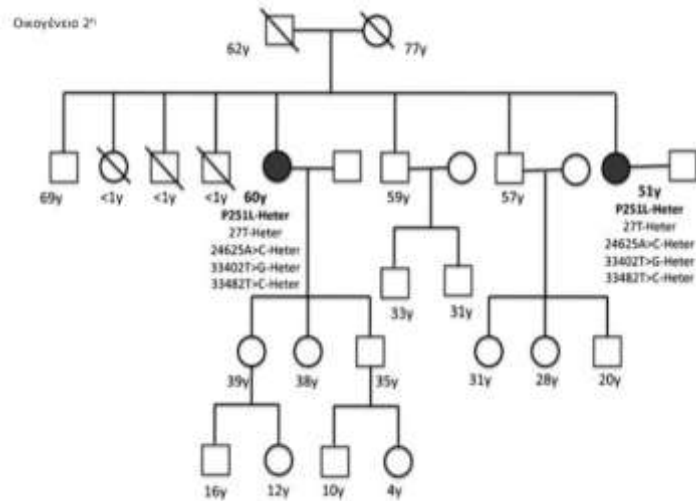
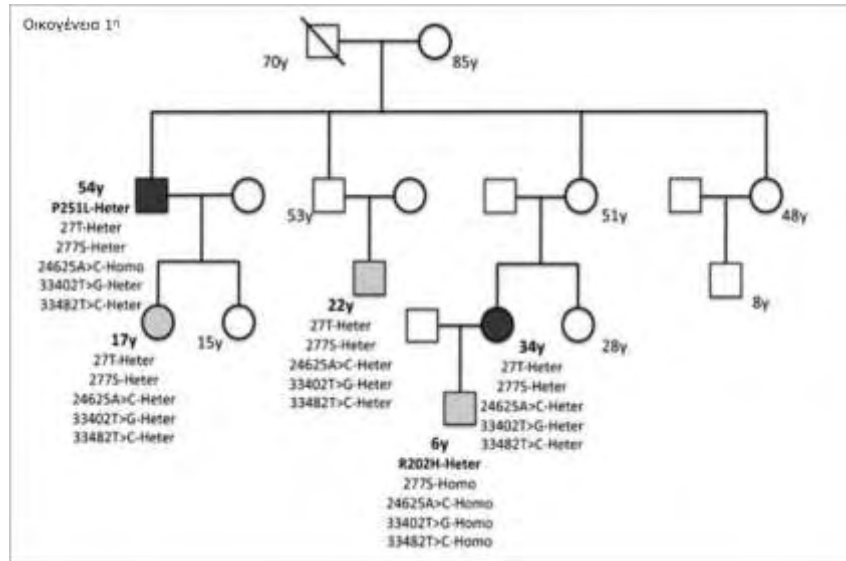
Επιπρόσθετα, τρεις ασθενείς με sIgG4D που έφεραν τις μεταλλάξεις A181E, R202H και p.L69TfsX12 αντίστοιχα, διαγνώστηκαν τυχαία. Το ιστορικό τους ήταν ελεύθερο από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και αυτοανοσία, παράλληλα κανένας από τους συγγενείς τους δεν είχε παρουσιάσει ανοσοανεπάρκεια στο παρελθόν. Αξίζει να αναφερθεί η περίπτωση ασθενούς που διαγνώστηκε με COVID 5 χρόνια μετά την έναρξη των πρώτων συμπτωμάτων. Κατά τη διάγνωση, παρουσίασε κοκκιωματώδη νόσο και σπληνομεγαλία και 2 χρόνια αργότερα ανέπτυξε λέμφωμα Hodgkin. Τα 2 του παιδιά, ηλικίας 22 και 14 χρονών αντίστοιχα, που έφεραν την ίδια μετάλλαξη δεν εμφάνιζαν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις στο ιστορικό τους, παρόλο που η μικρότερη είχε ελαφρά υπογαμμασφαιριναιμία (IgG: 808 mg/dl).

**Πίνακας 19: Συχνότητα εμφάνισης των λειτουργικών πολυμορφισμών στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες**

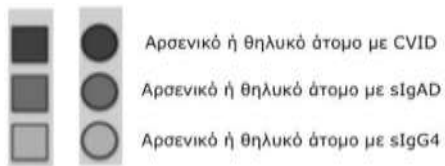
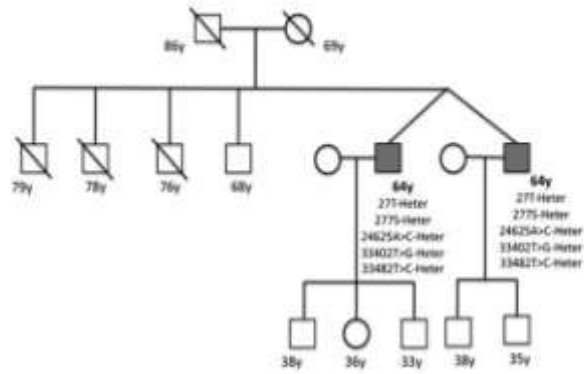
	Αριθμός	Λειτουργικοί πολυμορφισμοί				
		C104R (%)	A181E (%)	p.L69TfsX12 (%)	V220A (%)	P251L (%)
CVID	16	3,13	0	0	3,13	9,38
IgAD	16	0	0	0	0	18,75
sIgG4	11	0	0	4,55	4,55	9,09
THI	4	0	0	0	0	12,50
<b>Σύνολο</b>	<b>47</b>	<b>1,06</b>	<b>1,06</b>	<b>1,06</b>	<b>1,06</b>	<b>12,77</b>

**Πίνακας 20: Συχνότητα εμφάνισης των συνώνυμων πολυμορφισμών και των ιντρονικών βλαβών στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες**

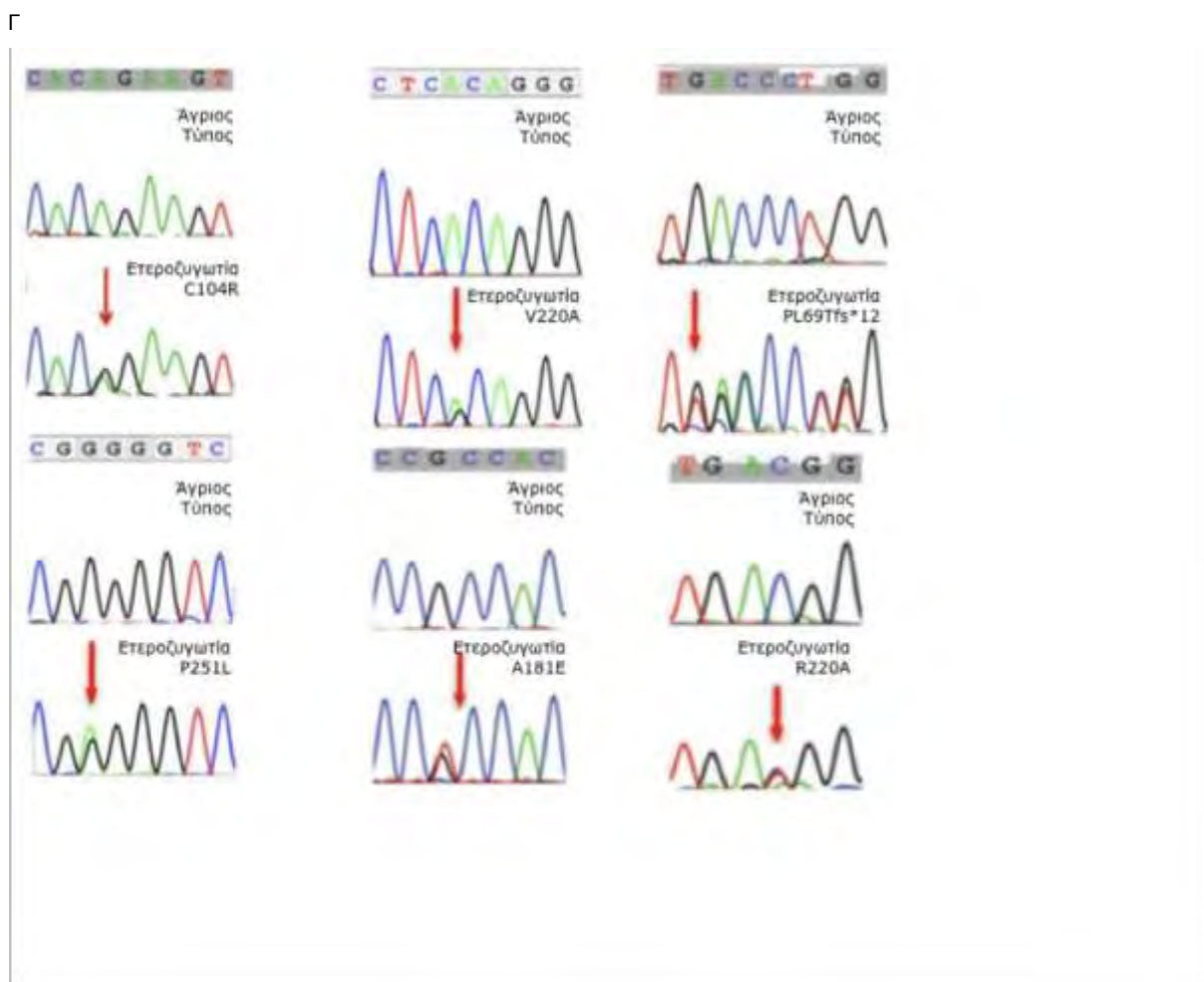
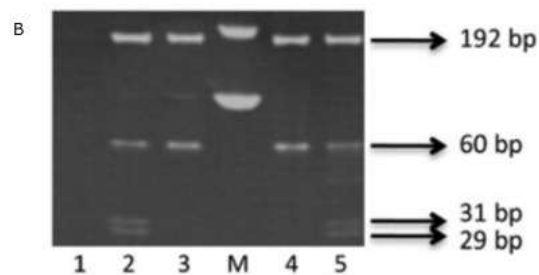
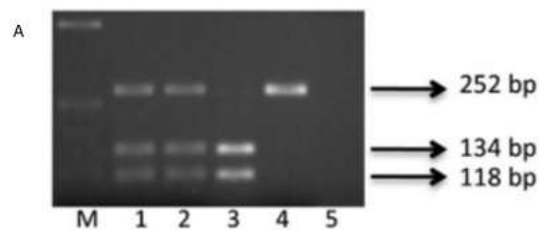
	Αριθμός	Συνώνυμοι πολυμορφισμοί			Ιντρονικές βλάβες		
		27T (%)	97P (%)	277S (%)	24625A>C (%)	33402T>G (%)	33482T>C (%)
CVID	16	65,63	0	31,25	43,75	40,63	37,50
IgAD	16	56,25	0	43,75	43,75	53,13	53,13
sIgG4	11	72,73	4,55	31,82	40,91	40,91	40,91
THI	4	75,00	0	50,00	50,00	25,00	25,00
<b>Σύνολο</b>	<b>47</b>	<b>64,89</b>	<b>1,06</b>	<b>37,23</b>	<b>43,62</b>	<b>43,62</b>	<b>42,55</b>



Οικογένεια 3\*



**Εικόνα 14: Γενεαλογικά δένδρα οικογενειών με ιστορικό αντισωματικών ανεπαρκειών**



**Εικόνα 15:** Α. δείγματα αγριού τύπου, ομόζυγα και ετερόζυγα για τη μετάλλαξη P251L

Β. δείγματα αγριού τύπου και ετερόζυγα για τη μετάλλαξη V220A

Γ. Παραδείγματα αλληλούχισης του γονιδίου TNFRSF13B

## 4.2 Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΧΛΛ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 94 ασθενείς με ΧΛΛ. Οι 41 ασθενείς (43,6%) έφεραν τον χαρακτηριστικό φαινότυπο της νόσου ( $CD5^+$ ,  $CD23^+$ ,  $FMC7^-$ ,  $CD20^-$ , χαμηλή ένταση φθορισμού του  $CD79b$ , απουσία επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης) και είχαν σκορ 5. Μεταξύ των υπόλοιπων ασθενών, οι 43 (45,8%) έφεραν σκορ 4 καθώς τα ΧΛΛ κύτταρά τους εξέφραζαν  $FMC7^+$  ή  $CD79b^-$  ή επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη, ενώ οι υπόλοιποι 10 (10,6%) έφεραν σκορ 3 ( $CD5^+$ ,  $CD23^+$  και  $FMC7^-$  ή χαμηλή ένταση φθορισμού του  $CD79b$  ή απουσία επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης). Επιπρόσθετα, τα ΧΛΛ κύτταρα ήταν θετικά για τους δείκτες  $CD27$  και  $IgD$ , επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες.<sup>148,149</sup> Σε 7 ασθενείς (7,5%) ανιχνεύθηκε μονοκλωνικό κλάσμα στον ορό, ενώ όλοι ήταν αρνητικοί για τον πολυμορφισμό  $MyD88-L265P$ .<sup>150</sup> Στον Πίνακα 20 φαίνονται τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Από τους ασθενείς, οι 20 απεβίωσαν εξαιτίας της επιδείνωσης της νόσου. Η μέση διάρκεια επιβίωσης ήταν 58,6 μήνες (3-158 μήνες). Η μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών και η σοβαρότητα της νόσου αποτέλεσαν παράγοντες κινδύνου και συσχετίστηκαν με την έκβασή της ( $p < 0,001$  και  $p = 0,024$  αντίστοιχα). Επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου ήταν η μονοκλωνική γαμμαπάθεια ( $p = 0,033$ ), η υπογαμμασφαιριναιμία (όπου οριζόταν με την  $IgG$  να είναι χαμηλότερη από τα 600 mg/dl,  $p = 0,020$ ), καθώς και η παρουσία λοιμώξεων ( $p = 0,020$ ) και ιδιαίτερα της αναπνευστικής οδού ( $p = 0,013$ ).

Σε όλους τους ασθενείς με ΧΛΛ μελετήθηκαν γνωστοί προγνωστικοί δείκτες της νόσου και συγκεκριμένα έγινε προσδιορισμός των υπερμεταλλάξεων της βαριάς αλύσου ( $IGHV$ ) και ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης  $CD38$  στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι 35 ασθενείς (37,6%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλύσου, ενώ 59 ασθενείς (62,8%) έφεραν μεταλλάξεις, θεωρώντας μεταλλαγμένο το γονίδιο όταν διαφέρει  $>2\%$  σε σύγκριση με το αντίστοιχο γονίδιο των κυττάρων της βλαστικής σειράς. Στην περίπτωση που θεωρούσαμε μεταλλαγμένο το γονίδιο όταν διαφέρει  $>3\%$  σε σύγκριση με το αντίστοιχο γονίδιο των κυττάρων της βλαστικής σειράς, οι ασθενείς με αμετάλλακτο γονίδιο ήταν 39 (42,5%), ενώ εκείνοι με μεταλλαγμένο ήταν 55 (57,5%). Οι υπότυποι του  $IGHV$  γονιδίου όλων των ασθενών παρουσιάζονται στην εικόνα 16. Οι πιο συχνοί υπότυποι είναι οι:  $IGHV1-69$ ,  $IGHV1-2$ ,  $IGHV3-23$ ,  $IGHV3-30$ ,  $IGHV3-33$  και  $IGHV4-34$  (εικόνα 17). Στην ομάδα των ασθενών που δεν είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο  $IGHV$ , οι 16 ασθενείς (41%) είχαν  $IGHV1$  με τον  $IGHV1-69$  να είναι ο πιο κοινός υπότυπος. Συγκεκριμένα, ο  $IGHV1-69$  υπότυπος ευρισκόταν στο 30,8% των ασθενών που δεν είχαν μεταλλάξεις στο  $IGHV$  και στο 75% των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις και με  $IGHV1$  τύπο. Στην ομάδα των ασθενών που είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο  $IGHV$ , μόνο οι 14 (25,5%) έφεραν τον  $IGHV1$  τύπο, ενώ οι 33 (60,1%) έφεραν  $IGHV3$  τύπο. Οι ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις στο

*IGHV* γονίδιο είχαν χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις, ειδικά όταν θεωρούνταν μεταλλαγμένο το γονίδιο που ήταν >3% διαφορετικό από το αντίστοιχο γονίδιο των κυττάρων της βλαστικής σειράς ( $p=0,022$ ).

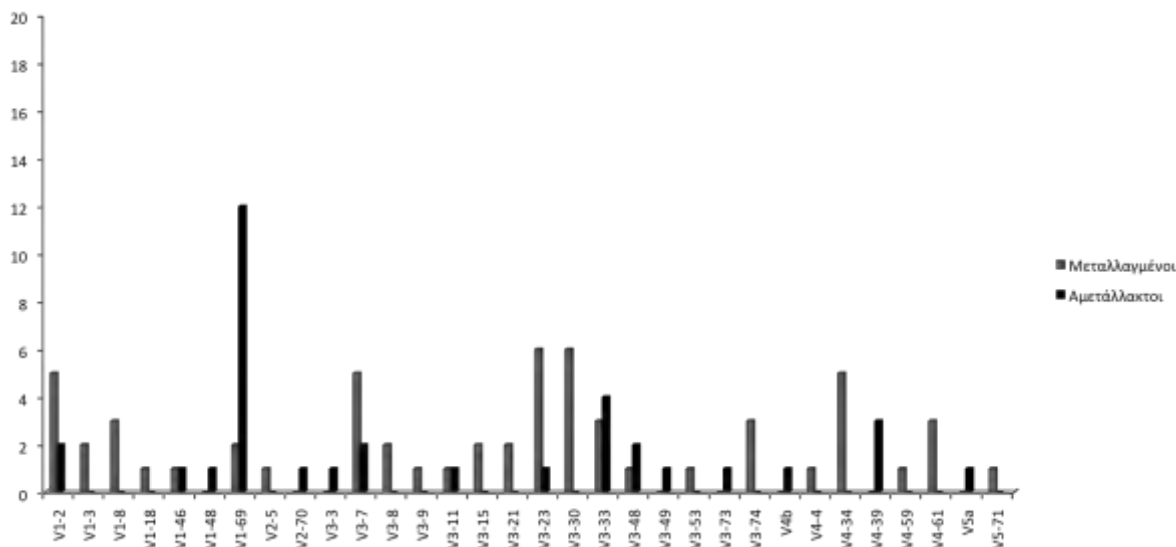
Η έκφραση της πρωτεΐνης CD38 στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα εμφάνιζε μεγάλη διακύμανση (0-82,2%). 27 ασθενείς (28,7%) εξέφραζαν CD38 σε πάνω από το 10% των κυττάρων τους, 21 ασθενείς (22,3%) σε πάνω από το 20% των κυττάρων τους και 12 (12,8%) σε πάνω από το 30%. Παρόλα αυτά, η στατιστική ανάλυση στο δείγμα των ασθενών μας δεν κατέδειξε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του CD38 και στην πρόγνωση της νόσου σε καμία περίπτωση.

Τέλος, τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των 30 ασθενών με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα της 1<sup>ης</sup> ομάδας ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη εμφανίζονται στον πίνακα 21, ενώ στον πίνακα 22 αναφέρονται τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των 78 φυσιολογικών μαρτύρων της 2<sup>ης</sup> ομάδας ελέγχου.

**Πίνακας 20: Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΧΛΛ**

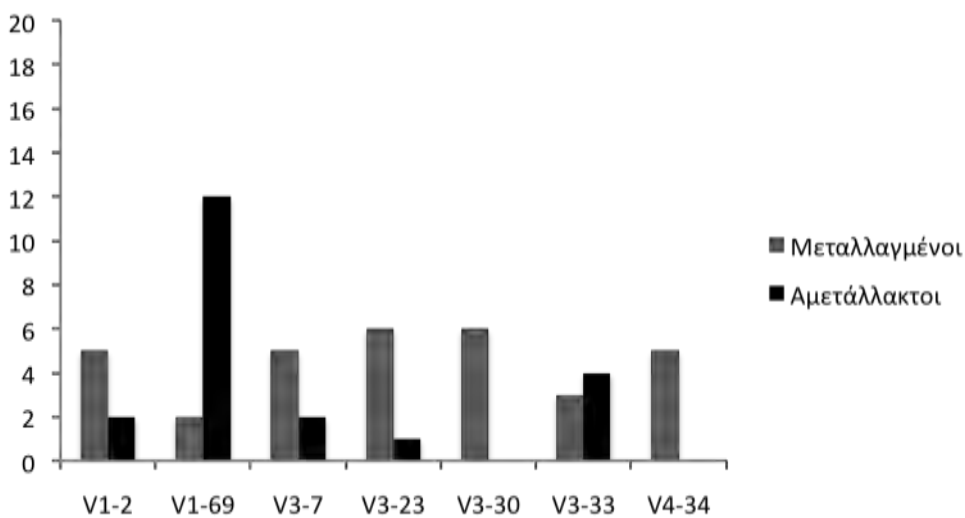
	<b>Σε επανέλεγχο</b>			
	<b>Συνολικά</b>	<b>Στη διάγνωση</b>	<b>Χωρίς θεραπεία</b>	<b>Κατά την υποτροπή</b>
CD5 (%) Median (IQR)	97,5 (86,8-99,4)	95,6 (83,3-98,9)	98,6 (97,1-99,7)	99,3 (82,4 -99,7)
CD23 (%) Median (IQR)	91,1 (81,8-96,5)	92,1 (84,4-97,0)	93,8 (84,1-97,5)	84,6 (81,5-91,0)
CD20 (%) Median (IQR)	92,0 (83,8-97,5)	93,0 (84,4-98,3)	92,5 (85,3- 97,9)	91,0 (75,4-95,9)
CD79b (%) Median (IQR)	92,4 (82,7-98,8)	92,7 (80,8-98,2)	96,4 (84,0-99,9)	88,5 (81,8-98,8)
CD43 (%) Median (IQR)	93,3 (84,6-97,1)	92,8 (81,4-97,0)	94,2 (86,8-97,6)	94,7 (80,6-97,1)
FMC7 (%) Median (IQR)	42,7 (28,9-59,4)	44,5 (30,7-61,2)	44,2 (30,8-61,6)	35,8 (15,0-58,9)
CD38 (%) Median (IQR)	1,8 (0,6-15,5)	1,4 (0,5-8,6)	1,7 (0,7-19,1)	12,0 (0,2-27,1)
CD11c (%) Median (IQR)	34,6 (17,4-52,0)	34,7 (17,4-50,7)	37,1 (20,1-62,1)	28,6 (11,9 -55,1)
CD10 (%) Median (IQR)	10,0 (4,8-17,7)	8,7 (4,7-16,4)	11,0 (5,3-19,3)	11,3 (3,8-18,7)
κ κλωνικότητα (αρ., %)	61/65,0	36/66,6	15/71,4	10/52,6
λ κλωνικότητα (αρ., %)	33/35,0	18/33,3	6/28,6	9/47,4





**Εικόνα 16: Οι υπότυποι του IGHV γονιδίου των ασθενών με ΧΛΛ**

Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται οι υπότυποι που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλυσού, ενώ με μαύρο χρώμα οι υπότυποι που δεν έφεραν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο.



**Εικόνα 17: Οι πιο συχνοί υπότυποι του IGHV γονιδίου των ασθενών με ΧΛΛ**

Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται οι υπότυποι που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλυσού, ενώ με μαύρο χρώμα οι υπότυποι που δεν έφεραν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο.

**Πίνακας 21: Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με NHL**

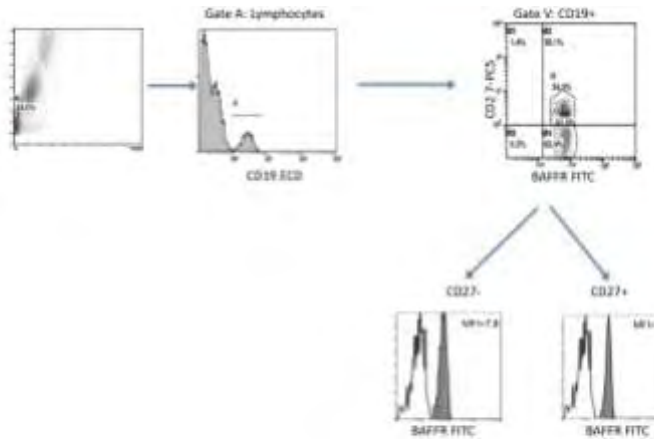
CD5 (%) Median (IQR)	25,9 (6,3-45,2)
CD23 (%) Median (IQR)	18,0 (5,0-36,7)
CD20 (%) Median (IQR)	99,9 (99,1-100,0)
CD79b (%) Median (IQR)	99,8 (98,0-100,0)
CD43 (%) Median (IQR)	2,7 (0,95-5,3)
FMC7 (%) Median (IQR)	87,0 (25,0-98,7)
CD38 (%) Median (IQR)	5,0 (0,9-15,3)
CD11c (%) Median (IQR)	12,3 (2,2-38,2)
CD10 (%) Median (IQR)	9,3 (2,9-15,5)
κ κλωνικότητα, αρ. (%)	22 (73,3)
λ κλωνικότητα, αρ. (%)	8 (26,6)

## Πίνακας 22: Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών μαρτύρων

Λευκά αιμοσφαίρια ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	6,60/5,38-8,23
Ουδετερόφιλα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	3,70/2,87-4,99
Μονοκύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	0,39/0,28-0,49
Λεμφοκύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	2,34/1,88-2,92
T-κύτταρα (%) (Median, IQR)	68,30/61,22-75,97
T-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	1,53/1,25-1,96
T4-κύτταρα (%) (Median, IQR)	65,85/58,45-71,45
T4-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	1,00/0,81-1,26
T8-κύτταρα (%) (Median, IQR)	31,30/25,67-37,47
T8-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	0,48/0,35-0,64
Λόγος T4/T8 (Median, IQR)	1,20/0,91-2,00
B-κύτταρα (%) (Median, IQR)	9,60/7,30-12,37
B-κύτταρα ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	0,22/0,16-0,32
IgD <sup>+</sup> /CD27 <sup>-</sup> (%) (Median, IQR)	61,85/50,90-76,45
IgD <sup>+</sup> /CD27 <sup>-</sup> ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	0,12/0,09-0,19
IgD <sup>+</sup> /CD27 <sup>+</sup> (%) (Median, IQR)	9,10/4,82-14,12
IgD <sup>+</sup> /CD27 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/L$ ) (Median, IQR)	0,02/0,01-0,04
IgD <sup>-</sup> /CD27 <sup>+</sup> (%) (Median, IQR)	20,20/12,60-30,48
IgD <sup>-</sup> /CD27 <sup>+</sup> (Median, IQR)	0,04/0,02-0,07
BAFFR (%) (Median, IQR)	99,90/99,70-100,00
BAFFR-MFI (Median, IQR)	9,80/6,70-14,50

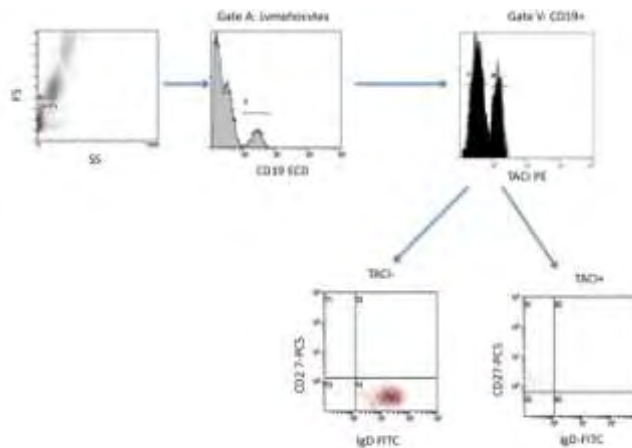
### 4.3 Έκφραση των πρωτεϊνών BAFFR και TACI στους διάφορους υποπληθυσμούς των φυσιολογικών B-κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Κατά τη μελέτη των πρωτεϊνών BAFFR και TACI, κρίθηκε αρχικά σημαντικό να προσδιοριστεί η έκφρασή τους στους διάφορους υποπληθυσμούς των φυσιολογικών B-κυττάρων. Η κυτταρομετρική ανάλυση κατέδειξε ότι η πρωτεΐνη BAFFR εκφράζεται σε όλους τους υποπληθυσμούς των B-κυττάρων και μάλιστα με ίδιο περίπου βαθμό έντασης φθορισμού (Εικόνα 18). Αντίθετα, η πρωτεΐνη TACI εκφράζεται στα μνημονικά B-κύτταρα, μιας και η έκφρασή της συνάδει με την έκφραση του CD27 μορίου το οποίο αποτελεί δείκτη ωρίμανσης των B-κυττάρων, αλλά απουσιάζει από τα παρθένα B-κύτταρα (IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>) (Εικόνα 19).



**Εικόνα 18: Η έκφραση BAFFR στους υποπληθυσμούς των Β-κυττάρων**

Τα παρθένα Β-κύτταρα (CD19+/CD27-) και τα ώριμα Β-κύτταρα (CD19+/CD27+) εκφράζουν την πρωτεΐνη BAFFR με παρόμοια ένταση φθορισμού.



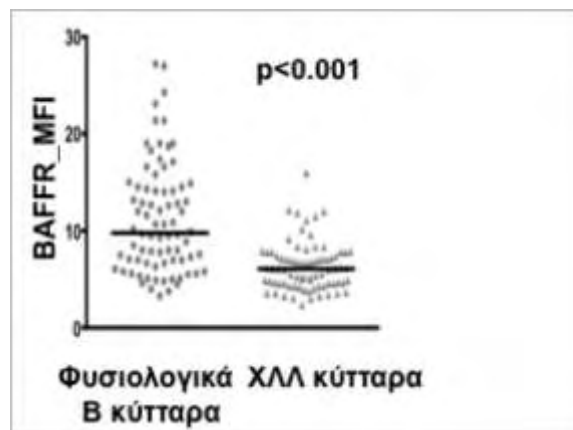
**Εικόνα 19: Η έκφραση TACI στους υποπληθυσμούς των Β-κυττάρων**

Τα Β-κύτταρα (CD19+) που εκφράζουν την πρωτεΐνη TACI (TACI+) είναι τα μνημονικά Β-κύτταρα (CD27+), ενώ τα Β-κύτταρα (CD19+) που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη TACI (TACI-) είναι παρθένα (IgD+).

#### **4.4 Έκφραση του *TNFRSF13C* γονιδίου σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στα φυσιολογικά και στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα**

Η πρωτεΐνη BAFFR ελέγχθηκε σε 78 ασθενείς με ΒΧΜ, σε 30 ασθενείς με ΝΗΛ και σε 78 φυσιολογικούς μάρτυρες, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Ένα από τα πρώτα ερωτήματα που εξετάστηκαν ήταν αν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα της έκφρασης

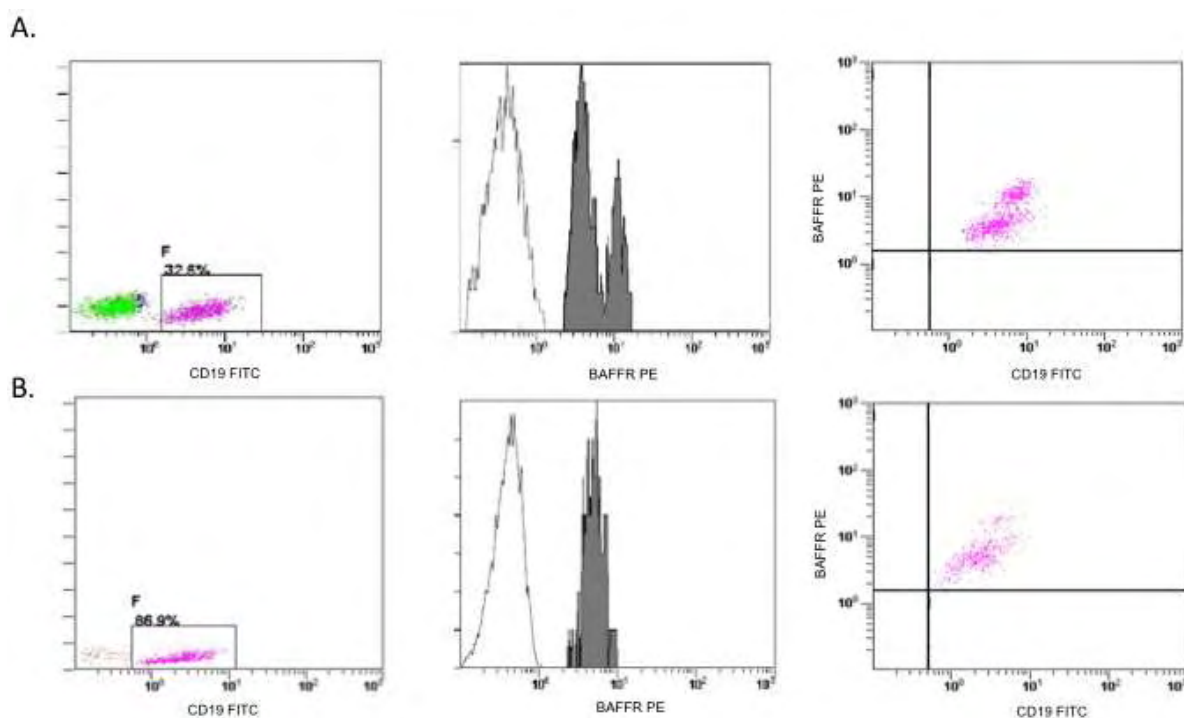
μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Η κυτταρομετρική ανάλυση κατέδειξε ότι παρόλο που η πρωτεΐνη BAFFR εκφράζεται στο σύνολο των φυσιολογικών και των νεοπλασματικών κυττάρων, η ένταση του φθορισμού της είναι μικρότερη στα ΧΛΛ λεμφοκύτταρα (Median MFI: 6,1 IQR 4,6-7,5) συγκριτικά με τα φυσιολογικά (Median MFI: 9,8, IQR 6,7-14,5), και αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική,  $p < 0,001$ . Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού της είναι χαμηλή και στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με NHL (Median MFI: 5,8 IQR 4,2-8,6) συγκριτικά με τα φυσιολογικά Β-κύτταρα (Median MFI: 9,8, IQR 6,7-14,5), με τη διαφορά να είναι επίσης στατιστικά σημαντική,  $p < 0,001$ . Επιπρόσθετα, η ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR στα κύτταρα της ΧΛΛ δεν αλλάζει με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 20).



**Εικόνα 20: Έκφραση της έντασης φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR σε ΧΛΛ κύτταρα και φυσιολογικά Β-κύτταρα**

Τα φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR συγκριτικά με τα ΧΛΛ κύτταρα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση μιας ασθενούς με ΒΧΛΛ, στο δείγμα περιφερικού αίματος της οποίας ανιχνεύθηκαν κατά την ανοσοφαινοτυπική μελέτη δύο κλώνοι Β-κυττάρων. Ο ένας αποτελούνταν από τα νεοπλασματικά κύτταρα της νόσου και όπως φαίνεται στην εικόνα, παρουσίαζε χαμηλή ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR ενώ ο άλλος κλώνος αποτελούνταν από φυσιολογικά Β-κύτταρα με υψηλότερη ένταση φθορισμού. Κατά την υποτροπή της νόσου, ένα χρόνο αργότερα, μόνο ο πληθυσμός με τη χαμηλή ένταση ανιχνεύθηκε κυτταρομετρικά επιβεβαιώνοντας για μία ακόμη φορά ότι τα νεοπλασματικά Β-κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά Β-κύτταρα ως προς την ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR. Σημαντικό είναι ακόμη το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη ασθενή, η έκφραση της πρωτεΐνης CD20 ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο με την πρωτεΐνη BAFFR. Ο παθολογικός κλώνος που εκφράζει BAFFR χαμηλής έντασης φθορισμού, παρουσιάζει και CD20 χαμηλής έντασης φθορισμού, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στον κλώνο των φυσιολογικών Β-κυττάρων (Εικόνα 21).



### Εικόνα 21: Έκφραση BAFFR σε ασθενή με ΧΛΛ

A. Παρουσία 2 κλώνων B-κυττάρων, ενός παθολογικού και ενός φυσιολογικού

B. Παρουσία μόνο του παθολογικού κλώνου κατά την υποτροπή του κλώνου

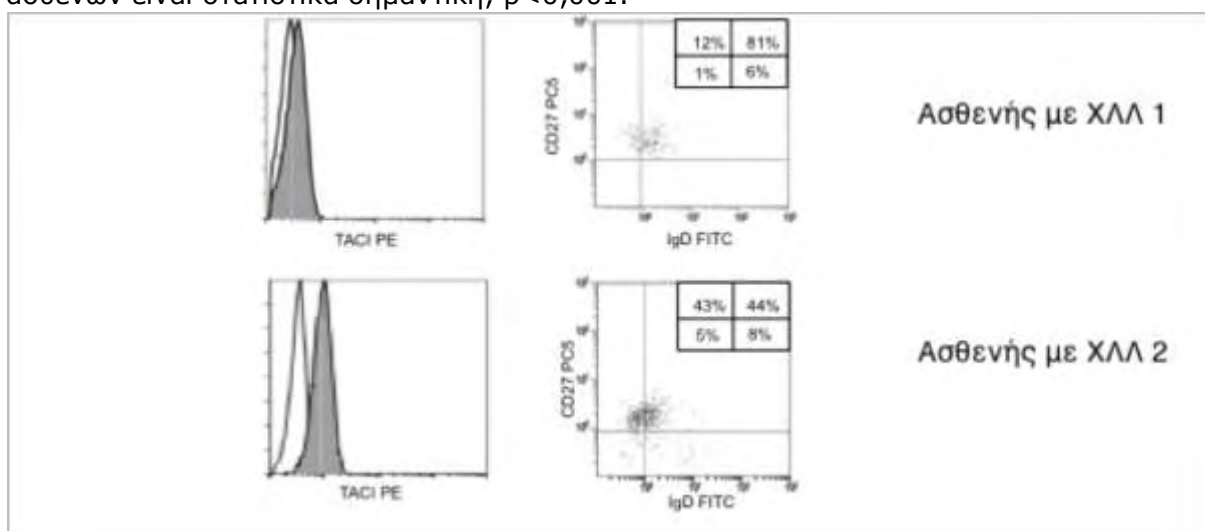
Το γονίδιο *TNFRSF13C* σε μεταγραφικό επίπεδο εκφράζεται και στα φυσιολογικά Β αλλά και στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα. Το γεγονός μάλιστα ότι δεν ανιχνεύθηκε μικρότερη έκφραση στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα μαρτυρά ότι η μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης που παρατηρείται σε αυτά είναι μεταμεταγραφική.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε αν η πρωτεΐνη BAFFR στα ΧΛΛ κύτταρα σχετίζεται με τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά της νόσου. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης BAFFR σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης CD20 ( $r=0,412$ ,  $p<0,001$ ) καθώς και με την ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης CD20 ( $r=0,373$ ,  $p=0,001$ ), την έκφραση της πρωτεΐνης FMC7 ( $r=0,285$ ,  $p=0,011$ ) και την ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης CD79b ( $r=0,315$ ,  $p=0,005$ ). Στη συνέχεια, αναλύοντας τους ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες που φάνηκαν να σχετίζονται με την BAFFR έκφραση με πολλαπλή παλινδρόμηση, αποδείχθηκε ότι μόνο η ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης CD79b την επηρεάζει ( $t=2,304$ ,  $p=0,024$ ). Από την άλλη μεριά, περαιτέρω στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η BAFFR έκφραση δε σχετίζεται με διάφορες άλλες παραμέτρους, όπως την ηλικία, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και των Β-κυττάρων, τη διήθηση από

νεοπλασματικά Β-κύτταρα, την επιβίωση, το στάδιο της νόσου, την παρουσία αυτοανοσίας, υπογαμμασφαιριναιμίας, μονοκλωνικής γαμμαπάθειας και τον κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων ( $p > 0,05$  σε όλες τις περιπτώσεις).

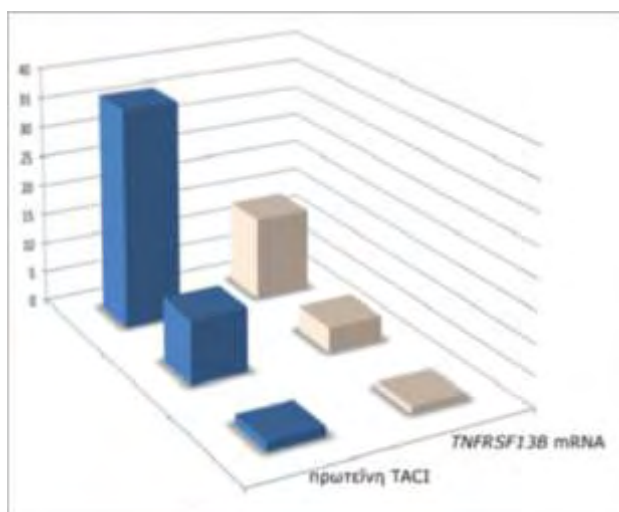
#### 4.5 Έκφραση του *TNFRSF13B* γονιδίου σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα

Βάσει των αποτελεσμάτων μας και επιβεβαιώνοντας τη βιβλιογραφία, τα ΧΛΛ κύτταρα εκφράζουν δείκτες ωρίμανσης, μεταξύ των οποίων και το CD27 μόριο, ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή της απουσίας υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών. Παρά το γεγονός όμως ότι η CD27 έκφραση φαίνεται ότι στα φυσιολογικά Β-κύτταρα συνάδει με την έκφραση του *TNFRSF13B*, η πλειοψηφία των ασθενών με ΧΛΛ παρουσίασε χαμηλή έκφραση του γονιδίου *TNFRSF13B* τόσο σε επίπεδο μεταγραφικό, όσο και σε πρωτεϊνικό (Εικόνα 22). Πιο συγκεκριμένα, η διάμεση έκφραση TACI ήταν 7,4% (IQR 2,1-20,8) και κυμαινόταν από 0,1% των ΧΛΛ κυττάρων (χαμηλότερη έκφραση) μέχρι 57,8% (υψηλότερη έκφραση). Η πλειοψηφία των ασθενών (69, 75%) παρουσίασε πολύ χαμηλή έκφραση TACI, ενώ μόνο σε 14 ασθενείς παρουσιάστηκε έκφραση TACI υψηλότερη από 30%. Το γεγονός ότι η χαμηλή έκφραση παρατηρήθηκε τόσο σε επίπεδο μεταγραφικό, όσο και σε πρωτεϊνικό αποδεικνύει ότι δεν πρόκειται για μεταμεταγραφική τροποποίηση (Εικόνα 23). Η μείωση της πρωτεΐνης TACI πάντως, φαίνεται να είναι χαρακτηριστική της ΧΛΛ, μιας και δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου των NHL, όπου η διάμεση έκφραση TACI ήταν 36,5% (IQR 9,7-61,8). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η διαφορά στην έκφραση TACI μεταξύ των 2 ομάδων ασθενών είναι στατιστικά σημαντική,  $p < 0,001$ .



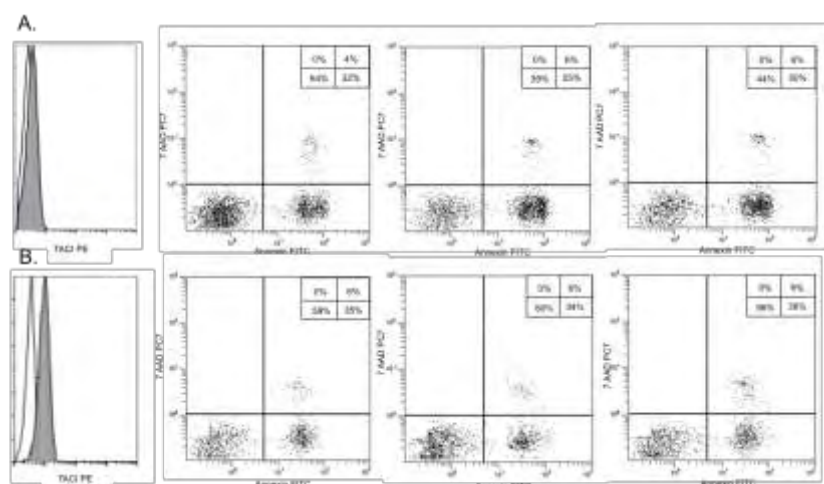
**Εικόνα 22: Έκφραση των μορίων TACI, IgD και CD27 σε ασθενείς με ΧΛΛ**

Ανεξαρτήτως του επιπέδου έκφρασης του πρωτεϊνικού υποδοχέα TACI, τα ΧΛΛ κύτταρα εκφράζουν τα μόρια IgD και TACI



**Εικόνα 23: Έκφραση του γονιδίου TNFRSF13B σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο**

Για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω την επίδραση της πρωτεΐνης TACI στην επιβίωση των ΧΛΛ κυττάρων, καλλιεργήσαμε κύτταρα ασθενών με χαμηλή έκφραση TACI και κύτταρα ασθενών με υψηλή έκφραση TACI, παρουσία των προσδετών της, BAFF και APRIL. Η δοκιμασία αννεξίνης που ακολούθησε, έδειξε ότι στις περιπτώσεις που τα ΧΛΛ κύτταρα εξέφραζαν TACI σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%, επιβίωσαν περισσότερο συγκριτικά με τα ΧΛΛ κύτταρα ασθενών που δεν εξέφραζαν TACI. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TACI με τους προσδέτες της, BAFF και APRIL, προστατεύει τα ΧΛΛ κύτταρα από την απόπτωση *in vitro* (Εικόνα 24).



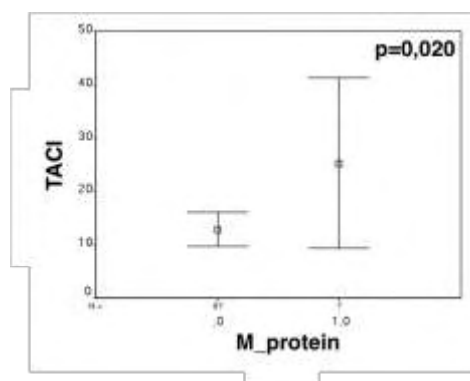
**Εικόνα 24: Τεστ αννεξίνης σε ΧΛΛ κύτταρα**

A. Τα ΧΛΛ κύτταρα με χαμηλή έκφραση TACI αποίπνουν μετά από τη διέγερση με τους προσδέτες του BAFF και APRIL.

B. Τα ΧΛΛ κύτταρα με υψηλή έκφραση TACI προστατεύονται από την απόπτωση μετά από τη διέγερση με τους προσδέτες του BAFF και APRIL.



Στη συνέχεια, εξετάσαμε αν η πρωτεΐνη TACI στα ΧΛΛ κύτταρα σχετίζεται με τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά της νόσου. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η πρωτεΐνη TACI σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης CD11c και την παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι όταν η έκφραση TACI είναι μεγαλύτερη από 20%, τα ΧΛΛ κύτταρα αποκλείεται να έχουν μεγάλη έκφραση CD11c (σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%) ( $\chi^2$ ,  $p=0,008$ ), ενώ οι ασθενείς με μονοκλωνική γαμμαπάθεια έχουν υψηλότερη έκφραση TACI συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν έχουν μονοκλωνικό κλάσμα (μέση τιμή $\pm$ SD: 26,2 $\pm$ 17,3 vs 12,6 $\pm$ 14,7,  $p=0,020$ ; το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και με ROC curve ανάλυση: AUC=0,765, 95% CI: 0,626-0,964) (Εικόνα 25). Περαιτέρω ανάλυση με πολλαπλή παλινδρόμηση αποκάλυψε ότι ασθενείς που εκφράζουν την πρωτεΐνη TACI σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 10% των ΧΛΛ κυττάρων τους, έχουν 6,9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν μονοκλωνικό κλάσμα (OR: 0,866, 95%CI:1,211-38,925,  $p=0.030$ ). Τέλος, καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ της TACI έκφρασης με την παρουσία αυτοανοσίας, υπογαμμασφαιριναιμίας, τον κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων και την επιβίωση των ασθενών ( $p>0,05$  σε όλες τις περιπτώσεις).

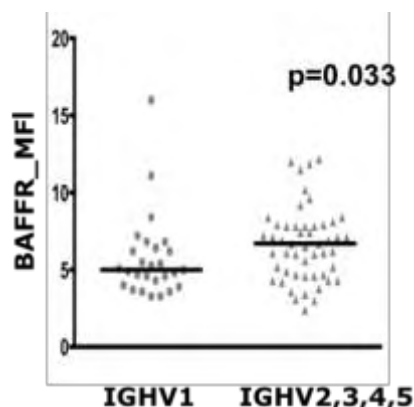


**Εικόνα 25: Η πρωτεΐνη TACI σχετίζεται με την εμφάνιση μονοκλωνικού κλάσματος**

#### **4.6 Συσχέτιση των πρωτεϊνών TACI και BAFFR με την πρωτεΐνη CD38 και το επίπεδο υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλυσού**

Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε κάποια συσχέτιση των πρωτεϊνών TACI και BAFFR με τους προγνωστικούς δείκτες της ΧΛΛ, όπως η πρωτεΐνη CD38 και το επίπεδο υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλυσού, ( $p>0,05$  σε όλες τις περιπτώσεις).<sup>151</sup> Παρ' όλα αυτά, τα ΧΛΛ κύτταρα που είχαν τον υπότυπο IgHV1, παρουσίαζαν μικρότερη ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR (median, IQR: 5,0, 4,2-6,5) όταν συγκρίθηκαν με τους υπόλοιπους υποτύπους (median, IQR: 6,5, 4,6-7,8) με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ( $p= 0,030$ ), (Εικόνα 26). Παρομοίως, ο υπότυπος IgHV1 φάνηκε να συνδέεται και με μια τάση μείωσης της πρωτεΐνης TACI (median, IQR: 3.4, 2.1-14.3) σε σχέση με τους υπόλοιπους (median, IQR: 10.5, 2.2-21.9), χωρίς όμως αυτή η διαφορά να

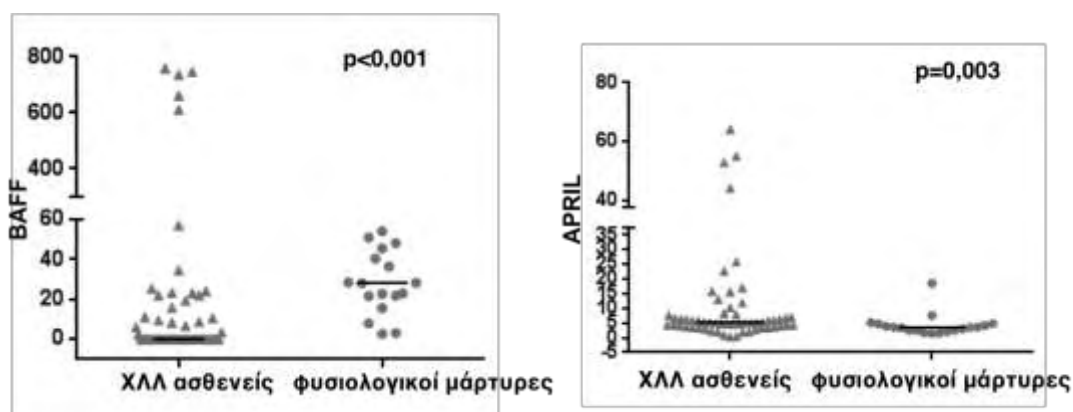
είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,06$ ).



**Εικόνα 26: Διάμεση ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR σε ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με τον υπότυπο της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών**

#### **4.7 Προσδιορισμός των προσδετών BAFF και APRIL στον ορό ασθενών με ΧΛΛ και φυσιολογικών μαρτύρων.**

Οι ασθενείς με ΧΛΛ είχαν μειωμένα επίπεδα BAFF και αυξημένα επίπεδα APRIL στον ορό συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Πιο συγκεκριμένα, η διάμεση συγκέντρωση BAFF και APRIL στον ορό των ασθενών ήταν 0 pg/mL (IQR: 0-20,7) και 5,2 ng/mL (IQR: 3,7-7,8) αντίστοιχα, έναντι 28,3 pg/mL (IQR: 21,6-48,1) και 3,5 ng/mL (IQR: 2,4-4,7) στον ορό των φυσιολογικών μαρτύρων  $p<0,001$  και  $p=0,003$  αντίστοιχα. Σε 4 ασθενείς ανευρέθησαν υψηλά επίπεδα APRIL και σε 5 ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα BAFF. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι 3 από τους 5 ασθενείς που εμφάνισαν υψηλά επίπεδα BAFF, παρουσίασαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις με παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό (Εικόνα 27). Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα του APRIL στον ορό των ασθενών σχετίζονται θετικά με τον αριθμό των ΧΛΛ κυττάρων ( $r=0,305$ ,  $p=0,023$ ) και τη διήθηση της νόσου ( $r=0,312$ ,  $p=0,019$ ) και αρνητικά με τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών IgA ( $r=-0,390$ ,  $p=0,004$ ) και IgG ( $r=-0,284$ ,  $p=0,037$ ), αλλά και την έκφραση του μορίου FMC7 ( $r=0,303$ ,  $p=0,023$ ).



**Εικόνα 27: Διάμεση τιμή BAFF και APRIL σε ασθενείς με ΧΛΛ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες**

#### **4.8 Προσδιορισμός των πολυμορφισμών *TNFRSF13B-P251L*, *TNFRSF13B-V220A*, *TNFRSF13C-P21R* και *TNFRSF13C-H159Y* και ελλείψεων του *ICOS* στους ασθενείς με ΧΛΛ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες**

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συχνότητα γενετικών βλαβών-παραλλαγών των γονιδίων *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* και *ICOS* σε 90 ασθενείς με ΧΛΛ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Στον Πίνακα 23, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά η γονοτυπική συχνότητα και η συχνότητα αλληλίου κάθε παραλλαγής που ελέγχθηκε, το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (*p* value) και ο λόγος πιθανοτήτων (*odds ratio*, OR). Να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αμφιβολία ως προς το αποτέλεσμα, η αντίδραση επαναλήφθηκε. Επίσης, επανεξετάστηκε τυφλά περίπου το 10% των δειγμάτων της μελέτης, ούτως ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας.

Συγκεκριμένα, 8 ασθενείς με ΧΛΛ ήταν ετερόζυγοι και 1 ασθενής ομόζυγος για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13B-V220A*, 27 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι και 2 ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13B-P251L*, 10 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C-P21R* και 2 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C-H159Y*. Αντίστοιχα, στην ομάδα των υγιών 13 ήταν ετερόζυγοι και 1 ομόζυγος για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13B-V220A*, 48 ήταν ετερόζυγοι και 7 ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13B-P251L*, 35 ήταν ετερόζυγοι και 1 ομόζυγος για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C-P21R* και τέλος 8 ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό *TNFRSF13C-H159Y*.

Κατά τη μοριακή μελέτη του γονιδίου *ICOS*, ελέγχθησαν συνολικά 58 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ. Όλα τα δείγματα που ελέγχθησαν ήταν αρνητικά ως προς την ύπαρξη κάποιας ομόζυγης ή ετερόζυγης έλλειψης. Δεδομένης λοιπόν της εξαιρετικά σπάνιας συχνότητας της συγκεκριμένης βλάβης, αλλά και της έλλειψης γενικότερα θετικών δειγμάτων στον ευρύτερο θεσσαλικό πληθυσμό, η μελέτη ανίχνευσης των ελλείψεων *ICOS* δε συνεχίστηκε περαιτέρω. Όλες οι παραλλαγές που εξετάστηκαν ήταν σε ισορροπία

Hardy-Weinberg, όπως φαίνεται στον Πίνακα 24. Η τιμή  $p$  value < 0,05 υποδηλώνει σημαντική απόκλιση από τις παρατηρούμενες γενοτυπικές συχνότητες της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Με την  $\chi^2$  ανάλυση, έγινε σύγκριση της συχνότητας των παραλλαγών μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και μαρτύρων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 23.

**Πίνακας 23**

<b>Γενετική παραλλαγή</b>			<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b>TNFRSF13B-V220A</b>				
	<b>Ασθενείς n=90</b>	<b>Μάρτυρες n=176</b>		
<b>Γονότυπος, n</b>			0,574	1,283 (0,590-2,788)
A/A Wt	81	162		
A/G Het	8	13		
G/G Hom	1	1		
<b>Αλληλίο A</b>	168	337		
<b>Αλληλίο G</b>	10	15		
<b>TNFRSF13B-P251L</b>				
	<b>Ασθενείς n=90</b>	<b>Μάρτυρες n=178</b>	0,825	0,987 (0,618-1,577)
<b>Γονότυπος, n</b>				
G/G Wt	61	123		
G/A Het	27	48		
A/A Hom	2	7		
<b>Αλληλίο G</b>	149	294		
<b>Αλληλίο A</b>	31	62		
<b>TNFRSF13C-P21R</b>				
	<b>Ασθενείς n=90</b>	<b>Μάρτυρες n=315</b>	0,933	0,942 (0,456-1,944)
<b>Γονότυπος, n</b>				
G/G Wt	80	279		
G/C Het	10	35		
C/C Hom	0	1		
<b>Αλληλίο G</b>	170	593		
<b>Αλληλίο C</b>	10	37		
<b>TNFRSF13C-H159Y</b>				
	<b>Ασθενείς n=90</b>	<b>Μάρτυρες n=315</b>	1	0,872 (0,182-4,182)
<b>Γονότυπος, n</b>				
T/T Wt	88	307		

T/C Het	2	8
C/C Hom	0	0
Αλληλίο T	178	622
Αλληλίο C	2	8

#### Πίνακας 24

Παραλλαγή	Γονίδιο	Θέση	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου		Ισορροπία Hardy-Weinberg	
			Μάρτυρες	Ασθενείς	Μάρτυρες	Ασθενείς
V220A	TNFRSF13B	Εξώνιο 5	0,04	0,05	0,2087	0,1468
P251L	TNFRSF13B	Εξώνιο 5	0,17	0,17	0,4041	0,6206
P21R	TNFRSF13C	Εξώνιο 1	0,05	0,05	0,9297	0,5768
H159Y	TNFRSF13C	Εξώνιο 3	0,01	0,01	0,8194	0,9151

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

---

Στη μελέτη αυτή, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ερευνήθηκαν οι γενετικές βλάβες του ανοσογονιδίου *TNFRSF13B* σε Έλληνες ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός ασθενών με λεμφοπαραγωγά σύνδρομα έχουν στο ιστορικό τους ευαισθησία σε λοιμώξεις από διάφορα παθογόνα, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των ανοσογονιδίων *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* και *ICOS* τα οποία έχουν συσχετιστεί με τις αντισωματικές ανεπάρκειες, σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης, οι Έλληνες ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες φέρουν αρκετές από τις ήδη γνωστές γενετικές βλάβες του γονιδίου *TNFRSF13B*. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα εμφάνισης των βλαβών αυτών σε ασθενείς με CVID είναι συμβατή με εκείνη που αναφέρεται σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς και αγγίζει το 6,25% (1 στους 16 ασθενείς ήταν φορέας της). Σχετικά με τους υπόλοιπους τύπους αντισωματικών ανεπαρκειών, δεν ανιχνεύθηκαν ιδιαίτερα γενετικές βλάβες του γονιδίου *TNFRSF13B* σε ασθενείς με sIgAD, ούτε σε ασθενείς με THI, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των βλαβών ήταν ιδιαίτερα υψηλή σε ασθενείς με sIgG4D, όπου άγγιζε το 18,18%. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η δεύτερη φορά στη βιβλιογραφία όπου το γονίδιο *TNFRSF13B* εξετάζεται σε ασθενείς που παρουσιάζουν ανεπάρκεια σε κάποιες υποτάξεις των ανοσοσφαιρινών (για παράδειγμα την ανεπάρκεια στην IgG4 υποτάξη), ενώ κατά την πρώτη παρόμοια μελέτη δεν ήταν ξεκάθαρο αν οι βλάβες στο συγκεκριμένο γονίδιο ευθύνονται για την εμφάνιση της ανεπάρκειας ή την κλινική εικόνα των ασθενών.<sup>107</sup> Ακόμη, το γεγονός της βαρύτερης κλινικής εικόνας στους ασθενείς με sIgAD που φέρουν τους πολυμορφισμούς P251L και rs2274892 του γονιδίου *TNFRSF13B* συγκριτικά με τους ασυμπτωματικούς ασθενείς που αποκαλύφθηκε, χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B* επιδρούν άμεσα στη λειτουργία των Β-κυττάρων *in vitro*,<sup>108</sup> αλλά δεν οδηγούν απαραίτητως σε ανοσοανεπάρκεια *in vivo*. Επιπρόσθετα, ο ανοσοφαινότυπος των Β-κυττάρων των ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες, αλλά και η κλινική τους εικόνα, ειδικά των ασθενών με CVID, εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια.<sup>106,107</sup> Οι Salzer και συν., προτείνουν πως μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B* σε ετερόζυγη κατάσταση αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση CVID, ενώ διπλά ετερόζυγες μεταλλάξεις οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου.<sup>107</sup>

Παρόλα αυτά, υπάρχουν άτομα με βλάβες στο γονίδιο *TNFRSF13B* και στα δύο αλληλία, τα οποία έχουν ελαφρώς μειωμένα τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών τους στον ορό και δε νοσούν.<sup>152</sup> Στο πλαίσιο αυτό, θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν την άποψη ότι οι γενετικές βλάβες στο γονίδιο *TNFRSF13B* δεν είναι αιτιολογικές της εμφάνισης αντισωματικών ανεπαρκειών. Είναι όμως πιθανόν

ότι αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες και επιπλέον φαίνεται να επηρεάζουν τον φαινότυπό τους, όταν συνδυαστούν με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι φυσιολογικά άτομα φέρουν τη μετάλλαξη C104R χωρίς καμία κλινική ή εργαστηριακή ένδειξη ανοσοανεπάρκειας, από την ύπαρξη της μετάλλαξης R220H σε έναν ασθενή με sIgG4 η οποία όμως απουσίαζε από τη μητέρα του που έπασχε από COVID και τέλος από την παρουσία γενετικών βλαβών, που ενώ έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση σοβαρής αντισωματικής ανεπάρκειας (όπως η p.L69TfsX12), έχουν αναγνωρισθεί σε ασυμπτωματικά άτομα με sIgG4.

Όπως προαναφέρθηκε, η μελέτη μας έδειξε υψηλή συχνότητα γενετικών βλαβών του γονιδίου *TNFRSF13B* στους ασθενείς με sIgG4. Οι ανεπάρκειες των υποτάξεων IgG ορίζονται όταν μία ή περισσότερες υποτάξεις έχουν τιμή 2 λογαρίθμους χαμηλότερες από την κατώτερη φυσιολογική και θεωρούνται ήπιες λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι πάσχοντες είναι κατά κανόνα ασυμπτωματικοί.<sup>153</sup> Οι συμπτωματικοί ασθενείς υποφέρουν από επαναλαμβανόμενες βακτηριακές λοιμώξεις του ανώτερου και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, αποπία και αυτοάνοσες εκδηλώσεις και ο φαινότυπός τους προσομοιάζει με των ασθενών με sIgAD.<sup>92</sup> Στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία για τα αίτια των ανεπαρκειών των υποτάξεων της ανοσοσφαιρίνης IgG ενώ ο ρόλος του γονιδίου *TNFRSF13B* στον φαινότυπό τους παραμένει άγνωστος. Αξίζει πάντως να αναφερθεί ότι η γενετική βλάβη p.L69TfsX12 που στη μελέτη μας ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με sIgG4D επιδρά στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, τα TACI<sup>-/-</sup> διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασαν μείωση σε όλες τις υποτάξεις της ανοσοσφαιρίνης IgG ύστερα από εμβολιασμό με θυμοανεξάρτητα αντιγόνα.<sup>62</sup> Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τους Bacchelli και συν., οι οποίοι έδειξαν ότι μοντέλα ποντικών με μετάλλαξη αντίστοιχη της C104R των ανθρώπων, παρουσιάζουν μείωση των υποτάξεων IgG2b και IgG1, ενισχύοντας την άποψη περί επίδρασης του γονιδίου *TNFRSF13B* στην εμφάνιση ανεπαρκειών των υποτάξεων<sup>154</sup> και με τον Morell που διαπίστωσε ότι οι ανεπάρκειες των υποτάξεων της IgG, αποτελούν δείκτη σοβαρότερων διαταραχών του ανοσιακού συστήματος.<sup>155</sup>

Η μελέτη των ασθενών με ΧΛΛ κατέδειξε ότι τα νεοπλασματικά τους κύτταρα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR, χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης TACI κατά κανόνα, ενώ στον ορό τους είναι ιδιαίτερα χαμηλά ως μη ανιχνεύσιμα τα επίπεδα BAFF και ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα APRIL συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Επιπλέον, αποκαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη TACI σχετίζεται θετικά με την παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος και αρνητικά με την έκφραση της πρωτεΐνης CD11c, ενώ η πρωτεΐνη BAFFR σχετίζεται θετικά με την πρωτεΐνη CD79b. Τέλος, παρά το γεγονός ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα με υψηλή έκφραση TACI είναι πιο ανθεκτικά στην απόπτωση όταν διεγερθούν με BAFF και APRIL συγκριτικά με τα TACI αρνητικά κύτταρα,



δεν ανιχνεύθηκε κάποια σχέση των πρωτεϊνών TACI αλλά και BAFFR με την πρόγνωση της νόσου. Το εύρημα χαμηλής έκφρασης της πρωτεΐνης TACI είναι χαρακτηριστικό της ΧΛΛ καθώς τα νεοπλασματικά κύτταρα των ασθενών με NHL παρουσίαζαν υψηλότερη έκφρασή της. Αντίθετα, η χαμηλή ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR παρατηρήθηκε τόσο σε νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με ΧΛΛ όσο και σε νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με NHL.

Η προέλευση του ΧΛΛ κυττάρου έχει αποτελέσει θέμα προβληματισμού πολλών διαφορετικών ερευνητικών ομάδων και παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει, πολλά ερωτηματικά δεν έχουν ακόμη απαντηθεί. Το γεγονός ότι τα ΧΛΛ κύτταρα εκφράζουν το μόριο CD5, οδήγησε στην υπόθεση ότι προέρχονται από τον B1 υποπληθυσμό των B κυττάρων ο οποίος είναι γνωστό ότι επίσης εκφράζει το μόριο CD5. Στην άποψη αυτή συνηγορεί το γεγονός ότι τα CD5<sup>+</sup> B κύτταρα των ποντικών μοιάζουν με τα ΧΛΛ κύτταρα στη μεγάλη διάρκεια ζωής τους, αλλά και στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται ως ένας μονοκλωνικός πληθυσμός στα γερασμένα ζώα.<sup>156,157,158</sup> Από την άλλη, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η έκφραση του CD5 είναι απρόσφορη στα κύτταρα της ΧΛΛ και οφείλεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων μιας και έχει αποδειχθεί από τους Wortis και συν., ότι σε CD5<sup>-</sup> B-κύτταρα, το CD5 μπορεί να υπερεκφραστεί ύστερα από *in vitro* ενεργοποίηση.<sup>159</sup> Πάντως, στα ποντίκια έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα του B1 υποπληθυσμού εκφράζουν έναν περιορισμένο αριθμό IGHV υπότυπων και επιπλέον το γονίδιο της βαριάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών είναι αμετάλλακτο.<sup>160</sup> Στον άνθρωπο, επίσης τα B-κύτταρα του B1 υποπληθυσμού εκφράζουν στην πλειονότητά τους αμετάλλακτα γονίδια. Το γεγονός όμως ότι τα ΧΛΛ κύτταρα στο 60% περίπου των περιπτώσεων φέρουν υπερμεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλύσου, δεν αποκλείει την προέλευσή τους από τα CD5<sup>+</sup> B-κύτταρα, καθώς τα κύτταρα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις είναι ικανά να μεταλλάξουν το γονίδιο της βαριάς αλύσου κατά την αντίδραση του βλαστικού κέντρου.<sup>161</sup>

Εκτός όμως από το παραπάνω μοντέλο προέλευσης της ΧΛΛ έχουν προταθεί και άλλα. Το γεγονός ότι ακόμα και οι αμετάλλακτοι κλώνοι έχουν πιθανόν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και εκφράζουν δείκτες ωρίμανσης, καθώς και η ανακάλυψη ότι το γονιδιακό προφίλ των ΧΛΛ κυττάρων είναι αρκετά κοινό μεταξύ των μεταλλαγμένων και των αμετάλλακτων κλώνων, προτείνει ότι τα ΧΛΛ κύτταρα προέρχονται από μνημονικά CD27<sup>+</sup> B-κύτταρα.<sup>162</sup> Το γεγονός μάλιστα ότι τα CD27<sup>+</sup> B-κύτταρα απαντούν σε θυμοανεξάρτητα αντιγόνα, δείχνει ότι μπορεί να είναι κύτταρα του μανδύα. Στο πλαίσιο αυτό, τα ΧΛΛ κύτταρα που μελετήσαμε, ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της βαριάς αλύσου, ήταν CD27<sup>+</sup>. Βάσει όμως αυτού του ευρήματος, θα αναμενόταν να εκφράζουν και TACI μιας και δείξαμε πως τα δύο αυτά μόρια συνάδουν ως προς την έκφρασή τους.

Τα αποτελέσματά μας λοιπόν συμφωνούν περισσότερο με το 1<sup>ο</sup> μοντέλο που

περιγράφηκε παραπάνω και βρίσκονται σε συμφωνία με τα πρόσφατα ευρήματα των Seifert και συν., που πρότειναν πως τα ΧΛΛ κύτταρα που δε φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλυσού προέρχονται από αμετάλλακτα ώριμα CD5<sup>+</sup> κύτταρα, ενώ τα ΧΛΛ κύτταρα με μεταλλάξεις στο γονίδιο προέρχονται από CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-κύτταρα μνήμης μετά την επαφή με το αντιγόνο και την αντίδραση βλαστικού κέντρου. Είναι ακόμη πιθανό ότι η παρατηρούμενη απορρύθμιση στην έκφραση των πρωτεϊνών CD27, BAFFR και TACI να οφείλεται στην εξαλλαγή του B-κυττάρου σε νεοπλασματικό.<sup>163</sup>

Παρά τις ενδείξεις μας για την προέλευση της ΧΛΛ από τον B1 υποπληθυσμό όμως, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα κύτταρα αυτά να είναι παρθένα και τα φαινοτυπικά, αλλά και τα γενετικά χαρακτηριστικά τους να οφείλονται σε αυτοαντιγόνα με τα οποία έχουν έρθει σε επαφή.

Πρόσφατα, οι Ferrer και συν., έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα του B-κυττάρου (BCR) *in vitro* προκαλεί μια αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών TACI και BCMA στα φυσιολογικά B-κύτταρα, αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών BAFFR, TACI και BCMA στα ΧΛΛ κύτταρα.<sup>164</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει όμως το γεγονός ότι τα δείγματα των ΧΛΛ ασθενών μας με τον IGHV1 υπότυπο, παρουσιάζουν μικρότερη ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποτύπους και επιπρόσθετα ότι η έκφραση του CD79b, βασικού συστατικού του BCR σχετίζεται θετικά με την έκφραση BAFFR. Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στα μόρια Zap-70 και CD38 τα οποία συνηθέστερα εκφράζονται σε αμετάλλακτους ΧΛΛ κλώνους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες της νόσου.<sup>151</sup> Στο πλαίσιο αυτό, οι Capello και συν., έχουν βρει ότι τα ΧΛΛ κύτταρα που φέρουν τον υπότυπο IGHV3-21 παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση κάποιων μορίων ενεργοποίησης, όπως του CD25 και του CD54, αλλά και μορίων προσκόλλησης όπως του CD49c και του CD62L.<sup>165</sup> Είναι φανερό πως απαιτούνται περισσότερες μελέτες, ώστε να διευκρινιστεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των IGHV υποτύπων και ορισμένων ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ΧΛΛ κυττάρων και αν αυτή οφείλεται στη σηματοδότηση μέσω του BCR.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό ότι σήματα από το λευχαιμικό μικροπεριβάλλον συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία, αλλά και στην εξέλιξη της ΧΛΛ.<sup>166,167</sup> Το μικροπεριβάλλον αυτό περιλαμβάνει τους προσδέτες BAFF και APRIL οι οποίοι προστατεύουν τα ΧΛΛ κύτταρα από την απόπτωση και πιθανόν να συμμετέχουν στην επιβίωσή τους *in vitro*.<sup>168</sup> Για το λόγο αυτό, η στόχευση των υποδοχέων BAFFR και TACI έχει προταθεί ως εναλλακτική θεραπεία της ΧΛΛ. Στο πλαίσιο αυτό, από τη μελέτη μας προέκυψε ότι τα ΧΛΛ κύτταρα, ανεξάρτητα με το επίπεδο υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της βαριάς αλυσού, παρουσιάζουν μικρή ένταση φθορισμού του πρωτεϊνικού μορίου BAFFR η οποία μάλιστα οφείλεται σε κάποια μεταμεταγραφική τροποποίηση μιας και mRNA μετάγραφα ανιχνεύονται στα ΧΛΛ κύτταρα σε ποσότητες παρόμοιες με τα φυσιολογικά B-

κύτταρα. Τα ευρήματα αυτά που έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη,<sup>140</sup> δείχνουν ότι η στόχευση του BAFFR δεν ενδείκνεται για τη θεραπεία της ΧΛΛ. Από την άλλη, λαμβάνοντας υπόψιν ότι μόνο μια μειοψηφία ασθενών με ΧΛΛ φέρουν υψηλή έκφραση TACI στην επιφάνεια των νεοπλασματικών τους κυττάρων, αντι-APRIL θεραπευτικές προσεγγίσεις προτείνεται να ακολουθούνται μόνο έπειτα από τον έλεγχο έκφρασης των υποδοχέων TACI και BCMA.

Επιπροσθέτως, από τη μελέτη μας προέκυψε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης TACI στα ΧΛΛ κύτταρα σχετίζεται θετικά με την παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος, η οποία είναι ένας παράγοντας κινδύνου και από την ανάλυσή μας συσχετίστηκε με χειρότερη έκβαση της νόσου. Οι Bernstein και συν., παρατήρησαν ότι η παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος σχετίζεται με την επιδείνωση της ΧΛΛ και επιπρόσθετα οι Yang και συν., βρήκαν ότι η παραπρωτεΐνη IgM είναι υψηλότερη στους ασθενείς με ΧΛΛ μεγαλύτερου σταδίου και αυτών που φέρουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες (11q22.3).<sup>169</sup> Σχετικά με την έκφραση του μορίου CD11c στη ΧΛΛ, παρόλο που τα δεδομένα στη βιβλιογραφία δεν είναι σαφή,<sup>170</sup> οι Wormsley και συν., έδειξαν ότι μπορεί να σχετίζεται με το στάδιο της νόσου, με τους ασθενείς προχωρημένου σταδίου να εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση.<sup>171</sup> Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι ΧΛΛ κύτταρα που εκφράζουν TACI είναι πιθανό να μην εκφράζουν το μόριο CD11c, ενώ η παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος στον ορό τους ενδέχεται να επιδεινώνει τη νόσο τους. Τα συμπεράσματα αυτά είναι συμβατά με το γεγονός ότι τα ΧΛΛ κύτταρα που εκφράζουν TACI είναι πιο ανθεκτικά στην απόπτωση *in vitro* συγκριτικά με τα ΧΛΛ κύτταρα που έχουν πολύ χαμηλή έκφραση.

Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης BAFFR στη ΧΛΛ, πλην της συσχέτισής με την πρωτεΐνη CD79b, φαίνεται ότι σχετίζεται και με τις πρωτεΐνες CD20 και FMC7. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι από την έκφραση του μορίου FMC7 μπορεί να προβλεφθεί η έκφραση του μορίου CD20,<sup>172</sup> μιας και το FMC7 αποτελεί επίτοπο του CD20.<sup>173</sup> Το γεγονός ότι η έκφραση του BAFFR και του CD20 ακολουθεί παρόμοιο μοντέλο έκφρασης στη ΧΛΛ φάνηκε χαρακτηριστικά και στο δείγμα της ασθενούς μας με τους 2 κλώνους κυττάρων (έναν φυσιολογικό και έναν παθολογικό), όπου ο παθολογικός παρουσίαζε μικρότερη ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR, αλλά και της πρωτεΐνης CD20, συγκριτικά με τον φυσιολογικό κλώνο. Από την άλλη μεριά βέβαια, αξίζει να αναφερθεί ότι στα νεοπλασματικά κύτταρα των ασθενών με NHL, παρόλο που παρατηρήθηκε μείωση της έντασης φθορισμού του BAFFR υποδοχέα, δε συνέβαινε το ίδιο για το μόριο CD20, όπου η ένταση φθορισμού είναι ιδιαίτερα υψηλή. Σχετικά με το CD20 μόριο, οι Feng και συν., πρόσφατα ανακάλυψαν την προγνωστική αξία του στη ΧΛΛ όπου το ποσοστό των ΧΛΛ κυττάρων που εξέφραζαν CD20 ήταν μεγαλύτερο στους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της βαριάς αλυσού συγκριτικά με το ποσοστό έκφρασης στους ασθενείς με αμετάλλακτους κλώνους και ακόμη ασθενείς που πάνω από το 60,3% των

ΧΛΛ κυττάρων εξέφραζαν CD20, έμεναν για καιρό εκτός θεραπείας.<sup>174</sup> Παρ'όλα αυτά, από τη δική μας ανάλυση δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης CD20 και του επιπέδου υπερμεταλλάξεων του γονιδίου της βαριάς αλύσου. Επιπρόσθετα, οι Tam και συν. έδειξαν ότι ασθενείς με τρισωμία 12 εμφάνιζαν μεγαλύτερη έκφραση CD20.<sup>175</sup>

Ακόμη, κατά τον προσδιορισμό των προσδετών BAFF και APRIL δείξαμε επιβεβαιώνοντας τη βιβλιογραφία, ότι μόνο το μόριο APRIL ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον ορό ασθενών με ΧΛΛ, ενώ το μόριο BAFF στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι μη ανιχνεύσιμο.<sup>135,136</sup> Οι Tecchio και συν. έχουν δείξει ότι από τα επίπεδα APRIL στον ορό των ασθενών με ΧΛΛ μπορεί να προβλεφθεί ο χρόνος έναρξης της θεραπείας, παρόλο που δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του APRIL και του απόλυτου αριθμού των λευκών, του σταδίου της νόσου αλλά και της έκφρασης των προγνωστικών δεικτών CD38 και Zap70.<sup>136</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η εμφάνιση υψηλών τιμών BAFF σε 5 ασθενείς εκ των οποίων οι 3 εμφάνιζαν παράλληλα και αυτοάνοσες εκδηλώσεις, υπογραμμίζοντας τον βασικό ρόλο που διαδραματίζει ο συγκεκριμένος προσδέτης στην εμφάνιση αυτοανοσίας.<sup>176,177,178,179</sup>

Η μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου *TNFRSF13B-P251L* και *TNFRSF13B-V220A*, που είναι οι πιο κοινοί, αλλά και των πολυμορφισμών *TNFRSF13C-P21R* και *TNFRSF13C-H159Y* που έχουν βρεθεί σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με αντισωματική ανεπάρκεια σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, έδειξε ότι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης ανάμεσα στους ασθενείς με ΧΛΛ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Συμπερασματικά, από την παρούσα διατριβή προκύπτει ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ, παρά το γεγονός ότι εκφράζουν το μόριο CD27, παρουσιάζουν στην πλειονότητά τους χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης TACI, ισχυροποιώντας την υπόθεση ότι το λευχαιμικό κύτταρο μπορεί να προέρχεται από τον B1 υποπληθυσμό. Η μείωση της έντασης φθορισμού της πρωτεΐνης BAFFR στα νεοπλασματικά B-κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά B-κύτταρα από την άλλη, καθιστά το μόριο αυτό κατάλληλο δείκτη για τον έλεγχο της υπολειπόμενης νόσου ενώ παράλληλα η συσχέτιση της μείωσης με τον IGHV1 υπότυπο εγείρει ερωτήματα σχετικά με την πιθανή επίδραση συγκεκριμένων IGHV υποτύπων στην έκφραση των ανοσοφαινοτυπικών δεικτών. Τα συμπεράσματα αυτά μπορούν να ληφθούν υπόψιν στην περίπτωση αντι-BAFFR και αντι-TACI θεραπευτικών προσεγγίσεων. Τέλος, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* δεν είναι αιτιοπαθολογικές της εμφάνισης αντισωματικών ανεπαρκειών αλλά πιθανόν σχετίζονται με τον φαινότυπό τους αν συνδυαστούν με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Οι υποδοχείς *TNFRSF13B/TACI* και *TNFRSF13C/BAFFR* ενεργοποιούν τον NF-κB στα νεοπλασματικά B-κύτταρα προστατεύοντας τα πιθανόν από την απόπτωση. Μεταλλάξεις των γονιδίων *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* και *ICOS*, έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεση των αντισωματικών ανεπαρκειών και στην εμφάνιση λεμφοϋπερπλασιών. Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη του *TNFRSF13B* σε ανοσοανεπαρκούντες ασθενείς και των *TACI*, *BAFFR* και *ICOS* σε ασθενείς με ΧΛΛ.

**Υλικό και Μέθοδοι:** Συλλέχθηκαν δείγματα 53 ασθενών με αντισωματικές ανεπάρκειες, 94 με ΧΛΛ, 30 με NHL και 315 φυσιολογικών μαρτύρων. Η έκφραση *TACI* και *BAFFR* σε πρωτεϊνικό επίπεδο ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής ενώ σε μεταγραφικό επίπεδο με qRT-PCR. Στους ασθενείς με ΧΛΛ μελετήθηκαν προγνωστικοί δείκτες της νόσου, όπως η έκφραση *CD38* με κυτταρομετρία ροής καθώς και οι υπερμεταλλάξεις της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών με PCR-sequencing. Στον ορό ασθενών με ΧΛΛ και φυσιολογικών μαρτύρων προσδιορίστηκαν τα *BAFF* και *APRIL*. Η λειτουργικότητα του *TACI* ελέγχθηκε μετά από καλλιέργεια των ΧΛΛ κυττάρων παρουσία *BAFF* και *APRIL*. Στους ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες έγινε PCR-sequencing του γονιδίου *TNFRSF13B*, ενώ στα δείγματα ασθενών με ΧΛΛ και φυσιολογικών μαρτύρων έγινε ανίχνευση των πολυμορφισμών *TNFRSF13B- P251L*, *TNFRSF13B- V220A*, *TNFRSF13C- P21R* και *TNFRSF13C- H159Y*.

**Αποτελέσματα:** Γενετικές βλάβες του *TNFRSF13B* εμφανίζονται σε ανοσοανεπαρκούντες και σε φυσιολογικά άτομα. Τα B-κύτταρα ΧΛΛ ασθενών εξέφραζαν *BAFFR*, αλλά με σημαντικά χαμηλότερη ένταση φθορισμού συγκριτικά με τα φυσιολογικά B-κύτταρα (Median: 6,1 IQR: 4,6-7,5 vs Median: 9,8 IQR: 6,7-14,5),  $p < 0,001$ . Η πλειονότητα των ασθενών με ΧΛΛ παρουσίαζε χαμηλή έκφραση *TACI* (Median: 7,4%, IQR: 2,1-20,8), σε σχέση με τους ασθενείς με NHL (Median: 31,5, IQR: 9,6-61,8),  $p < 0,001$ . Στον ορό των ασθενών τα επίπεδα *BAFF* ήταν χαμηλά και τα επίπεδα *APRIL* αυξημένα συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση της έκφρασης *TACI* και *BAFFR* με την παρουσία αυτοάνοσων εκδηλώσεων, λοιμώξεων ή την πρόγνωση της ΧΛΛ.

**Συμπεράσματα:** Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* δεν είναι αιτιολογικές για την εμφάνιση αντισωματικών ανεπαρκειών. Η χαμηλή έκφραση *TACI* ισχυροποιεί την υπόθεση πρόελευσης του λευχαιμικού κυττάρου από τον B1-υποπληθυσμό. Το πρότυπο έκφρασης του *BAFFR* από τα νεοπλασματικά B-κύτταρα, το καθιστά χρήσιμο δείκτη για τον έλεγχο της υπολειπόμενης νόσου. Τα αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν υπόψιν στην περίπτωση αντι-*TACI* και αντι-*BAFFR* θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## Abstract

**Purpose:** TACI and BAFFR might participate in the survival of CLL cells, protecting them from apoptosis through NF- $\kappa$ B. Mutations of *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* and *ICOS* genes have been associated with antibody deficiencies. The aim of this study was to detect the mutations of *TNFRSF13B* gene in Greek patients with antibody deficiencies and to determine the expression of *TNFRSF13B*/TACI, *TNFRSF13C*/BAFFR and ICOS on CLL cells and their contribution to the phenotype and the prognosis of the disease.

**Materials and methods:** Samples from 53 patients with antibody deficiencies, 94 patients with CLL, 30 patients with NHL and 315 healthy individuals, were collected. The mRNA and protein levels of *TNFRSF13B* and *TNFRSF13C* were estimated by qRT-PCR and flow cytometry, respectively. BAFF and APRIL serum levels were estimated by ELISA. In CLL, the prognostic factors CD38 and the hypermutation status of IGHV gene were determined using flow cytometry and PCR-sequencing, respectively. CLL cells were stimulated by PKW, BAFF and APRIL and the apoptosis status was estimated by flow cytometry using an Annexin V-FITC/7-AAD (7-AAD) kit. The molecular analysis of *TNFRSF13B* gene was performed using PCR-sequencing and the detection of the polymorphisms *TNFRSF13B-P251L*, *TNFRSF13B-V220A*, *TNFRSF13C-P21R* and *TNFRSF13C-H159Y* using PCR-RFLP.

**Results:** Mutations of *TNFRSF13B* gene are found both in patients and healthy individuals. CLL patients displayed significantly lower expression of TACI (Median: 7,4%, IQR: 2,1-20,8) compared to NHL patients (Median: 31,5, IQR: 9,6-61,8),  $p < 0,001$  and lower MFI of BAFFR compared to healthy controls (Median: 6,1 IQR: 4,6-7,5 vs Median: 9,8 IQR: 6,7-14,5 respectively). Serum BAFF was absent in the majority of CLL patients. Additionally, CLL cells with low or absent TACI expression were more susceptible to apoptosis *in vitro* after stimulation with all mitogens. *TNFRSF13B*/TACI expression and *TNFRSF13C*/BAFFR expression were not significantly associated with the presence of autoimmunity, the infection risk and the prognosis of CLL.

**Conclusions:** The mutations of *TNFRSF13B* are not causative factors for the appearance of antibody deficiencies. The low TACI expression suggest that CLL may derive from CD5<sup>+</sup> B cell populations rather than memory B cells and low BAFFR MFI could be used for the detection of minimal residual disease of CLL. These findings should be taken into account in the case of anti-TACI and anti-BAFFR therapeutic approaches.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- <sup>1</sup> Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 959-971.
- <sup>2</sup> Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy- 1.1 bone marrow. *J Exp Med* 1992; 175: 175-184.
- <sup>3</sup> Lai AY, Lin SM, Kondo M. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* 2005; 175: 5016-5023.
- <sup>4</sup> Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 2001; 15: 659-669.
- <sup>5</sup> Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 2005; 105: 2717-2723.
- <sup>6</sup> Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 2002; 17: 117-130.
- <sup>7</sup> Medina KL, Garrett KP, Thompson LF, Rossi MI, Payne KJ, Kincade PW. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* 2001; 2: 718-724.
- <sup>8</sup> Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999; 401: 556-562.
- <sup>9</sup> Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 95-106.
- <sup>10</sup> Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, Danner DB, Holmes KL, Morse HC 3rd, Leder P. Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* 1987; 236: 816-819.
- <sup>11</sup> Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 231-264.
- <sup>12</sup> Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, Qiang F, Gorelik L, Kalled SL, Acha-Orbea H, Rennert PD, Tschopp J, Schneider P. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners *J Exp Med* 2005; 201: 1375-1383.
- <sup>13</sup> Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 235-246.
- <sup>14</sup> Dillon SR, Harder B, Lewis KB, Moore MD, Liu H, Bukowski TR, Hamacher NB, Lantry MM, Maurer M, Krejsa CM, Ellsworth JL, Pederson S, Elkon KB, Wener MH, Dall'Era M, Gross JA. B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R4.
- <sup>15</sup> Bischof D, Elswa SF, Mantchev G, Yoon J, Michels GE, Nilson A, Sutor SL, Platt JL, Ansell SM, von Bulow G, Bram RJ. Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* 2006; 107: 3235-3242.
- <sup>16</sup> Kimberley FC, van Bostelen L, Cameron K, Hardenberg G, Marquart JA, Hahne M, Medema JP. The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. *FASEB J.* 2009; 23: 1584-1595.
- <sup>17</sup> Gorelik L, Cutler AH, Thill G, Miklasz SD, Shea DE, Ambrose C, Bixler SA, Su L, Scott ML, Kalled SL. Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J Immunol* 2004; 172: 762-766.
- <sup>18</sup> Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 7276-7286.

- 
- <sup>19</sup> Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP. Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 2002; 168: 5993-5996.
- <sup>20</sup> O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 2004; 199: 91-98.
- <sup>21</sup> Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR. B-cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 2004; 173: 807-817.
- <sup>22</sup> Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3: 822-829.
- <sup>23</sup> Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BlyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006; 108: 2687-2694.
- <sup>24</sup> Foster D, Parrish-Novak J, Fox B, Xu W. Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 160-170.
- <sup>25</sup> Gardam S, Siervo F, Basten A, Mackay F, Brink R. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* 2008; 28: 391-401.
- <sup>26</sup> Sasaki Y, Casola S, Kutok JL, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* 2004; 173: 2245-2252.
- <sup>27</sup> Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 491-502.
- <sup>28</sup> Harless SM, Lentz VM, Sah AP, Hsu BL, Clise-Dwyer K, Hilbert DM, Hayes CE, Cancro MP. Competition for BlyS-mediated signalling through Bcmd/BR3 regulates peripheral B-lymphocyte numbers. *Curr Biol* 2001; 11: 1986-1989.
- <sup>29</sup> Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189: 1747-1756.
- <sup>30</sup> Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 1453-1466.
- <sup>31</sup> Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001; 293: 2108-2111.
- <sup>32</sup> Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, Cancro M, Grewal IS, Dixit VM. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 2001; 11: 1547-1552.
- <sup>33</sup> Lam KP, kuhn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid death. *Cell* 1997; 90: 1073-1083.
- <sup>34</sup> Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha / beta heterodimer. *Cell* 2004; 117: 787-800.
- <sup>35</sup> Dall'Era M, Wofsy D. Connective tissue diseases: Belimumab for systemic lupus erythematosus: breaking through? *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 124-125.
- <sup>36</sup> Vora KA, Wang LC, Rao SP, Liu ZY, Majeau GR, Cutler AH, Hochman PS, Scott ML, Kalled SL. Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* 2003; 171: 547-551.
- <sup>37</sup> Shinohara H, Kurosaki T. Comprehending the complex connection between PKCbeta, TAK1, and IKK in BCR signaling. *Immunol Rev* 2009; 232: 300-318.



- 
- <sup>38</sup> Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 185–210.
- <sup>39</sup> Pasparakis M, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K.  $\text{I}\kappa\text{B}$  kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J Exp Med* 2002; 196: 743–752.
- <sup>40</sup> Lentz VM, Hayes CE, Cancro MP. Bcmd decreases the life span of B-2 but not B-1 cells in A/WySnJ mice. *J Immunol* 1998; 160: 3743–3747.
- <sup>41</sup> Hondowicz BD, Alexander ST, Quinn WJ 3rd, Pagán AJ, Metzgar MH, Cancro MP, Erikson J. The role of BLYS/BLYS receptors in anti-chromatin B cell regulation. *Int Immunol* 2007; 19: 465–475.
- <sup>42</sup> Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, Brink R. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 2004; 20: 785–798.
- <sup>43</sup> Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, Cyster JG. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 2004; 20: 441–453 .
- <sup>44</sup> Meyer-Bahlburg A, Andrews SF, Yu KOA, Porcelli SA and Rawlings DJ. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF mediated homeostatic proliferation. *J Exp Med* 2008; 205: 155–168.
- <sup>45</sup> Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, MacKay F, Rao SP, Kalled SL, Scott ML. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and tT cell-independent antibody formation. *J Immunol* 2004; 173: 2331–2341.
- <sup>46</sup> Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189: 1747–1756.
- <sup>47</sup> Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 286–297.
- <sup>48</sup> Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999; 190: 1697–1710.
- <sup>49</sup> Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001; 293: 2111–2114.
- <sup>50</sup> Mayne CG, Nashold FE, Sasaki Y, Hayes CE. Altered BAFF-receptor signaling and additional modifier loci contribute to systemic autoimmunity in A/WySnJ mice. *Eur J Immunol* 2009; 39: 589–599.
- <sup>51</sup> Mayne CG, Amanna IJ, Nashold FE, Hayes CE. Systemic autoimmunity in BAFF-R-mutant A/WySnJ strain mice. *Eur J Immunol* 2008; 38: 587–598.
- <sup>52</sup> Ju ZL, Shi GY, Zuo JX, Zhang JW, Jian Sun. Unexpected development of autoimmunity in BAFF-R-mutant MRL-lpr mice. *Immunology* 2007; 120: 281–289.
- <sup>53</sup> Vugmeyster Y, Seshasayee D, Chang W, Storn A, Howell K, Sa S, Nelson T, Martin F, Grewal I, Gilkerson E, Wu B, Thompson J, Ehrenfels BN, Ren S, Song A, Gelzleichter TR, Danilenko DM. A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys. *Am J Pathol* 2006; 168: 476–489.
- <sup>54</sup> Fu L Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Ford RJ. BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKKbeta and NF-kappaB/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Blood* 2009; 113: 4627–4236.
- <sup>55</sup> Bram RJ, Crabtree GR. Calcium signaling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 1994; 371: 355–358.
- <sup>56</sup> Shaw CJ, Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 2005; 116: 1–7.
- <sup>57</sup> Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J, Shriver SK, Gordon NC, Pan B, Skelton NJ, Kelley RF, Starovasnik MA. Structures of APRIL-receptor complexes:

---

like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 2005; 280: 7218-7227.

- <sup>58</sup> Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 19-26.
- <sup>59</sup> von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 1997; 278: 138-141.
- <sup>60</sup> Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, Theill LE, Colombero A, Solovyev I, Lee F, McCabe S, Elliott R, Miner K, Hawkins N, Guo J, Stolina M, Yu G, Wang J, Delaney J, Meng SY, Boyle WJ, Hsu H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med* 2000; 192: 91-98.
- <sup>61</sup> von Bülow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001; 14: 573-582.
- <sup>62</sup> Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, Tumas D, Grewal IS, Dixit VM. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2001; 2: 638-643.
- <sup>63</sup> Lee JJ, Ozcan E, Rauter I, Geha RS. Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 520-526.
- <sup>64</sup> Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 401-409.
- <sup>65</sup> Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, Bram RJ, Jabara H, Geha RS. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 2005; 201: 35-39.
- <sup>66</sup> Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3903-3908.
- <sup>67</sup> Hardenberg G, Planelles L, Schwarte CM, van Bostelen L, Le Huong T, Hahne M, Medema JP. Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2900-2911.
- <sup>68</sup> Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* 2007; 179: 5947-5957.
- <sup>69</sup> Xu S, Lam KP. B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4067-4074.
- <sup>70</sup> Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002; 17: 341-352.
- <sup>71</sup> Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 2005; 37: 829-834.
- <sup>72</sup> Berglund LJ, Jones GJ, Murali R, Fulcher DA. TACI mutation with invasive polyclonal CD8+ T-cell lymphoproliferation in a patient with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 870-877.
- <sup>73</sup> Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999; 402: 827-832.
- <sup>74</sup> Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14163-14168.
- <sup>75</sup> Ihara K, Ahmed S, Nakao F, Kinukawa N, Kuromaru R, Matsuura N, Iwata I, Nagafuchi S, Kohno H, Miyako K, Hara T. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics* 2001; 53: 447-454.

- 
- <sup>76</sup> Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263-266.
- <sup>77</sup> Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 29-53.
- <sup>78</sup> Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999; 11: 423-432.
- <sup>79</sup> Khayyamian S, Hutloff A, Büchner K, Gräfe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6198-6203.
- <sup>80</sup> Wang F, Zhu W, Liu T, Sun Z, Ju S, Ju S, Yu G, Xie W, Deng Z, Lu B, Zhang X. The expression analysis of ICOS-L on activated T cells and immature dendritic cells as well as malignant B cells and Grave's-disease-derived thyroid tissues by two novel mAbs against human ICOS-L. *Tissue Antigens* 2007; 69: 62-72.
- <sup>81</sup> Arimura Y, Kato H, Dianzani U, Okamoto T, Kamekura S, Buonfiglio D, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, Yagi J. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. *Int Immunol* 2002; 14: 555-566.
- <sup>82</sup> Fos C, Salles A, Lang V, Carrette F, Audebert S, Pastor S, Ghiotto M, Olive D, Bismuth G, Nunès JA. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 2008; 181: 1969-1977.
- <sup>83</sup> Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 314-320.
- <sup>84</sup> Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001; 166: 1-5.
- <sup>85</sup> Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, Büchner K, Dorner BG, Jonuleit H, Mages HW, Kroczeck RA. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2680-2686.
- <sup>86</sup> Choe J, Choi YS. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 508-515.
- <sup>87</sup> Kindler V, Zubler RH. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3. *J Immunol* 1997; 159: 2085-2090.
- <sup>88</sup> Rousset F, Garcia E, DeFrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1890-1893.
- <sup>89</sup> Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409: 97-101.
- <sup>90</sup> McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001; 409: 102-105.
- <sup>91</sup> Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 544-556.
- <sup>92</sup> Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 396-414.
- <sup>93</sup> Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME. Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol* 2006; 13: 223-259.
- <sup>94</sup> Di RM, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med* 2004; 3: 211-217.
- <sup>95</sup> Burrows PD, Cooper MD. IgA deficiency. *Adv Immunol* 1997; 65: 245-276.
- <sup>96</sup> Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* 1993; 86: 31-42.
- <sup>97</sup> Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; 92: 34-48.

- <sup>98</sup> Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 412-417.
- <sup>99</sup> Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. **Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire.** *Blood* 2004; 104: 3647-3654.
- <sup>100</sup> Aghamohammadi A, Cheraghi T, Gharagozlou M, Movahedi M, Rezaei N, Yeganeh M, Parvaneh N, Abolhassani H, Pourpak Z, Moin M. IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *J Clin Immunol* 2009; 29: 130-136.
- <sup>101</sup> Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, **Böhm J**, Kienzler AK, Pan-**Hammarström Q**, **Hammarström L**, Rakhmanov M, Schlesier M, Grimbacher B, Peter HH, Eibel H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13945-13950.
- <sup>102</sup> Losi CG, Silini A, Fiorini C, Soresina A, Meini A, Ferrari S, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2005; 25: 496-502.
- <sup>103</sup> Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, Kraus H, Salzer U, Fiala GJ, Schamel WW, Lougaris V, Plebani A, Hammarstrom L, Recher M, Germeis AE, Grimbacher B, Warnatz K, Rolink AG, Schneider P, Notarangelo LD, Eibel H. A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; pii: S0091-6749:01840-X. doi: 10.1016. Epub ahead of print.
- <sup>104</sup> Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-**Hammarström Q**, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, **Schäffer AA**, **Hammarström L**, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005; 37: 820-828.
- <sup>105</sup> Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, Bergbreiter A, Du L, Lu J, Rezaei N, Amirzargar AA, Moin M, Salzer U, Pan-**Hammarström Q**, **Hammarström L**. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2009; 29: 777-785.
- <sup>106</sup> Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, Bussel J, Cunningham-Rundles C. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1178-1185.
- <sup>107</sup> Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-**Hammarström Q**, Jennings S, Lougaris V, Bergbreiter A, Hagen T, Birmelin J, Plebani A, Webster AD, Peter HH, Suez D, Chapel H, McLean-Tooke A, Spickett GP, Anover-Sombke S, Ochs HD, Urschel S, Belohradsky BH, Ugrinovic S, Kumararatne DS, Lawrence TC, Holm AM, Franco JL, Schulze I, Schneider P, Gertz EM, **Schäffer AA**, **Hammarström L**, Thrasher AJ, Gaspar HB, Grimbacher B. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009; 113: 1967-1976.
- <sup>108</sup> Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest* 2007; 117: 1550-1557.
- <sup>109</sup> Lee JJ, Jabara HH, Garibyan L, Rauter I, Sannikova T, Dillon SR, Bram R, Geha RS. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1234-1241.
- <sup>110</sup> Castigli E, Geha RS. Molecular basis of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 740-746.

- 
- <sup>111</sup> Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K **Dräger R**, Eibel H, Fischer B, **Schäffer AA**, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003; 4: 261-268.
- <sup>112</sup> Wong SC, Oh E, Ng CH, Lam KP. Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2. *Blood* 2003; 102: 1381-1388.
- <sup>113</sup> Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4: 22-47.
- <sup>114</sup> Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1999; 86: 2684-2492.
- <sup>115</sup> Ishibe N, Sgambati MT, Fontaine L, Goldin LR, Jain N, Weissman N, Marti GE, Caporaso NE. Clinical characteristics of familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 99-108.
- <sup>116</sup> Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2005; 352: 804-815.
- <sup>117</sup> 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: 1848-1854.
- <sup>118</sup> Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2105-2111.
- <sup>119</sup> Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625-1638.
- <sup>120</sup> Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515-1525.
- <sup>121</sup> Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; 113: 1008-1016.
- <sup>122</sup> Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; 200: 519-525.
- <sup>123</sup> Scupoli MT, Pizzolo G. Signaling pathways activated by the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2012; 5: 341-348.
- <sup>124</sup> Oppezzo P, Dighiero G. Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J* 2013; 3: e149.
- <sup>125</sup> Kiaii S, Choudhury A, Mozaffari F, Rezvany R, Lundin J, Mellstedt H, Osterborg A. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: long-term effects of fludarabine and alemtuzumab treatment. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1229-1238.
- <sup>126</sup> Grdisa M. Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro. *Leuk Res* 2003; 27: 951-956.
- <sup>127</sup> He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLYS and APRIL. *J Immunol* 2004; 172: 3268-3279.
- <sup>128</sup> Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002; 100: 2973-2979.
- <sup>129</sup> Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, Ajchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP. Involvement of BAFF and APRIL in the

---

resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004; 103: 679-688.

<sup>130</sup> Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* 2005; 106: 1012-1020.

<sup>131</sup> Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W, Gross JA, Greipp PR, Jelinek DF. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 2004; 103: 689-694.

<sup>132</sup> Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* 2005; 106: 1012-1020.

<sup>133</sup> Endo T, Nishio M,ENZLER T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, Karin M, Kipps TJ. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Blood* 2007; 109: 703-710.

<sup>134</sup> Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, Szczepanek EW, Sieklucka M, **Dmoszyńska A Roliński J**. BAFF and APRIL expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with biological and clinical features. *Leuk Res* 2009; 33: 1319-1327.

<sup>135</sup> Planelles L, Castillo-**Gutiérrez S**, Medema JP, Morales-Luque A, Merle-**Béral H**, Hahne M. APRIL but not BlyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. *Haematologica* 2007; 92: 1284-1285.

<sup>136</sup> Tecchio C, Nichele I, Mosna F, Zampieri F, Leso A, Al-Khaffaf A, Veneri D, Andreini A, Pizzolo G, Ambrosetti A. A proliferation-inducing ligand (APRIL) serum levels predict time to first treatment in patients affected by B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2011; 87: 228-234.

<sup>137</sup> Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM, Harder B, Ristow KM, Bram RJ, Jelinek DF, Gross JA, Ansell SM. Expression of BlyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* 2004; 104: 2247-2253.

<sup>138</sup> Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M, Surdacha A, Kusz ML, Szczepanek EW, **Dmoszyńska A, Roliński J**. The role of TACI expression in Chronic lymphocytic leukemia. *Centr Eur J Immunol* 2011; 36: 46-50.

<sup>139</sup> Briones J, Timmerman JM, Hilbert DM, Levy R. BlyS and BlyS receptor expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 2002; 30: 135-141.

<sup>140</sup> Mihalcik SA, Tschumper RC, Jelinek DF. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. *Cell Cycle* 2010; 9: 4884-4892.

<sup>141</sup> Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 235-246.

<sup>142</sup> WHO Scientific Group. Primary Immunodeficiency diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 1-28.

<sup>143</sup> Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF, Dewald GW, Byrd JC, Farag S, Lucas M, Lin T. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 193-213.

<sup>144</sup> Doody GM, Dempsey PW, Fearon DT. Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and Fc gamma RIIB1. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 378-382.

<sup>145</sup> Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.

<sup>146</sup> Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167-190.

<sup>147</sup> Hojo H, Sasaki Y, Nakamura N, Abe M. Absence of somatic hypermutation of immunoglobulin heavy chain variable region genes in precursor B-lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 673-682.

<sup>148</sup> Molica S, Vitelli G, Levato D, Crispino G, Dell'Olio M, Dattilo A, Matera R, Gandolfo GM, Musto P. CD27 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cellular expression, serum release

- 
- and correlation with other soluble molecules belonging to nerve growth factor receptors (NGFr) superfamily. *Haematologica* 1998; 83: 398-402.
- <sup>149</sup> Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99: 4087-4093.
- <sup>150</sup> Argentou N, Vassilopoulos G, Ioannou M, Germenis AE, Speletas M. Rapid detection of MYD88-L265P mutation by PCR-RFLP in B-cell lymphoproliferative disorders. *Leukemia* 2013; doi: 10.1038/leu.2013.294.
- <sup>151</sup> Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 2011; 118: 3470-3478.
- <sup>152</sup> Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: what do we really know? *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 466-471.
- <sup>153</sup> Buckley RH. Immunoglobulin G subclass deficiency: fact or fancy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2: 356-360.
- <sup>154</sup> Bacchelli C, Buckland KF, Buckridge S, Salzer U, Schneider P, Thrasher AJ, Gaspar HB. The C76R transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor mutation disrupts antibody production and B-cell homeostasis in heterozygous and homozygous mice. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1253-9.e13.
- <sup>155</sup> Morell A. Clinical relevance of IgG subclass deficiencies. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; 52: 49-52.
- <sup>156</sup> Kantor AB, Stall AM, Adams S, Watanabe K, Herzenberg LA. De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol* 1995; 7: 55-68.
- <sup>157</sup> Förster I, Gu H, Rajewsky K. Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *Embo J* 1988; 7: 3693-703.
- <sup>158</sup> LeMaout J, Manavalan JS, Dyllal R, Szabo P, Nikolic-Zugic J, Weksler ME. Cellular basis of B cell clonal populations in old mice. *J Immunol* 1999; 162: 6384-6391.
- <sup>159</sup> Wortis HH, Teutsch M, Higer M, Zheng J, Parker DC. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3348-3352.
- <sup>160</sup> Kocks C, Rajewsky K. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 537-559.
- <sup>161</sup> Fischer M, Klein U, Küppers R. Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V<sub>k</sub> genes lacking somatic mutation. *J Clin Invest* 1997; 100: 1667-1676.
- <sup>162</sup> Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-1647.
- <sup>163</sup> Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J, Küppers R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; 209: 2183-2198.
- <sup>164</sup> Ferrer G, Bosch R, Hodgson K, Tejero R, Roué G, Colomer D, Montserrat E, Moreno C. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *Br J Haematol* 2013; doi: 10.1111/bjh.12645.
- <sup>165</sup> Capello D, Zucchetto A, Degan M, Bomben R, Dal Bo M, Efremov DG, Laurenti L, Del Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Immunophenotypic characterization of IgVH3-72 B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Leuk Res* 2006; 30: 1197-1199.
- <sup>166</sup> Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 96-103.
- <sup>167</sup> Theodorou M, Speletas M, Mamara A, Papachristopoulou G, Lazou V, Scorilas A, Katsantoni E. Identification of a STAT5 target gene, Dpf3, provides novel insights in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2013; 8: e76155.

- 
- <sup>168</sup> Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *Plos One* 2013; 8: e60370.
- <sup>169</sup> Yang S, Zou ZJ, Li YY, Zhang LN, Han TT, Fan L, Xu W, Li JY. Prognostic significance of serum immunoglobulin paraprotein in chronic lymphocytic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2012 ; 33: 795-800.
- <sup>170</sup> Hanson CA, Gribbin TE, Schnitzer B, Schlegelmilch JA, Mitchell BS, Stoolman LM. CD11c (LEU-M5) expression characterizes a B-cell chronic lymphoproliferative disorder with features of both chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood* 1990; 76: 2360-2367.
- <sup>171</sup> Wormsley SB, Baird SM, Gadol N, Rai KR, Sobol RE. Characteristics of CD11c+CD5+ chronic B-cell leukemia and the identification of novel peripheral blood B-cell subsets with chronic lymphoid leukemia immunophenotypes. *Blood* 1990; 76: 123-130.
- <sup>172</sup> Hubl W, Iturraspe J, and Braylan R.C, FMC7 Antigen Expression on Normal and Malignant B-Cells can be Predicted by Expression of CD20. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1998; 34: 71 –74.
- <sup>173</sup> Deans J.P, Polyak M.J. FMC7 is an epitope of CD20. *Blood* 2008;111: 2492.
- <sup>174</sup> Fang C, Zhuang Y, Wang L, Fan L, Wu Y L, Zhang R, Zou Z J, Zhang L N, Yang S, Xu W and Li J W High levels of CD20 expression predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Science* 2013 ;104: 996-1001.
- <sup>175</sup> Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, Jorgensen JL, Ferrajoli A, Wierda WG, Lerner S, O'Brien S, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol.* 2008; 141: 36–40.
- <sup>176</sup> Davidson A. Targeting BAFF in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 732-739.
- <sup>177</sup> Mackay F, Silveira PA, Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 327-336.
- <sup>178</sup> Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24: 203-215.
- <sup>179</sup> Ferrer G, Hodgson K, Montserrat E, Moreno C. B cell activator factor and a proliferation-inducing ligand at the cross-road of chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1075-1082.