

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΑΘΑΚΗΣ

## ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

ΤΑΤJANA SMILEVSKA  
ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ  
ΜΑΪΟΣ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 7741/1  
Ημερ. Εισ.: 16-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
616.994 19  
SMI

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083794

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΑΘΑΚΗΣ

**ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ**

ΤΑΤJANA SMILEVSKA  
ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ  
ΜΑΪΟΣ 2005

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΑΘΑΚΗΣ**

**ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ**

**ΤΑΤJANA SMILEVSKA  
ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ  
ΜΑΪΟΣ 2005**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Νικόλαος Σταθάκης, Καθηγητής Παθολογίας  
Παναγούλα Κόλλια, Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας  
Ασπασία Τσέζου, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Νικόλαος Σταθάκης, Καθηγητής Παθολογίας  
Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Καθηγητής Πνευμονολογίας  
Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής  
Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας  
Αναστάσιος Γερμενής, Αναπλ. Καθηγητής Ανοσολογίας  
Παναγούλα Κόλλια, Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας  
Ασπασία Τσέζου, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

	Σελίδα
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	7
<b>ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	11
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	14
1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	14
2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	19
3. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J	24
3.1 Μοριακός μηχανισμός	24
3.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στον ανασυνδυασμό V(D)J	27
4. Η ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗ Β-ΛΕΜΦΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	29
4.1 Η ανεξάρτητη από το αντιγόνο φάση διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων	29
4.2 Η εξαρτώμενη από το αντιγόνο φάση διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων	35
4.2.1 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση	36
4.2.2 Μεταστροφή ισοτύπου	39
5. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	42
5.1 Εισαγωγή	42
5.2 Γενετικές ανωμαλίες στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	43
5.3 Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	45
5.4 Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	46
5.5 Ενεργοποίηση και στάδια ωρίμανσης των λευχαιμικών κυττάρων στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	47
5.6 Ανοσοφαινοτυπικές μελέτες	48
5.7 Μήκος των τελομεριδίων και έκφραση της τελομεράσης	50

5.8 Μεταβίβαση σήματος μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα στα λευχαιμικά κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας	50
<b>6. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ</b>	<b>52</b>
6.1 Μεταβολισμός του σιδήρου και υποδοχείς τρανσφερρίνης	52
6.2 Υποδοχείς τρανσφερρίνης και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	57
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>59</b>
<b>ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	<b>60</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b>	
1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα	60
2. Απομόνωση DNA	60
3. Απομόνωση RNA	61
4. Σύνθεση cDNA	61
5. Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	64
6. Καθαρισμός των προϊόντων PCR	66
7. Ανάλυση αλληλουχίας των προϊόντων PCR	67
8. Ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων στα αναδιαταγμένα γονίδια της μεταβλητής περιοχής των ανοσοσφαιρινών	67
9. Προσδιορισμός του αριθμού των μορίων του TfR στην κυτταρική επιφάνεια με κυτταρομετρία ροής	71
10. Ποιοτική μοριακή ανάλυση της έκφρασης του TfR	72
11. Ποσοτική μοριακή ανάλυση της έκφρασης του TfR1 με την τεχνική της συναγωνιστικής PCR	73
12. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του TfR με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	74
12.1 Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	74
12.2 Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (TfR) με την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.	83



<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	88
1. Ρεπερτόριο IGKV	89
2. Ανάλυση της περιοχής KCDR3	93
3. Ανάλυση κατανομής σωματικών μεταλλάξεων - Επιλογή από αντιγόνο	99
4. Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα τρανσφερίνης -1, -2 (TfR-1, -2) στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	107
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
<b>A. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ IGKV-J ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ</b>	118
1. Ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGKV	118
2. Δημιουργία ποικιλότητας στις συμβολές των εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J	123
3. Επιλεκτική χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ	124
4. Ανάλυση των σωματικών μεταλλάξεων	125
5. Ομόλογες υποομάδες	128
6. Αυτοαντιδραστικά αντισώματα και κυτταρική προέλευση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας	131
<b>B. ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗΣ</b>	133
<b>ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	138
<b>ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ SUMMARY</b>	140
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	142

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο. Χαρακτηρίζεται από σταδιακή συγκέντρωση μικρών, ώριμων λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών και στους λεμφικούς ιστούς. Τα περισσότερα από τα κύτταρα διαιρούνται αργά, έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο (CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> Β λεμφοκύτταρα) και φέρουν στην επιφάνεια τους χαμηλά επίπεδα επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Δεν υπάρχει σαφής γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη ΧΛΛ, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κάποια κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία ανάμεσα στους ασθενείς. Έτσι, η αιτιολογία της νόσου είναι μέχρι τώρα άγνωστη.

Τα δύο κύρια κλινικά συστήματα σταδιοποίησης για τη ΧΛΛ (Rai και Binet) αναπτύχθηκαν για να διαχωρίσουν την κλινική ετερογένεια της ασθένειας. Παρότι έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την επιβίωση, δεν ήταν ικανά να προβλέπουν με ακρίβεια αν οι ασθενείς που είναι σε πρώιμο στάδιο ή έχουν μέτριο κίνδυνο θα έχουν πιο ήπια εξέλιξη της νόσου ή αν η νόσος θα έχει επιθετική συμπεριφορά και θα εξελιχθεί γρηγορότερα. Τα συστήματα σταδιοποίησης Binet και Rai συμπληρώνονται από πρόσφατα ευρήματα που υποδιαιρούν περαιτέρω τη ΧΛΛ. Οι περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο ήπια εξέλιξη και υψηλότερη ολική επιβίωση. Αντίθετα, οι ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτες αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών έχουν πιο δυσμενή εξέλιξη.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, η ΧΛΛ θεωρείται ετερογενής νόσος σε κυτταρικό επίπεδο και μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο υποομάδες ανάλογα με την παρουσία ή μη σημαντικού αριθμού μεταλλάξεων. Οι διάφορες αυτές μπορεί να υποδεικνύουν ότι οι πρόδρομοι των λευχαιμικών κυττάρων στη ΧΛΛ διεγέρθηκαν από διαφορετικούς τύπους αντιγόνου πριν την λευχαιμική εξαλλαγή ή ότι οι πρόδρομοι μεταμορφώθηκαν σε λευχαιμικά κύτταρα σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια της Β λεμφικής σειράς.

Οι ανοσοφαινοτυπικές μελέτες υποδεικνύουν ότι όλα τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και είναι ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά σε όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ υπερεκφράζουν τους δείκτες ενεργοποίησης CD23, CD25, CD69 και CD71 και υποεκφράζουν δείκτες που καταστέλλονται μετά από κυτταρική διέγερση και ενεργοποίηση, όπως οι CD22, FcγRIIb, CD79b και IgD. Το CD71 (υποδοχέας της τρανσφερίνης, transferrin receptor, TfR-1) είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εισάγει σίδηρο στα κύτταρα. Πρόσφατα, κλωνοποιήθηκε ένας δεύτερος τύπος TfR (TfR-2) με δύο ισομορφές (α και β). TfR2-β mRNA ανιχνεύεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η κατανομή του TfR2-α είναι πιο περιορισμένη.

Στον άνθρωπο, η ανάλυση των αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK σε φυσιολογικά IgM+ B λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος αποκάλυψε ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV εμφανίζει ιδιαίτερη επιλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, παρά τον μεγάλο αριθμό των γονιδίων που δυνητικά προσφέρονται για αναδιατάξεις IGKV-J, παρατηρείται επιλεκτική χρησιμοποίηση ορισμένων μόνο γονιδίων IGKV. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι μερικά γονίδια IGKV ικανά να συνδέονται με μια ποικιλία αντιγόνων έχουν αποκτήσει «εξελικτικό πλεονέκτημα» έναντι των υπολοίπων και για το λόγο αυτό υπεραντιπροσωπεύονται στο ρεπερτόριο συγκεκριμένων υποπληθυσμών φυσιολογικών, αυτοαντιδραστικών ή νεοπλασματικών B λεμφοκυττάρων.

Τα λευχαιμικά B λεμφοκύτταρα μπορεί να θεωρηθούν ως *in vivo* μοντέλο “μεμονωμένου κυττάρου”: έτσι, προσφέρονται για την ανάλυση των μηχανισμών αναδιάταξης και έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων. Στην παρούσα μελέτη, αναλύσαμε τις αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK σε μια ομάδα 180 ασθενών με τυπική ΧΛΛ. Εξετάσαμε το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV σε εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGK, τα χαρακτηριστικά των συμβολών, το φορτίο των μεταλλάξεων σε αναδιατάξεις IGKV-J και ενδείξεις επιλογής από αντιγόνο. Επίσης, μελετήσαμε την έκφραση δεικτών ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων, με ιδιαίτερη έμφαση στον υποδοχέα της τρανσφερρίνης (CD71) και εξετάσαμε τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασής του στη ΧΛΛ.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ν. Σταθάκη. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Σταθάκη για την πολύπλευρη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση της κας. Παναγούλας Κόλλια, Επικ. Καθηγήτριας Βιολογίας. Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κα. Κόλλια για την καθοδήγηση και την υποστήριξή της. Επίσης ευχαριστώ την κα. Ασπασία Τσέζου, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής της διατριβής για την εμπιστοσύνη της. Σημαντικό μέρος του ερευνητικού πρωτοκόλλου εφαρμόστηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου» που διευθύνουν οι κύριοι Αθανάσιος Φάσσας και Αχιλλέας Αναγνωστόπουλος. Υλικό της μελέτης προέρχεται επίσης και από το αρχείο του Αιματολογικού Τμήματος του ΠΓΝ Νίκαιας, που διευθύνει ο κ. Νικόλαος Λαουτάρης. Επιθυμώ να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στους

διευθυντές των δύο Τμημάτων για τη δυνατότητα που μου προσέφεραν και την συνεχή υποστήριξη που παρείχαν στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Η παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε χάρη στην πολύτιμη συνδρομή των φίλων συνεργατών μου:

- ο κ. Κώστας Σταματόπουλος, Αιματολόγος, Συνεργάτης του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», με καθοδήγησε στα πρώτα βήματά μου, παρακολούθησε ενεργά τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής και μοιράστηκε μαζί μου τις σκέψεις και τις ιδέες του.
- η κα. Χρυσούλα Μπέλεση, Βιοπαθολόγος, Επιμελήτρια του Αιματολογικού Τμήματος του ΠΓΝ Νίκαιας, ήταν εκείνη που έδωσε τις λύσεις σε όλα τα μεθοδολογικά και άλλα προβλήματα που ανέκυψαν στην εξέλιξη της μελέτης.
- ο κ. Ιωάννης Ζορμπάς, Βιολόγος του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου» με τον ορθολογισμό και τη μεγάλη εργαστηριακή εμπειρία του συνέβαλε ουσιαστικά στη διεκπεραίωση μεγάλου μέρους των πειραμάτων.
- οι κυρίες Αναστασία Χατζηδημητρίου και Μαρία Σαμαρά, Βιολόγοι και υποψήφιοι διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και η κα. Βασιλική Δούκα, Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, με βοήθησαν ουσιαστικά καθόλη την εκπόνηση της διατριβής μου και ανέχθηκαν αδιαμαρτύρητα τις απαιτήσεις μου
- οι κυρίες Νίκη Σταυρογιάννη και Αναστασία Αθανασιάδου, Αιματολόγοι, Επιμελήτριες της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», σχολίασαν κριτικά, ενίσχυσαν και συμπλήρωσαν τις προσπάθειές μου.
- οι κυρίες Έφη Κωσταρέλη και Κατερίνα Χατζή, Βιολόγοι, προσέφεραν τις γνώσεις τους στην πληροφορική και συνέβαλαν στη μορφοποίηση του κειμένου.

Λάρισα, Μάιος 2005

## ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι αναδιατάξεις στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IGK, IGL) ρυθμίζονται σύμφωνα με το μοντέλο του αποκλεισμού αλληλομόρφου (allelic exclusion). Οι αναδιατάξεις έχουν «ιεραρχικό» χαρακτήρα: πρώτα αναδιατάσσεται ο γενετικός τόπος της κ-ελαφριάς αλυσίδας (IGK) και μόνο εάν αποτύχει η αναδιάταξη και στα δύο αλληλόμορφα IGK, ακολουθεί ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου της λ-ελαφριάς αλυσίδας (IGL). Στον άνθρωπο, η ανάλυση των αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK σε φυσιολογικά IgM<sup>+</sup> B λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος αποκάλυψε ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV εμφανίζει ιδιαίτερη επιλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, παρά τον μεγάλο αριθμό των γονιδίων που δυνητικά προσφέρονται για αναδιατάξεις IGKV-J, παρατηρείται επιλεκτική χρησιμοποίηση ορισμένων μόνο γονιδιακών τμημάτων. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι μερικά γονίδια IGKV ικανά να συνδέονται με μια ποικιλία αντιγόνων έχουν αποκτήσει «εξελικτικό πλεονέκτημα» έναντι των υπολοίπων και για το λόγο αυτό υπεραντιπροσωπεύονται στο ρεπερτόριο συγκεκριμένων υποπληθυσμών φυσιολογικών, αυτοαντιδραστικών ή νεοπλασματικών B λεμφοκυττάρων.

Τα λευχαιμικά B λεμφοκύτταρα μπορεί να θεωρηθούν ως *in vivo* μοντέλο “μεμονωμένου κυττάρου”: έτσι, προσφέρονται για την ανάλυση των μηχανισμών αναδιάταξης και έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων. Η ανάλυση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) αποκάλυψε την ύπαρξη τουλάχιστον δύο υποτύπων, που διακρίνονται με βάση την παρουσία ή μη σωματικών μεταλλάξεων στις αναδιατάξεις του γενετικού τόπου της βαριάς αλυσίδας (IGH). Η παρουσία και το φορτίο των μεταλλάξεων ποικίλει ανά περίπτωση: φαίνεται να ακολουθείται μια ιεραρχία με βάση τη γονιδιακή οικογένεια IGHV και το συγκεκριμένο γονίδιο IGHV της οικογένειας που εκφράζεται από τα λευχαιμικά κύτταρα. Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ διαφέρει από το ρεπερτόριο των φυσιολογικών CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Τα δεδομένα σχετικά με το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στη ΧΛΛ είναι πολύ περιορισμένα.

Οι ανοσοφαινοτυπικές μελέτες υποδεικνύουν ότι όλα τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και είναι ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά σε όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ υπερεκφράζουν τους δείκτες ενεργοποίησης CD23, CD25, CD69 και CD71 και υποεκφράζουν δείκτες που καταστέλλονται μετά από κυτταρική διέγερση και ενεργοποίηση, όπως οι CD22,

FcγRIIb, CD79b και IgD. Το CD71 (υποδοχέας της τρανσφερρίνης, transferrin receptor, TfR-1) είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εισάγει σίδηρο στα κύτταρα. Πρόσφατα, κλωνοποιήθηκε ένας δεύτερος τύπος TfR (TfR-2) με δύο ισομορφές (α και β). TfR2-β mRNA ανιχνεύεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η κατανομή του TfR2-α είναι πιο περιορισμένη.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η μοριακή και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Η μελέτη επικεντρώνεται σε δύο κύρια θέματα:

1. Ανάλυση των αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK
2. Ανάλυση της έκφρασης μορίων ενεργοποίησης, με έμφαση στον υποδοχέα της τρανσφερρίνης (CD71)

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



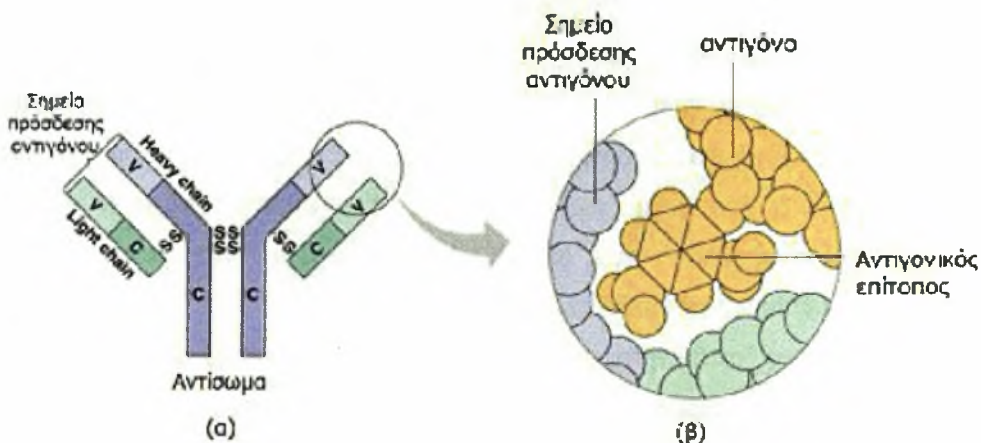
## 1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει και καταστρέφει τεράστιο αριθμό αντιγόνων. Τα Β λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα της ειδικής ανοσίας, τα οποία μέσω κατάλληλων υποδοχέων (ανοσοσφαιρίνες επιφάνειας) μπορούν να αναγνωρίσουν κάθε αντιγόνο με τεράστια ειδικότητα και να συμβάλλουν στην άνοση απάντηση του ξενιστή για την αποφυγή μιας άνοσης αντίδρασης στους ιστούς. Κάθε ανοσοσφαιρίνη προσδένεται ειδικά σ' ένα τμήμα του αντιγόνου, τον αντιγονικό επίτοπο: συνεπώς, για την αντιμετώπιση όλων των διαφορετικών αντιγόνων απαιτείται τεράστιος αριθμός εξειδικευμένων αντισωμάτων με μοναδική ειδικότητα.

Η επαρκής άνοση απάντηση προς ένα αντιγόνο αναπτύσσεται με κάποια καθυστέρηση η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα αποκτούν υποδοχείς με εξειδίκευση για το συγκεκριμένο αντιγόνο με σταδιακή διαδικασία. Οι κλώνοι των λεμφοκυττάρων πρέπει να επαυξηθούν (κλωνική επέκταση) προτού εκδηλωθεί ισχυρή άνοση απάντηση. Η αρχική καθυστέρηση αντισταθμίζεται στη συνέχεια, αφού πολυάριθμοι εξειδικευμένοι κλώνοι εκδηλώνουν ταχεία άνοση απάντηση. Στον άνθρωπο, καθημερινά παράγονται περίπου  $10^7$  καινούργια Β κύτταρα, καθένα από τα οποία εκφράζει μόνο μια ανοσοσφαιρίνη με ένα μόνο είδος βαριάς και ένα είδος ελαφριάς αλυσίδας. Το συνολικό ρεπερτόριο των αντιγονικών ειδικοτήτων είναι περίπου  $10^9$ , ενώ ο συνολικός αριθμός των Β κυττάρων σε έναν ενήλικο είναι περίπου  $10^{11}$ . Σε νέα έκθεση στο αντιγόνο, η άνοση απάντηση καθυστερεί λιγότερο επειδή το σύστημα έχει αποκτήσει άνοση μνήμη. Η ειδική ανοσία επίσης προϋποθέτει ικανότητα διάκρισης «εαυτού» - «ξένου» (self/non-self) ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο καταστροφής ιστών του ξενιστή. Έτσι, οι βασικότερες ιδιότητες της επίκτητης ανοσίας είναι η ειδικότητα, η ποικιλότητα, η μνήμη και η αυτοανοχή (self tolerance).

Το μόριο του αντισώματος έχει δυο διακριτές λειτουργίες. Η πρώτη είναι η ειδική πρόσδεση σε επιτόπους του παθογόνου που προκάλεσε την άνοση απάντηση, ενώ η δεύτερη είναι η επιστράτευση άλλων κυττάρων και μορίων για την καταστροφή του αντιγόνου μετά την πρόσδεση του αντισώματος σε αυτό. Η περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου ποικίλει πολύ ανάμεσα στα διαφορετικά αντισώματα και είναι γνωστή ως μεταβλητή περιοχή (variable region), ενώ η περιοχή για τη δεύτερη λειτουργική δράση του αντισώματος δεν ποικίλει κατά τον ίδιο τρόπο και ονομάζεται σταθερή περιοχή (constant region)(1). Όλα τα αντισώματα αποτελούνται από δυο ταυτόσημες βαριές και δυο ταυτόσημες ελαφριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 50 και 25 kDa αντιστοίχως. Οι δυο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφυδρικούς

δεσμούς αλλά και κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά αλυσίδα μ' έναν δισουλφυδρικό δεσμό (Εικόνες 1,2) (2).

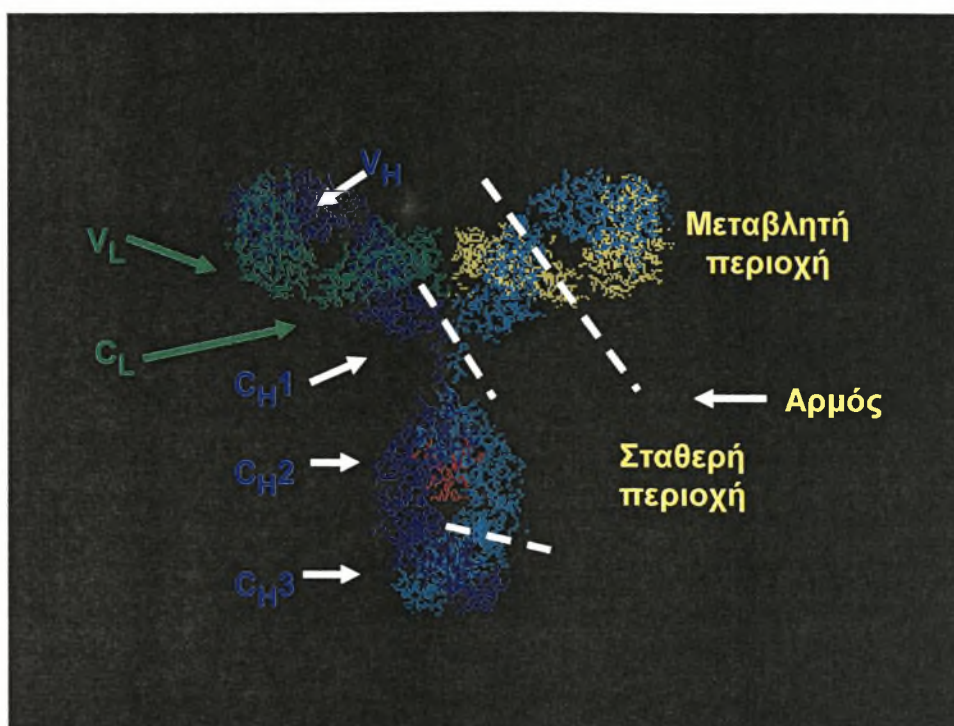


Εικόνα 1. (α) Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δυο ταυτόσημες βαριές και δυο ταυτόσημες ελαφριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Στην εικόνα φαίνονται οι δισουλφυδρικοί δεσμοί που συνδέουν τις αλυσίδες όπως και το σημείο πρόσδεσης του αντιγόνου, το οποίο σχηματίζεται από τις μεταβλητές περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. (β) Το σημείο πρόσδεσης του αντιγονικού επιτόπου σε μεγέθυνση.

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας, κ και λ, χωρίς γνωστές λειτουργικές διαφορές. Αντίθετα, υπάρχουν πέντε κύριες τάξεις βαριάς αλυσίδας, καθεμία από τις οποίες καθορίζει διαφορετική λειτουργία για το μόριο του αντισώματος. Οι πέντε διαφορετικές τάξεις των μορίων των ανοσοσφαιρινών είναι οι IgM, IgD, IgE, IgA, IgG, και οι βαριές αλυσίδες τους συμβολίζονται ως μ, δ, ε, α και γ, αντιστοίχως (3).

Η ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων των ανοσοσφαιρινών έδειξε ότι κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από δυο διακριτές πρωτεϊνικές περιοχές 110 αμινοξέων περίπου, ενώ οι βαριές αλυσίδες των IgA, IgD και IgG έχουν τέσσερις και οι IgM και IgE πέντε (4). Όλες αυτές οι περιοχές παρουσιάζουν παρόμοια πεπτιδικά μοτίβα, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν προέλθει από διπλασιασμό ενός αρχέγονου γονιδίου το οποίο αντιστοιχούσε σε μια πρωτεϊνική περιοχή. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η βασική δομή έχει προκαρυωτική προέλευση (5).

Η σύγκριση της αλληλουχίας αμινοξέων αποκαλύπτει ότι οι αμινοτελικές αλληλουχίες των βαριών και των ελαφρών αλυσίδων ποικίλουν σημαντικά ανάμεσα στα διαφορετικά αντισώματα. Οι διαφορές αυτές παρουσιάζονται στα πρώτα 110 αμινοξέα, δηλαδή στην πρώτη πρωτεϊνική περιοχή. Οι καρβοξυτελικές περιοχές είναι σταθερές τόσο μεταξύ των βαριών όσο και των ελαφρών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών του ίδιου τύπου. Οι μεταβλητές και οι σταθερές περιοχές ονομάζονται περιοχές V (variable) και C (constant), αντιστοίχως. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας δεν κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλη τη μεταβλητή περιοχή. Πολλά

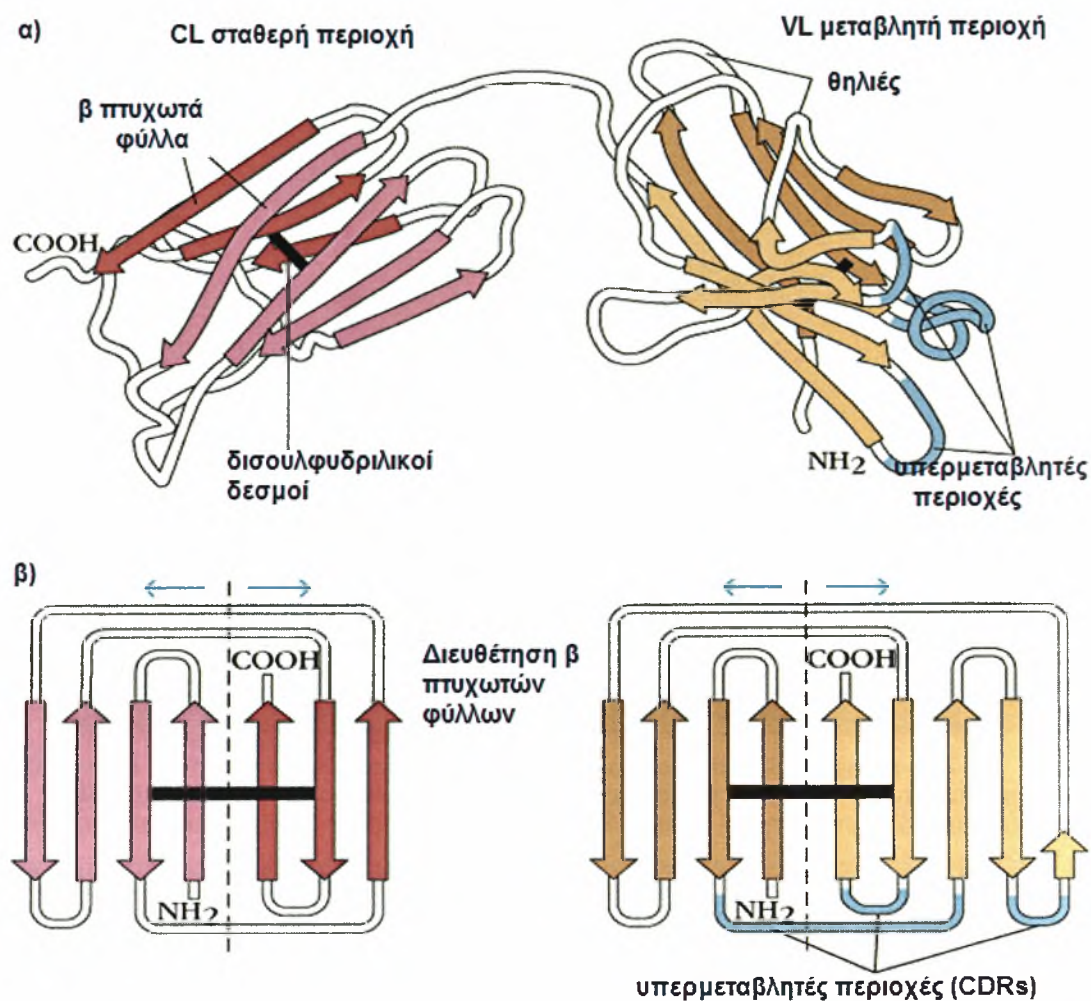


Εικόνα 2. Χωροπληρωτικό μοντέλο του μορίου της ανοσοσφαιρίνης που δείχνει την αλληλεπίδραση των μεταβλητών περιοχών της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Από IMGT.

αμινοξέα είναι συντηρημένα, ειδικά εκείνα που είναι σημαντικά για τον καθορισμό της τεταρτοταγούς δομής της μεταβλητής περιοχής. Οι σχετικά σταθερές περιοχές ονομάζονται **περιοχές πλαισίου** (framework regions, *FRs*) και ορίζονται ως FR1, FR2, FR3 και FR4. Οι περιοχές πλαισίου σχηματίζουν β πτυχωτά φύλλα που σχηματίζουν ένα «ικρίωμα» (scaffold) για το μόριο. Η μεταβλητή περιοχή περιλαμβάνει επίσης τρεις υποπεριοχές στις οποίες παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα. Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν σε τρεις θηλιές (loops), στο ένα άκρο κάθε φύλλου, που τοποθετούνται παράπλευρα στη διπλωμένη πρωτεΐνη (Εικόνα 3,5) (4). Έτσι σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η ποικιλότητα εστιάζεται σ' ένα συγκεκριμένο τμήμα της επιφάνειας της πρωτεΐνης. Οι θηλιές αυτές έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο και επειδή καθορίζουν την ειδικότητα πρόσδεσης του αντιγόνου ονομάζονται επίσης **περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας** (complementarity determining regions, *CDRs*) (6). Έτσι, σε κάθε αντίσωμα το λειτουργικό σημείο πρόσδεσης του αντιγόνου αποτελείται από τις περιοχές CDRs της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας (Εικόνα 4). Η συνεισφορά και των δύο αλυσίδων στην διαμόρφωση της αντιγονικής ειδικότητας συμβάλλει στη ποικιλότητα των αντιγονικών ειδικοτήτων και ονομάζεται συνδυαστική ποικιλότητα (combinatorial diversity).

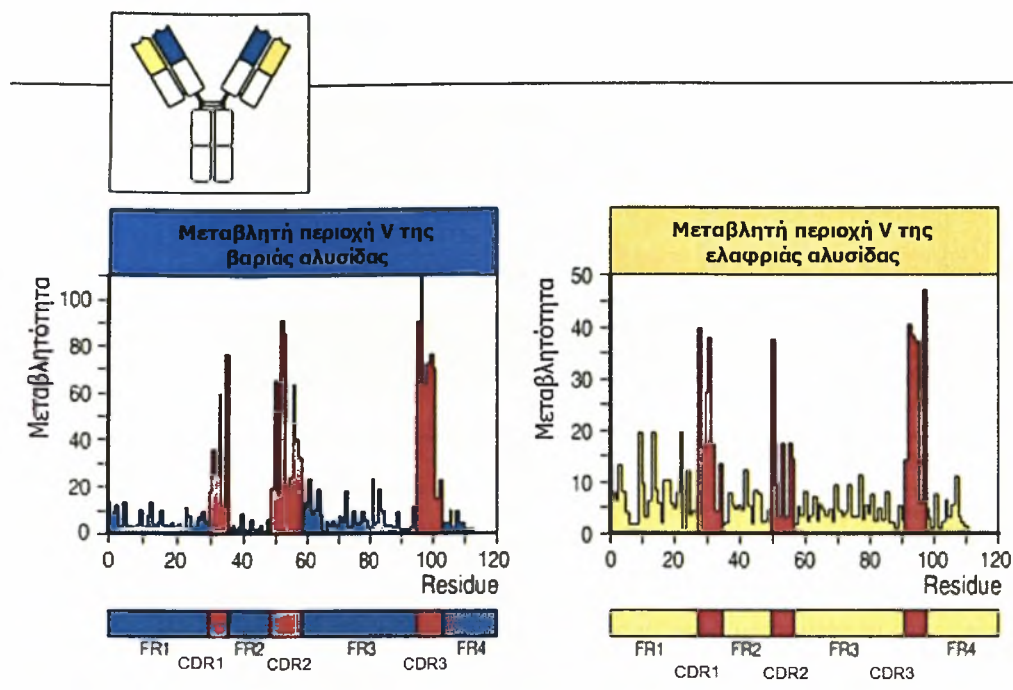
Η δημιουργία ενός μεγάλου ρεπερτορίου αντισωμάτων με διαφορετική ειδικότητα προϋποθέτει και άλλους μηχανισμούς για την ανάπτυξη ετερογένειας. Παλαιότερα, όταν δεν υπήρχε η δυνατότητα της άμεσης εξέτασης των γονιδίων των



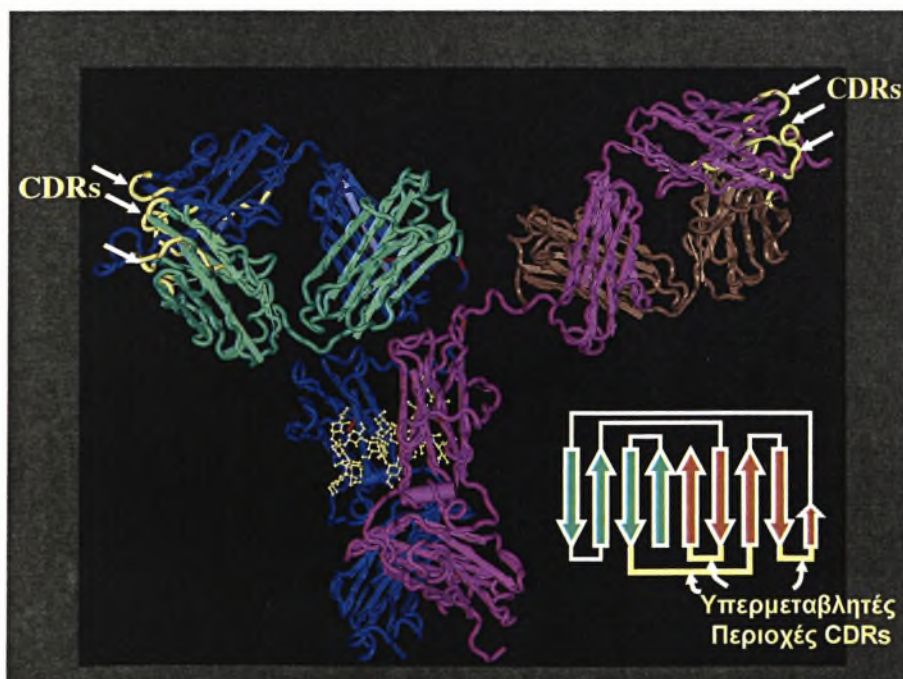


Εικόνα 3. Η πρωτεϊνική δομή της μεταβλητής και σταθερής περιοχής της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Κάθε περιοχή σχηματίζει μια πτυχωμένη σφαιρική δομή. Επισημαίνονται οι περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs)

ανοσοσφαιρινών, είχαν διατυπωθεί δύο βασικές υποθέσεις για την προέλευση της ετερογένειας. Σύμφωνα με τη θεωρία της βλαστικής σειράς (germline theory), για κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης υπήρχε ένα ξεχωριστό γονίδιο και το ρεπερτόριο των αντισωμάτων, σε μεγάλο βαθμό, μεταβιβαζόταν κληρονομικά. Αντίθετα η θεωρία των σωματικών μεταλλάξεων (somatic mutation theory) βασίστηκε στην ιδέα ότι υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός γονιδίων ανοσοσφαιρινών, τα οποία υφίστανται μεταλλάξεις στα Β κύτταρα κατά την διάρκεια της ζωής ώστε να δημιουργείται το παρατηρούμενο ρεπερτόριο. Η σύγχρονη έρευνα και η κλωνοποίηση πολλών γονιδίων ανοσοσφαιρινών απέδειξε ότι το ρεπερτόριο των αντισωμάτων δημιουργείται από μεγάλο αλλά συγκεκριμένο αριθμό γονιδίων τα οποία υφίστανται ανασυνδυασμό. Έτσι οι δυο παλιότερες υποθέσεις ερμηνεύουν μόνο ένα μέρος της ποικιλότητας των αντισωμάτων (7).



Εικόνα 4. Το σημείο πρόσδεσης του αντιγόνου σε κάθε αντίσωμα διαμορφώνεται από 6 CDRs (Complementarity-Determining Regions) τρεις από κάθε αλυσίδα. Το σχεδιάγραμμα μεταβλητότητας ή σχεδιάγραμμα Wu & Kabat (6) που παρουσιάζεται βασίζεται στη σύγκριση πολλών διαφορετικών ανοσοσφαιρινών. Οι περιοχές CDR που παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα διακρίνονται με κόκκινο, και πλαισιώνονται από τις πιο σταθερές περιοχές πλαισίου (framework regions, *FWRs*) με κίτρινο. Ο βαθμός μεταβλητότητας για τη θέση κάθε αμινοξέος στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας υπολογίζεται από το λόγο της συχνότητας των διαφορετικών αμινοξέων προς τη συχνότητα των πιο κοινών αμινοξέων.



Εικόνα 5. Χωροπληρωτικό μοντέλο της περιοχής πρόσδεσης του αντιγόνου. Διακρίνονται οι τρεις CDR περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Από IMGT.

## 2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

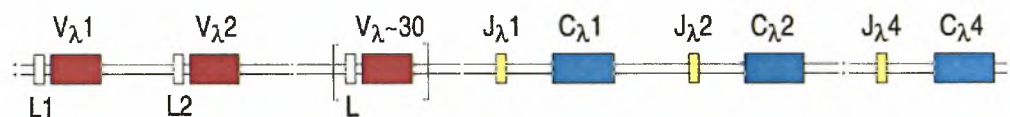
Οι βαριές και οι κ και λ ελαφριές αλυσίδες κωδικοποιούνται από διακριτές πολυγονιδιακές οικογένειες που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Πίνακας I) (8).

Πίνακας I. Γονιδιακοί τόποι και χρωμοσωμική εντόπιση

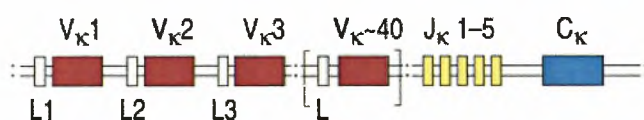
Γονιδιακοί τόποι	Αριθμός χρωμοσώματος
κ ελαφριά αλυσίδα	2
λ ελαφριά αλυσίδα	22
βαριά αλυσίδα H	14

Καθένας από αυτούς τους γενετικούς τόπους αποτελείται από μια σειρά γονιδιακών τμημάτων. Οι γενετικοί τόποι κ και λ περιλαμβάνουν γονιδιακά τμήματα **L** (Leader: οδηγό), **V** (Variable: μεταβλητό), **J** (Junctional: συνδετικό), και **C** (Constant: σταθερό). Οι αναδιαταγμένες περιοχές VJ συνθέτουν τις μεταβλητές περιοχές των ελαφριών αλυσίδων (Εικόνα 6).

Γενετικός τόπος λ ελαφριάς αλυσίδας - IGL



Γενετικός τόπος κ ελαφριάς αλυσίδας - IGK



Γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας - IGH



Εικόνα 6. Γονιδιακή οργάνωση των γονιδιακών τμημάτων στους τρεις γονιδιακούς τόπους της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας στον άνθρωπο.

Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IgH) περιλαμβάνει επιπλέον και τα γονιδιακά τμήματα **D** (Diversity: ποικιλότητα) ανάμεσα στα γονίδια V και J. Πριν από κάθε γονίδιο V υπάρχει μια μικρή *αλληλουχία-οδηγός*, η οποία κατευθύνει τις συντιθέμενες βαριές και ελαφριές αλυσίδες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η



αλληλουχία αυτή αφαιρείται από την αλυσίδα κατά την τελική επεξεργασία. Κάθε γονίδιο V διαχωρίζεται από το επόμενο με ένα ιντρόνιο. Η ίδια διάταξη υπάρχει και στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων. Ο αριθμός των λειτουργικών γονιδίων που υπολογίζεται για κάθε τόπο φαίνεται παρουσιάζεται στον πίνακα II (8).

Πίνακας II. Γονιδιακή σύσταση των γενετικών τόπων των ανοσοσφαιρινών

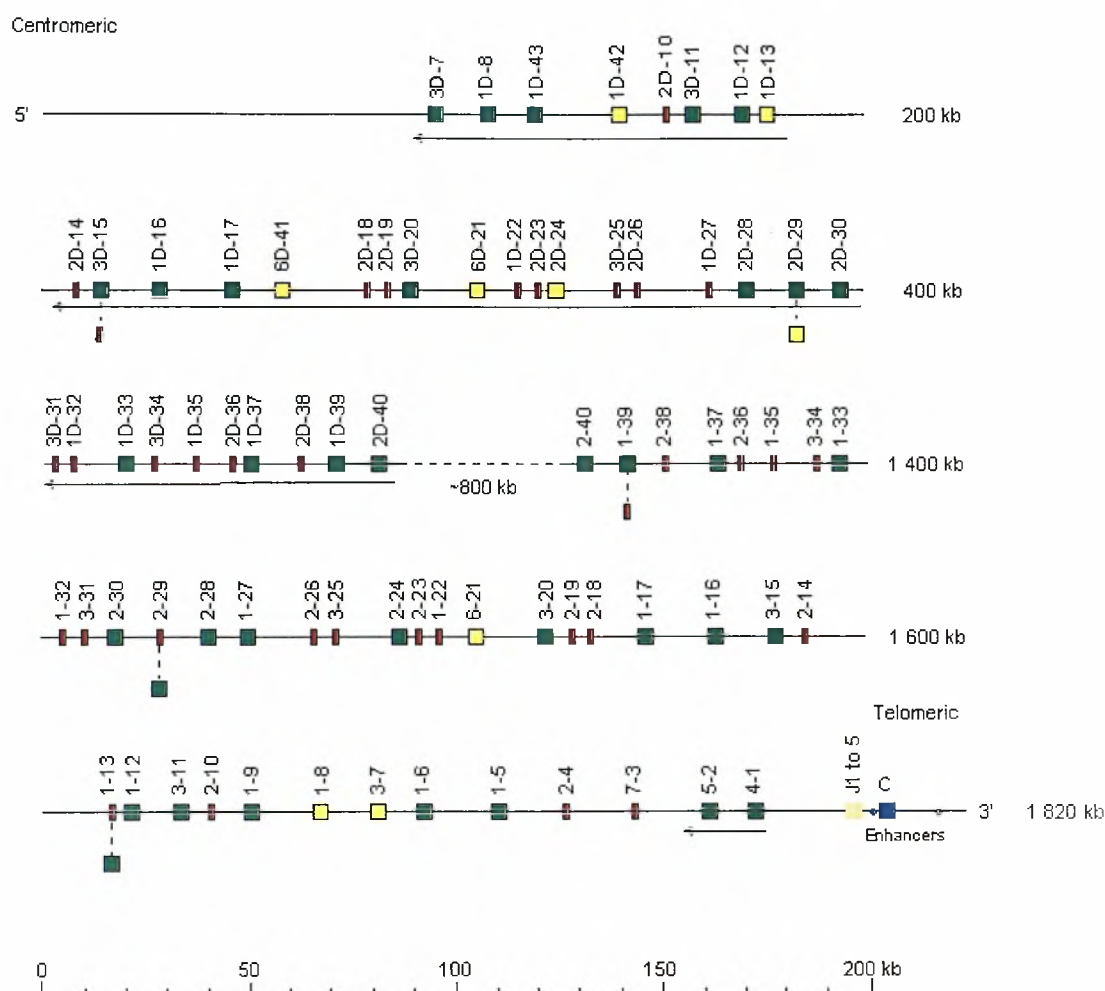
Γονίδιο	κ ελαφριά αλυσίδα	λ ελαφριά αλυσίδα	βαριά αλυσίδα H
Variable (V)	30-35	29-33	38-46
Diversity (D)	0	0	23
Junctional (J)	5	4-5	6
Constant (C)	1	4-5	9

Έτσι, η γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών επιτρέπει τον ανασυνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων V, D και J που δημιουργεί την ευρύτατη ποικιλότητα των ανοσοσφαιρινών και φαίνεται ότι έχει εξελιχθεί ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της πληθώρας περιβαλλοντικών λοιμογόνων μικροοργανισμών, τοξικών παραγόντων αλλά και αυτόλογων κακοήθων κύτταρων στα οποία εκτίθεται ένας οργανισμός (9).

## 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και οργάνωση του γενετικού τόπου της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

Στον άνθρωπο, ο γενετικός τόπος της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGK) περιλαμβάνει εκτεταμένες περιοχές γονιδίων IGKV και μια περιοχή IGKJ-IGKC. Ένα γονίδιο IGKV συνήθως περιλαμβάνει ρυθμιστικές αλληλουχίες πριν από την κωδικοποιητική αλληλουχία και μια αλληλουχία οδηγό (leader sequence) στο 5' άκρο της, ενώ στο 3' άκρο περιλαμβάνει την *αλληλουχία-σήμα του ανασυνδυασμού* (recombination signal sequence, RSS)(10). Στις ρυθμιστικές αλληλουχίες περιλαμβάνεται η αλληλουχία TATA (TATA box), μια διατηρημένη περιοχή πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη (εντοπίζεται 25-30 bp 5' από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και είναι σημαντική για τον καθορισμό της έναρξης της μεταγραφής), όπως επίσης και δεκανουκλεοτίδια και δεκαπεντανουκλεοτίδια, με σημαντικό βαθμό ομολογίας. Η αλληλουχία-σήμα του ανασυνδυασμού (RSS) στην 3' θέση κάθε IGKV γονιδίου αποτελείται από ένα 7μερές και ένα 9μερές που χωρίζονται από μια διαστηματική περιοχή (spacer) μήκους 12 bp. Σύμφωνα με τον κανόνα 12-23, ένα γενετικό τμήμα μπορεί να συνδεθεί μόνο με ένα άλλο τμήμα που έχει RSS με spacer

23 bp: έτσι διασφαλίζεται η σύνδεση των τμημάτων IGKV μόνο με τα τμήματα IGKJ και όχι με τις σταθερές περιοχές IGKC (11).



#### Υπόμνημα: γονίδια IGKV

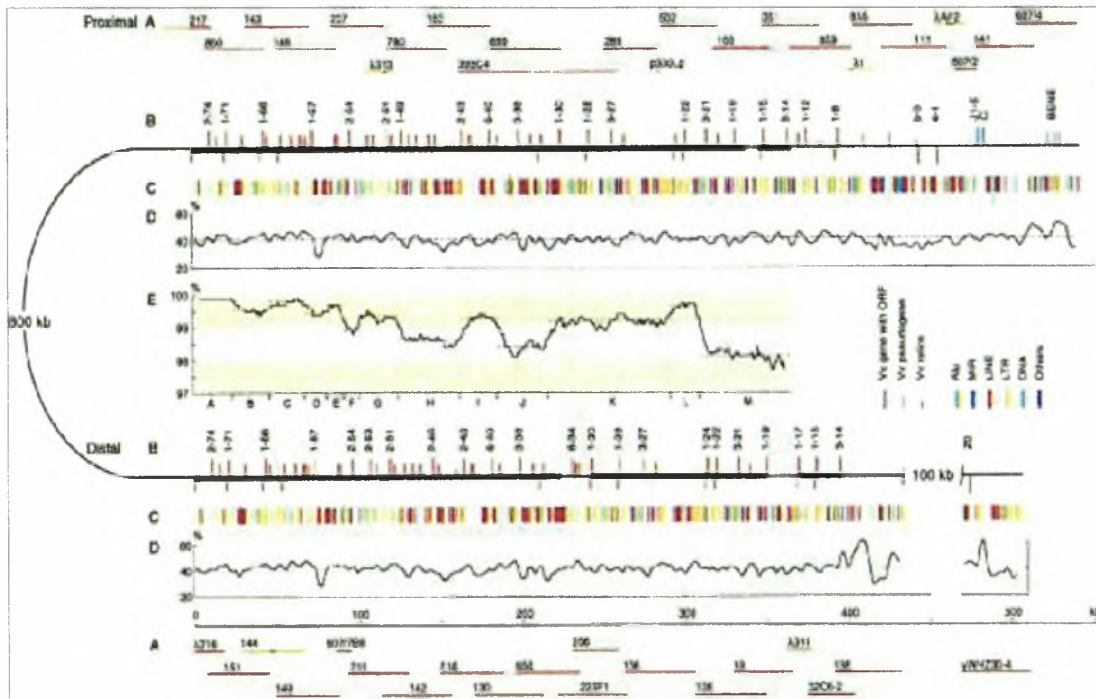
- Λειτουργικό γονίδιο
- Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)
- Ψευδογονίδιο (pseudogene)

Εικόνα 7. Αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδιακού τόπου της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGK) στη χρωμοσωμική θέση 2p11.2. Τα γονίδια δεν είναι σχεδιασμένα υπό κλίμακα ενώ τα εξόνια δεν φαίνονται. Στο 3' άκρο διακρίνονται τα γονίδια IGKV της J-proximal περιοχής ενώ στο 5' άκρο διακρίνονται τα γονίδια IGKV της IGKJ-distal περιοχής. Ο όρος ψευδογονίδιο χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια μη λειτουργική αλληλουχία DNA η οποία μοιάζει με γνωστό γονίδιο. Από αναφορά 154.

Στον άνθρωπο, ο γενετικός τόπος IGK εντοπίζεται στη χρωμοσωμική ζώνη 2p11.2 και εκτείνεται σε περιοχή 1820 kb (Εικόνα 7). Περιλαμβάνει 76 γονίδια IGKV που κατατάσσονται σε 7 διαφορετικές οικογένειες, 5 γονίδια IGKJ και ένα μοναδικό γονίδιο IGKC. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του γενετικού τόπου Igh είναι ο



διπλασιασμός του μεγαλύτερου τμήματος της περιοχής IGKV (Εικόνα 8). Έτσι τα γονίδια IGKV έχουν διαχωριστεί σε δυο συμπλέγματα ή αθροίσματα (clusters), το «εγγύς» ή IGKJ-proximal και το «άπω» ή IGKJ-distal (σε σχέση με την περιοχή IGKJ-IGKC). Το πρώτο περιλαμβάνει 40 γονίδια IGKV, ενώ το δεύτερο (πιο κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 2) περιλαμβάνει 36 γονίδια IGKV. Τα δύο αθροίσματα συνολικά περιέχουν 34 ζευγάρια γονιδίων με ομολογία αλληλουχίας 95-100%, ενώ υπάρχουν και 8 μοναδικά («αταίριαστα») γονίδια(12). Επίσης τα αθροίσματα έχουν αντίθετη πολικότητα 5'-3', δηλαδή είναι ανεστραμμένες επαναλήψεις. Το γεγονός αυτό προσδίδει στον γενετικό τόπο IGK συμμετρική δομή (8,9,11).



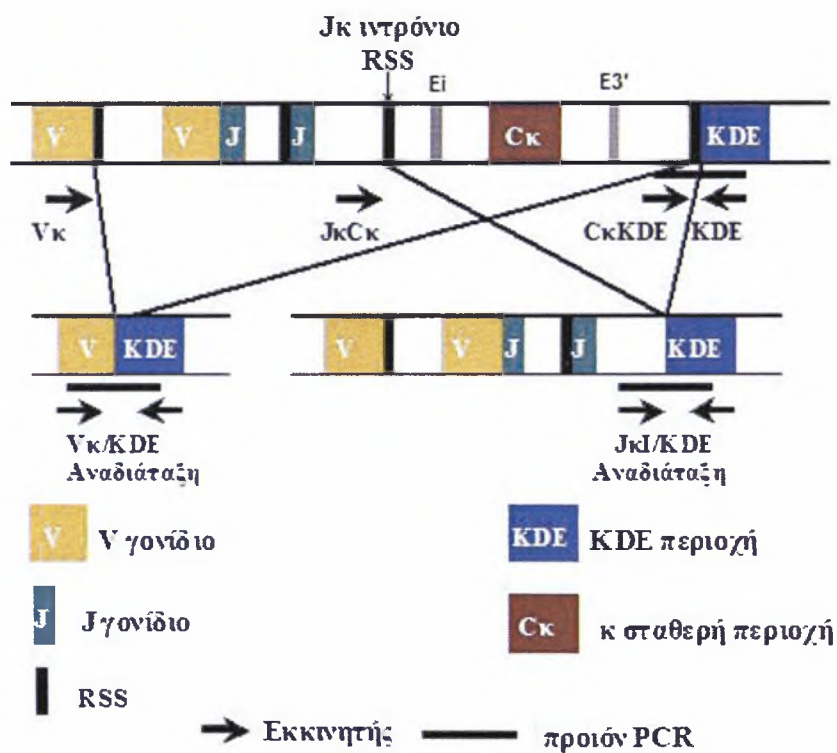
Εικόνα 8. Εκτενής αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδιακού τόπου IGK (Kawasaki et.al 2001). Ο χάρτης βασίζεται στα αποτελέσματα της ανάλυσης αλληλουχίας κλώνων κατά τη χαρτογράφηση του γενετικού τόπου. Η σύγκριση μεταξύ του J-proximal και του J-distal αθροίσματος (E) αποκάλυψε 13 περιοχές ομολογίας (A-M), γεγονός που υποδεικνύει ότι στο παρελθόν ο γενετικός τόπος Igk έχει διπλασιαστεί. Από αναφορά 154.

Σε κάθε απλοειδές γονιδίωμα, υπολογίζεται ότι υπάρχουν 31-35 λειτουργικά γονίδια IGKV που ανήκουν σε πέντε διαφορετικές υποοικογένειες. Από τα γονίδια αυτά δεν αναδιατάσσονται ούτε εκφράζονται όλα, ενώ βρέθηκε να αναδιατάσσονται και να εκφράζονται αλληλόμορφα κάποιων ελαττωματικών γονιδίων. Ο πολυμορφισμός των αλληλομόρφων του γενετικού τόπου IGK είναι περιορισμένος.

Η 5'-3' πολικότητα των γονιδίων IGKV υποδεικνύει τον τύπο της αναδιάταξης. Όλα τα γονίδια IGKV της distal περιοχής, και τα δυο γονίδια της proximal περιοχής που βρίσκονται πλησιέστερα προς τα τμήματα IGKJ ανασυνδυάζονται με αναστροφή

(inversion) επειδή έχουν αντίστροφη πολικότητα σε σχέση με τα γονίδια IGKJ-IGKC. Αντίθετα, όλα τα υπόλοιπα γονίδια IGKV ανασυνδυάζονται με απαλοιφή (deletion) του DNA που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα γονίδια IGKV και IGKJ (8,11).

Στο γενετικό τόπο IGK υπάρχει επίσης το στοιχείο διαγραφής κάππα ή KDE (kappa deleting element), το οποίο εντοπίζεται περίπου 24kb στο 3' του γονιδίου IGKC. Το KDE μπορεί ν' αναδιατάσσεται είτε με ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGKV (IGKV-KDE) που βρίσκεται στο 5' μιας αναδιάταξης IGKV-J (αν αυτή υπάρχει) είτε με το επταμερές της αλληλουχίας RSS στο ιντρόνιο IGKJ-IGKC (JKI-KDE)(13,14). Στην πρώτη περίπτωση έχουμε απώλεια (ή σπανίως αναστροφή) της πιθανής αναδιάταξης που παρεμβάλλεται και του τμήματος IGKC όπως και των ενισχυτών. Στη δεύτερη περίπτωση της αναδιάταξης με το JKI έχουμε απώλεια των τμημάτων IGKJ-IGKC και των ενισχυτών, όμως μια πιθανή αναδιάταξη IGKV-J παραμένει στο χρωμόσωμα. Οι αναδιατάξεις αυτές συμβαίνουν σύμφωνα με τον κανόνα 12-23 (13) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των αναδιατάξεων του KDE (kappa deleting element). Ei: ιντρονικός ενισχυτής, E3': 3' ενισχυτής. Επάνω παρουσιάζεται ο γενετικός τόπος κ με μια VκJκ αναδιάταξη και το KDE σε μη αναδιαταγμένη κατάσταση. Τα σημεία πρόσδεσης των εκκνητών που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των αναδιατάξεων του KDE ή την μη αναδιαταγμένη κατάσταση του στοιχείου αναπαρίστανται με βέλη. Κάτω παρουσιάζεται η διάταξη του γενετικού τόπου μετά τον ανασυνδυασμό.

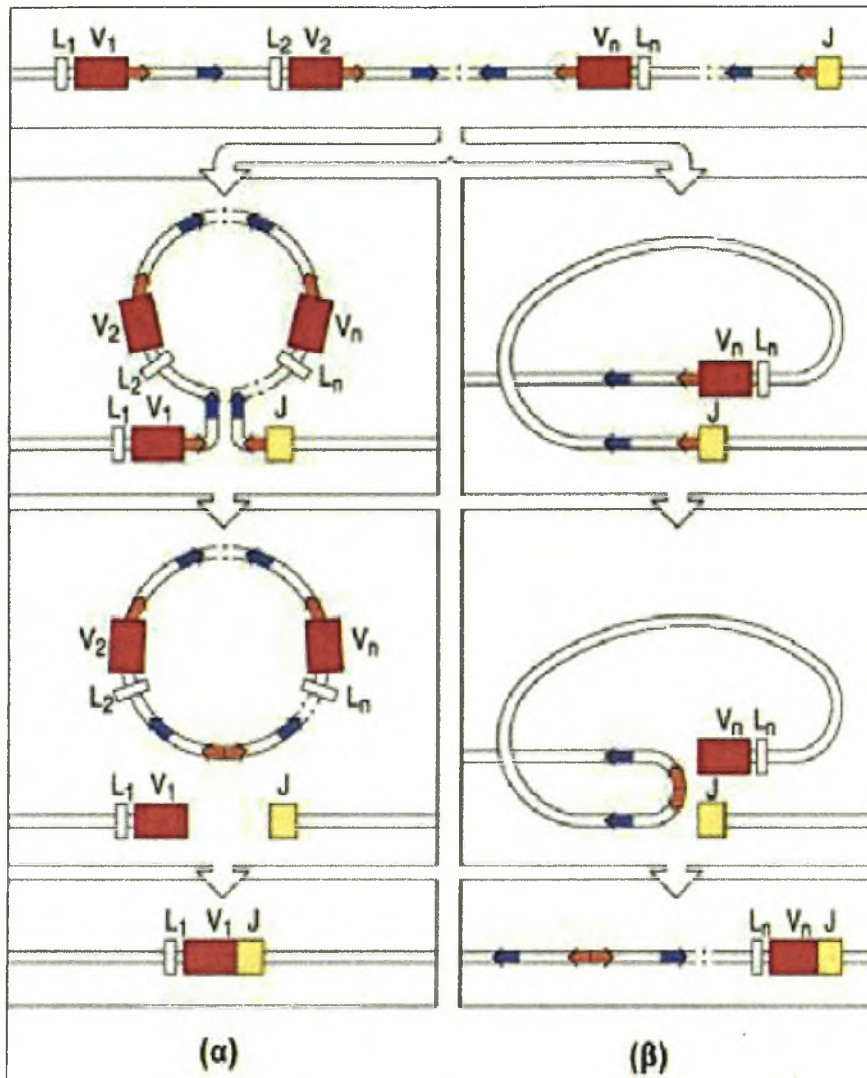
Οι αναδιατάξεις του ΚΔΕ φαίνεται ότι προκαλούν αδρανοποίηση του γενετικού τύπου ΙΓΚ με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η παραγωγή κ ελαφριάς αλυσίδας. Επειδή το ΚΔΕ δεν παράγει πρωτεΐνη (15-17), η μοναδική λειτουργία των αναδιατάξεων του ΚΔΕ φαίνεται πως είναι η απενεργοποίηση αναδιατάξεων ΙΓΚ πολλές από τις οποίες είναι λειτουργικές(15). Για το λόγο αυτό, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι αναδιατάξεις του ΚΔΕ «προετοιμάζουν το έδαφος» για την έκφραση της λ ελαφριάς αλυσίδας (17-18). Η ανάλυση των αναδιατάξεων των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο της εκτύπωσης κατά Southern (Southern blot) έδειξε ότι σε κύτταρα που εκφράζουν κ αλυσίδα ο γενετικός τύπος της λ ελαφριάς αλυσίδας σπάνια είναι αναδιαταγμένος, ενώ, αντίθετα, σε κύτταρα που εκφράζουν λ αλυσίδα οι γενετικοί τύποι ΙΓΚ είναι συχνότατα αναδιαταγμένοι και απενεργοποιημένοι από αναδιατάξεις με το ΚΔΕ (18-20).

### **3. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J**

#### **3.1 Μοριακός μηχανισμός**

Η διεργασία των αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών κατά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων ονομάζεται ανασυνδυασμός V(D)J. Ο ανασυνδυασμός V(D)J αρχίζει στο μυελό των οστών κατά την οντογένεση των Β λεμφοκυττάρων στη φάση διαφοροποίησης που είναι ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνου. Χαρακτηρίζεται από ιεραρχημένες αναδιατάξεις γονιδίων οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ενός γενετικού συμπλόκου V(D)J. Η επιτυχής αναδιάταξη των γονιδίων των βαριών αλυσίδων και στη συνέχεια των ελαφριών αλυσίδων (κ ή λ), δίνουν τη δυνατότητα στο αναπτυσσόμενο Β-λεμφοκύτταρο να εκφράσει τελικά ένα πλήρως λειτουργικό αντιγονικό υποδοχέα (ανοσοσφαιρίνη) (21-23).

Για να σχηματιστεί ένα πλήρες γονίδιο της μεταβλητής περιοχής μιας ελαφριάς αλυσίδας (VL), αντιπαρατίθεται ένα μεταβλητό τμήμα (V) με ένα τμήμα συνδετικό τμήμα (J-joining) και αποκόπτεται το DNA που βρίσκεται ανάμεσά τους. Κατά την αναδιάταξη VJ τα ανασυνδυαζόμενα γενετικά τμήματα μπορεί να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό, οπότε έχουμε διαγραφή (deletion) του παρεμβαλλόμενου DNA, ή να έχουν αντίθετο προσανατολισμό, οπότε έχουμε αναστροφή (inversion) του παρεμβαλλόμενου DNA (Εικόνα 10) (24,26). Για τη δημιουργία της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας, αντιπαρατίθεται ένα από τα πολλά γονίδια ΙΓΚV με ένα από τα γονίδια ΙΓΚJ. Ακολουθεί η μεταγραφή των ανασυνδυασμένων γενετικών τμημάτων και η απομάκρυνση (κατά τη συρραφή του RNA, RNA splicing)



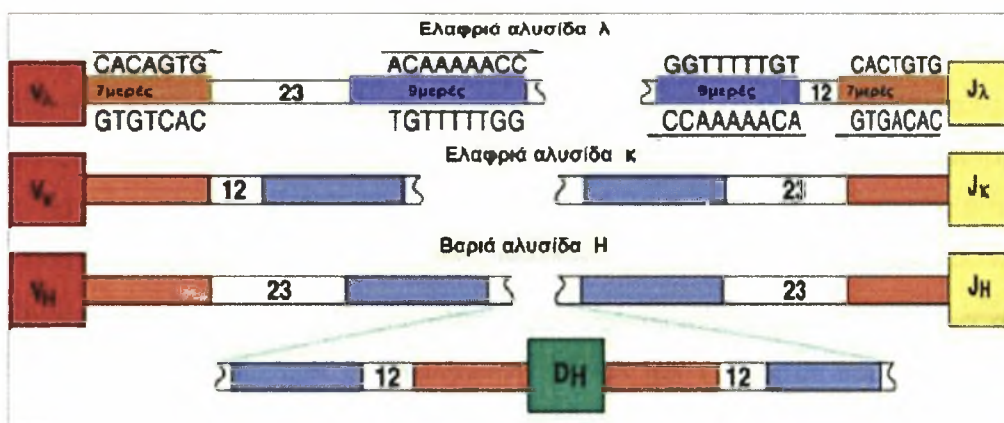
Εικόνα 10. (α) Ανασυνδυασμός V-J με απαλοιφή του παρεμβαλλόμενου DNA. Οι αλληλουχίες RSS απομακρύνονται σε ένα κυκλικό μορίο. (β) Ανασυνδυασμός V-J με διαγραφή. Δεν παρατηρείται απαλοιφή DNA. Το παρεμβαλλόμενο κομμάτι αναστρέφεται.

των αλληλουχιών που παρεμβάλλονται μεταξύ των τμημάτων IGKJ και IGKC ώστε να σχηματιστεί ώριμο mRNA μιας συγκεκριμένης κ ελαφριάς αλυσίδας. Στην περίπτωση της λ ελαφριάς αλυσίδας, η προμεταγραφική διαδικασία του ανασυνδυασμού είναι παρόμοια, αλλά η οργάνωση των γονιδίων είναι λίγο διαφορετική: υπάρχουν λιγότερα τμήματα IGLV, ενώ κάθε τμήμα IGLV και IGLJ σχετίζεται με ένα διαφορετικό τμήμα IGLC (25).

Κατά την αναδιάταξη των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, πρώτα αντιπαρατίθεται ένα τμήμα ποικιλότητας (diversity, D) με ένα τμήμα J και, στη συνέχεια, ένα τμήμα V αναδιατάσσεται και συνδέεται με το σύμπλοκο DJ. Ακολουθεί μεταγραφή του γενετικού συμπλόκου IGHV(D)J, επεξεργασία και συρραφή του προ-mRNA (RNA splicing), μετάφραση του ώριμου



mRNA στο κυτταρόπλασμα και μετασυνθετική τροποποίηση των αντίστοιχων πεπτιδίων (κυρίως με γλυκοζυλίωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi). Κάθε γονίδιο IGHV φέρει στο 5' άκρο του ένα μικρό εξόνιο, την αλληλουχία-οδηγό (leader). Αυτό συνθέτει ένα μικρό πεπτιδίο-οδηγό ή πεπτιδίο-σήμα (signal ή leader L peptide). Το πεπτιδίο-οδηγός καθοδηγεί τη βαριά ή την ελαφριά αλυσίδα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τελικά αφαιρείται από τις ελαφριές και βαριές αλυσίδες πριν από την πλήρη συναρμολόγηση του μορίου των ανοσοσφαιρινών.



Εικόνα 11. Οι αλληλουχίες-σήματα του ανασυνδυασμού (RSS) όπως διαμορφώνονται στα γονιδιακά τμήματα όλων των γενετικών τόπων των ανοσοσφαιρινών. Ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί μόνο μεταξύ γενετικών τμημάτων που έχουν RSS με διαστηματική περιοχή ανάμοιου μήκους όπως επιβάλλει ο κανόνας 12-23.

Η μεταγραφή των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ρυθμίζεται από δυο τύπους γενετικών αλληλουχιών, τους υποκινητές (promoters) και τους ενισχυτές (enchancers)(27). Στους γονιδιακούς τόπους των ανοσοσφαιρινών οι υποκινητές βρίσκονται στο 5' άκρο των εξονίων V, D και C και ευθύνονται για την πιστή μεταγραφή αυτών των γονιδίων. Πιστεύεται ότι μια λειτουργία της αναδιάταξης V(D)J είναι η προσέγγιση του ενισχυτή του ιντρονίου με τον υποκινητή του γονιδίου V και, με αυτό τον τρόπο, η διέγερση της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου.

Κάθε γενετικό τμήμα V, D, J έχει δίπλα στην κωδικοποιητική αλληλουχία του αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από το μηχανισμό του ανασυνδυασμού και καθοδηγούν τις αναδιατάξεις, οι οποίες ονομάζονται αλληλουχίες-σήματα του ανασυνδυασμού, (Recombination Signal Sequences, RSS) (Εικόνα 11) (28-31). Οι αλληλουχίες RSS είναι διατηρημένες αλληλουχίες μικρού μήκους και αποτελούνται από ένα διατηρημένο επτανουκλεοτίδιο (5'-CACTGTG-3') και ένα διατηρημένο εννεανουκλεοτίδιο (5'-ACAAAAACC-3') ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλεται μια μη διατηρημένη, διαστηματική αλληλουχία (spacer region) μήκους 12 ή 23 νουκλεοτιδίων ( $\pm 1$  νουκλεοτίδιο). Τα γονίδια V έχουν στο 3' άκρο τους μια αλληλουχία RSS με διαστηματική περιοχή 23 νουκλεοτιδίων, ενώ τα γονιδιακά

τμήματα J έχουν στο 5' άκρο τους μια αλληλουχία RSS με διαστηματική περιοχή 23 νουκλεοτιδίων. Τα γενετικά τμήματα D έχουν και στις δυο πλευρές τους αλληλουχίες RSS με διαστηματική περιοχή διαφορετικού μήκους. Τα γενετικά τμήματα ίδιου τύπου, για παράδειγμα τα τμήματα IGHV, έχουν όλα αλληλουχίες RSS με διαστηματική περιοχή ίδιου μήκους (σε αυτή την περίπτωση 23 νουκλεοτίδια). Ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί μόνο μεταξύ γενετικών τμημάτων που έχουν RSS με διαστηματική περιοχή ανόμοιου μήκους. Ο συγκεκριμένος περιορισμός ονομάζεται «κανόνας 12/23». Ο κανόνας 12/23 διασφαλίζει ότι τα γενετικά τμήματα των μεταβλητών περιοχών των βαριών αλυσίδων (IGHV) δεν θα ανασυνδυαστούν μεταξύ τους και επιτρέπει την αναδιάταξή τους μόνο με τα γενετικά τμήματα D των βαριών αλυσίδων.

### **3.2 Ένζυμα που εμπλέκονται στον ανασυνδυασμό V(D)J**

Τα ένζυμα RAG1 (Recombinase Activating Gene 1 ή γονίδιο ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού τύπου 1) και RAG2 (Recombinase Activating Gene 2 ή γονίδιο ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού τύπου 2) σχηματίζουν ένα ετεροπολυμερές που αναγνωρίζει και κόβει ένα ζεύγος 12/23 RSS ακριβώς στη θέση σύνδεσης επτανουκλεοτιδίου και κωδικοποιητικής αλληλουχίας (31-33). Αυτή η αντίδραση δημιουργεί τέσσερα άκρα DNA. Τα RAG1 και RAG2 είναι ενεργά μόνο στα κύτταρα της B και T λεμφικής σειράς και μόνο σε πρόδρομα B και T λεμφοκύτταρα, όχι όμως και σε ώριμα λεμφοκύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο ερμηνεύεται γιατί οι αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών -και αντιστοίχως των υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων- δεν συνεχίζονται σε κύτταρα που εκφράζουν λειτουργικούς αντιγονικούς υποδοχείς.

Εκτός από τα ένζυμα RAG1 και RAG2, άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό V(D)J είναι τα εξής:

- πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το DNA (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK): προσδένεται και φωσφορυλιώνει την Artemis, μια νουκλεάση που στη συνέχεια συμμετέχει στο άνοιγμα της φουρκέτας αφήνοντας μονόκλωνες προεξοχές
- Ku70 και Ku80: σχηματίζουν ετεροδιμερές και προσδένονται στις εγκοπές του DNA και στην DNA-PK
- TdT: προσθέτει τυχαία νουκλεοτίδια στις συνάψεις V(D)J
- XRCC4 και DNA λιγκάση IV: η XRCC4 προσδένεται στην λιγκάση και την ενεργοποιεί - η λιγκάση συνδέει τα σηματοδοτικά και κωδικοποιητικά άκρα.

Τα ένζυμα RAG1 και RAG2 αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες RSS και κόβουν στο άκρο του επτανουκλεοτιδίου στον έναν από τους δύο κλώνους του DNA (31-33) . Στη

συνέχεια τα δυο σύμπλοκα RAG1/RAG2 ενώνονται και φέρνουν κοντά την περιοχή V με την περιοχή DJ. Το 3'-OH «επιτίθεται» στον απέναντι κλώνο, οπότε σε κάθε άκρο κωδικοποιητικής αλληλουχίας σχηματίζεται μια δομή «φουρκέτας» (hairpin) σε μια αντίδραση δημιουργίας διπλής εντομής. Σε αυτό το στάδιο, και τα τέσσερα άκρα συγκρατούνται σ' ένα σύμπλοκο, πιθανώς μέσω των RAG. Διάφορες πρωτεΐνες (Ku70:Ku80, XRCC4 και η DNA εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση) προσδένονται στις φουρκέτες και στα άκρα των επταμερών (33). Οι φουρκέτες στα άκρα των περιοχών V και D ανοίγουν με δράση ενδονουκλεάσης. Κατά τη διάσπαση της φουρκέτας σε ένα τυχαίο σημείο παράγεται μια προεξέχουσα μονόκλωνη παλίνδρομη αλληλουχία (P- νουκλεοτίδια, palindromic). Εξωνουκλεάσες και τρανσφεράσες αφαιρούν και προσθέτουν τυχαία νουκλεοτίδια στην περιοχή ανάμεσα στα V και D. Όταν στο στάδιο αυτό εκφράζεται η TdT έχουμε προσθήκη τυχαίων νουκλεοτιδίων (N- ή non-templated νουκλεοτίδια) (34-35). Τέλος, η DNA λιγκάση IV συνδέει τα άκρα των περιοχών V και D σχηματίζει την «κωδικοποιητική συμβολή» (coding joint), όπως επίσης και τα άκρα των δυο επτανουκλεοτιδίων για να σχηματιστεί τη «σηματοδοτική συμβολή» (signal joint).

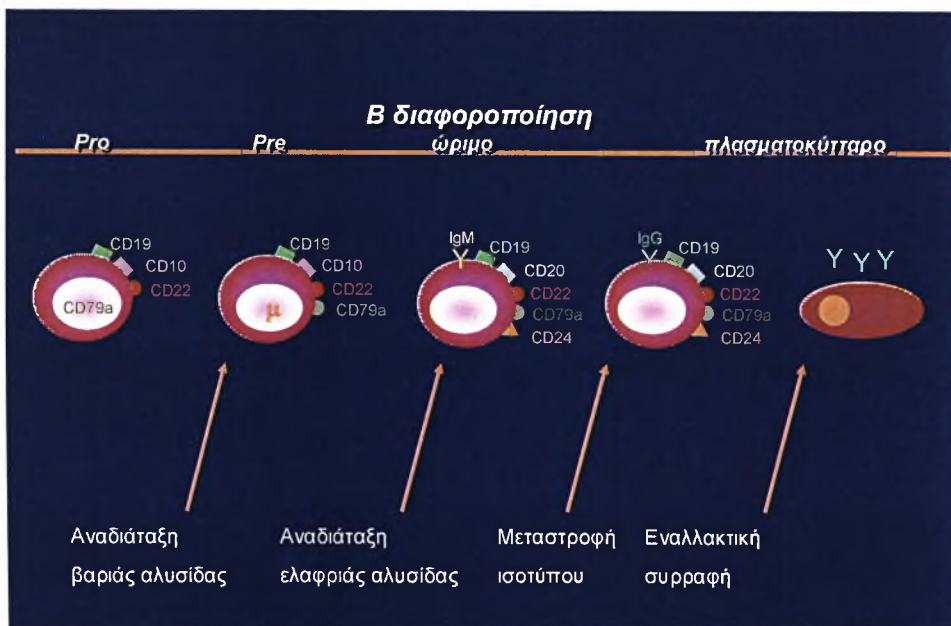
Η ποικιλότητα που δημιουργείται από την προσθήκη και αφαίρεση νουκλεοτιδίων στις συνάψεις κατά τον ανασυνδυασμό V(D)J ονομάζεται συνδετική ποικιλότητα (junctional diversity). Επειδή σε κάθε αναδιάταξη η συμβολή των γονιδίων V(D)J περιλαμβάνεται στην περιοχή CDR3, οι διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων των περιοχών CDR3 είναι περισσότερες από αυτές που μπορεί να κωδικοποιηθούν από τα τμήματα V, J και D της γαμετικής σειράς. Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων στη θέση της V(D)J αναδιάταξης αποτελεί δείκτη κλωνικότητας των B και T κυτταρικών λεμφωμάτων και λευχαιμιών. Οι γονιδιακές αναδιατάξεις των αντιγονικών υποδοχέων είναι χαρακτηριστικές των επιμέρους κλώνων λεμφοκυττάρων και χάρη στη μοναδικότητά τους, αποτελούν ένα είδος «μοριακής ταυτότητας» των κλώνων. Από τη μοριακή ανάλυση της δομής της μεταβλητής περιοχής προκύπτουν ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με την κλωνική φύση, την παθογένεια και την εξέλιξη των λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

## 4. Η ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗ Β-ΛΕΜΦΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

### 4.1 Η ανεξάρτητη από το αντιγόνο φάση διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων

Τα Β κύτταρα προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Κατά την εμβρυϊκή ζωή, η ανάπτυξη τους συμβαίνει στα αιμονησίδια, στον πλακούντα και στο ήπαρ, ενώ κατά την ενήλικη ζωή στο μυελό των οστών. Αυτή η ανεξάρτητη από το αντιγόνο πρώτη φάση της ανάπτυξης των Β λεμφοκυττάρων διαρκεί περίπου πέντε ημέρες και οδηγεί στη δημιουργία **ώριμων, «παρθένων» Β λεμφοκυττάρων** (naive, virgin B cells) που εκφράζουν μια και μοναδική ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας IgM. Στο χρόνο αυτό ενεργοποιούνται κάποια γονίδια ειδικά για την λεμφική σειρά. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταγραφή και αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, βοηθητικούς παράγοντες απαραίτητους για την επαφή με το αντιγόνο και συστατικά διαφόρων κυτταρικών οδών μεταβίβασης σήματος που θα καθοδηγήσουν την ανάπτυξη προς διαφορετικές κατευθύνσεις (36).

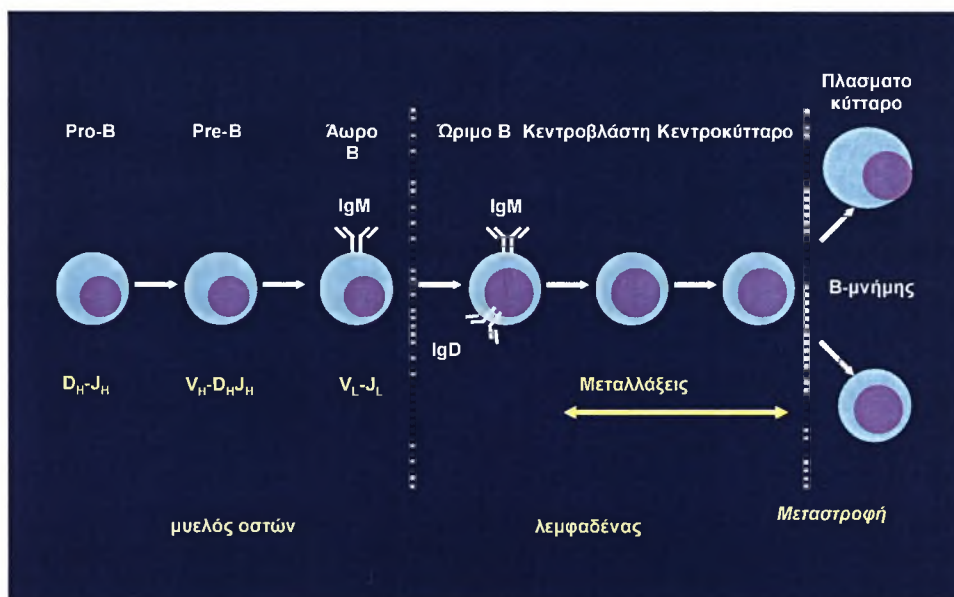
Στον άνθρωπο, όπως και στα ποντίκια, υπάρχουν δυο αλληλόμορφα για τη βαριά και τέσσερα για την ελαφριά αλυσίδα. Ωστόσο, ένα Β λεμφοκύτταρο παράγει μόνο μια ανοσοσφαιρίνη με ένα μόνο είδος βαριάς και ένα είδος ελαφριάς αλυσίδας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **αποκλεισμός αλληλομόρφου (allelic exclusion)** και είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της άνοσης απάντησης. Ο αποκλεισμός αλληλομόρφου είναι το αποτέλεσμα ρυθμιζόμενων αναδιατάξεων των γονιδίων κατά την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων (37-39).



Εικόνα 12. Φάσεις διαφοροποίησης στη Β λεμφική σειρά.

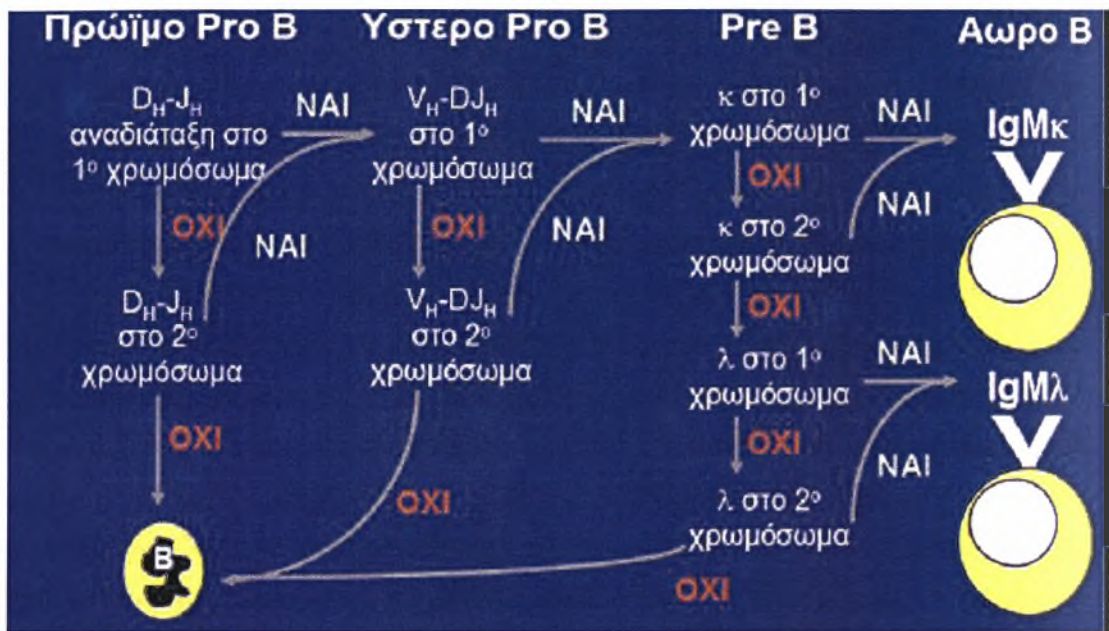


Τα στάδια διαφοροποίησης στη Β λεμφική σειρά καθορίζονται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών αλλά και από την έκφραση ανοσοσφαιρινών, μορίων προσκόλλησης και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων (37,40,41)(Εικόνα 12,13). Οι αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών γίνονται ιεραρχικά (Εικόνα 14). Η πρώτη αναδιάταξη γίνεται και στα δύο αλληλόμορφα της βαριάς αλυσίδας μεταξύ γενετικών τμημάτων D και J. Το γεγονός αυτό «δεσμεύει» τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) να ακολουθήσουν τη Β λεμφική σειρά. Σε αυτή τη φάση το κύτταρο καλείται πρώιμο **προ-προ Β κύτταρο (early pro B cell)**. Στη συνέχεια, στο στάδιο του **όψιμου προ-προ Β κυττάρου (late pro B cell)**, γίνεται ανασυνδυασμός μεταξύ ενός γονιδιακού τμήματος V και του γενετικού συμπλόκου DJ. Στα 2/3 των περιπτώσεων, το αναδιαταγμένο γονίδιο που δημιουργείται είναι εκτός αναγνωστικού πλαισίου. Μια τέτοια μη παραγωγική αναδιάταξη ωθεί το κύτταρο να προχωρήσει στην αναδιάταξη του δεύτερου αλληλομόρφου. Τα προ-προ Β κύτταρα είναι βραχύβια. Σε περίπτωση που η αναδιάταξη των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας αποτύχει και στα δυο αλληλόμορφα, τα κύτταρα πεθαίνουν με απόπτωση (42,44).



Εικόνα 13. Τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης των Β λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζονται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών.

Όταν η αναδιάταξη είναι παραγωγική, το κύτταρο περνά στο στάδιο του **μεγάλου προ Β λεμφοκυττάρου (large pre B cell)**. Η βαριά αλυσίδα εντοπίζεται πλέον στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα γονίδια της ελαφριάς αλυσίδας δεν έχουν ακόμη αναδιαταχθεί. Στο στάδιο αυτό, στην επιφάνεια του κυττάρου εκφράζεται ο **προ-Β υποδοχέας (pre-BCR: pre B cell receptor)** (43), ο οποίος αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα  $\mu$  και μια **υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα** (surrogate light chain) όπως και



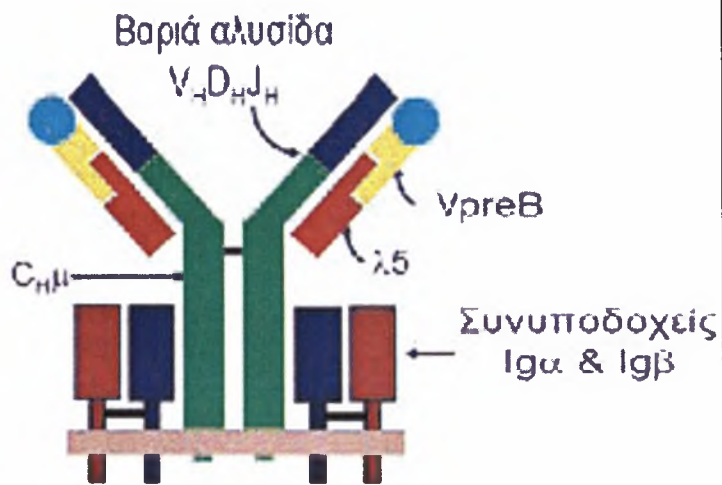
Εικόνα 14. Η ιεραρχία των αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στα διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης του. Κάθε λεμφοκύτταρο έχει περισσότερες από μια ευκαιρίες να επιτύχει μια παραγωγική αναδιάταξη. Η κάθε αναδιάταξη έχει πιθανότητα 1:3 να είναι εντός πλαισίου ώστε το B λεμφοκύτταρο να περάσει στο επόμενο στάδιο της διαφοροποίησης του.

από τους συνυποδοχείς (co-receptors) Ig $\alpha$  και Ig $\beta$  (Εικόνα 15). Η υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα βοηθά στο σωστό δίπλωμα της βαριάς αλυσίδας  $\mu$  και κωδικοποιείται από τα γονίδια  $\lambda 5$  και  $VpreB$  (45,46,47). Τα γονίδια αυτά δεν αναδιατάσσονται και είναι ομόλογα με τα γονίδια της μεταβλητής και της σταθερής περιοχής της  $\lambda$  ελαφριάς αλυσίδας. Ακόμη και μια παραγωγική αναδιάταξη  $VH DJH$  μπορεί να παράγει μια  $\mu$  βαριά αλυσίδα ανίκανη να συνδεθεί με την υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα ή την κανονική ελαφριά αλυσίδα. Όπως στην περίπτωση των αναδιατάξεων εκτός πλαισίου, και σε αυτή την περίπτωση το κύτταρο πεθαίνει με απόπτωση, αν δεν διασωθεί από λειτουργικό δευτερογενή ανασυνδυασμό και διόρθωση υποδοχέα (receptor editing) (48,49). Ο προ-B υποδοχέας πιθανόν προσδένει άγνωστο σηματοδοτικό μόριο της επιφάνειας των στρωματικών κυττάρων. Η παραγωγή της βαριάς αλυσίδας και η επακόλουθη έκφραση του προ-B υποδοχέα επάγει την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης  $bcl-x_L$ .

Το στάδιο του προ B λεμφοκυττάρου θεωρείται πολύ σημαντικό επειδή ο προ-B υποδοχέας μεταβιβάζει πολλαπλά σήματα στο αναπτυσσόμενο B κύτταρο με συνέπεια:

- αναστολή της απόπτωσης
- πολλαπλασιασμό του κυττάρου με 3 ή 4 κυτταρικές διαιρέσεις
- παύση περαιτέρω  $V-DJ$  ανασυνδιασμού - αποκλεισμός αλληλομόρφου
- έναρξη του ανασυνδιασμού  $IGKV-J$  της  $\kappa$  ελαφριάς αλυσίδας
- διαφοροποίηση της έκφρασης ποικίλων γονιδίων (πχ καταστολή της  $TdT$ ).

## Προ-B υποδοχέας (pre B cell receptor)

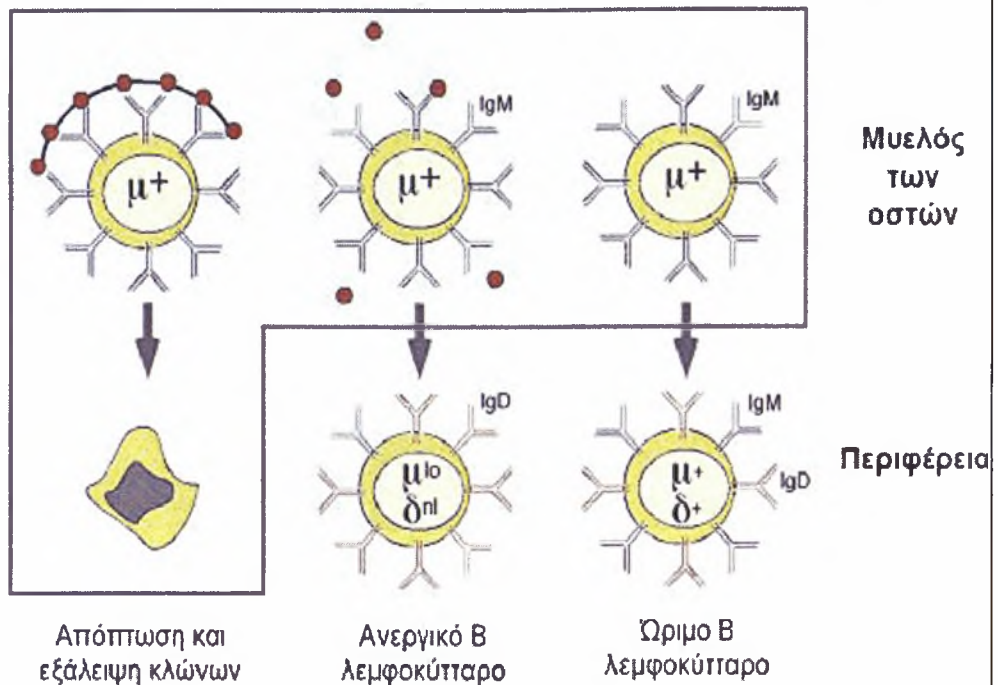


Εικόνα 15. Η μοριακή δομή του προ- B υποδοχέα (pre-BCR: pre B cell receptor)

Τα σήματα αυτά σχετίζονται με αναγνωρίσιμες αλλαγές στην έκφραση επιφανειακών πρωτεϊνών. Όταν ο πολλαπλασιασμός σταματήσει, ο προ-B υποδοχέας παύει να εκφράζεται (**μικρό προ B κύτταρο/small pre B cell**), τα γονίδια RAG (recombination activating genes), που είχαν προσωρινά κατασταλεί, ενεργοποιούνται ξανά και αρχίζει η αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων (50,51). Ο γενετικός τόπος IGK κατά κανόνα αναδιατάσσεται μετά τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας. Μερικά αναπτυσσόμενα B λεμφοκύτταρα και κυρίως όσα έχουν μη παραγωγικές αναδιατάξεις στα γονίδια της κ ελαφριάς αλυσίδας, προχωρούν στην αναδιάταξη των γονιδίων της λ ελαφριάς αλυσίδας.

Όταν το προ B λεμφοκύτταρο αποκτήσει μια παραγωγική αναδιάταξη και για την ελαφριά αλυσίδα, εκφράζει πλέον επιφανειακή IgM και περνά στο στάδιο του **ανώριμου B κυττάρου (immature B cell)**. Επειδή ο ανασυνδυασμός των γονιδίων γίνεται τυχαία, η επιφανειακή IgM μπορεί να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα (self-antigens). Έτσι, τα B λεμφοκύτταρα πρέπει να ελέγχονται για το ενδεχόμενο αυτοαντιδραστικότητας (self-reactivity) πριν την έξοδό τους στην περιφέρεια. Μια πρόσφατη μελέτη του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών σε ανώριμα B λεμφοκύτταρα έδειξε ότι περίπου 60% των κυττάρων αυτών είναι αυτοαντιδραστικά (52). Η αυτοανοχή (self tolerance) εξασφαλίζεται με τους παρακάτω μηχανισμούς (Εικόνα 16):

## Εξάλειψη των αυτοαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων



Εικόνα 16. Η εξασφάλιση της αυτοανοχής στο μυελό των οστών. Πολλά ανώριμα Β λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνο στο μυελό των οστών εξαλείφονται με απόπτωση ή απενεργοποίηση.

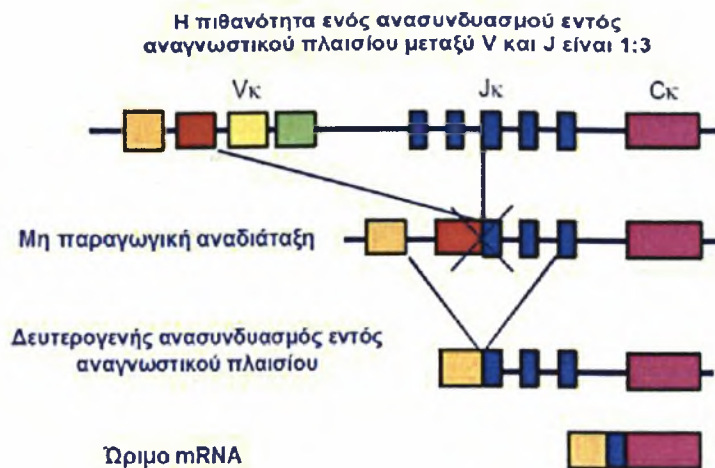
1. **Εξάλειψη κλώνων (clonal deletion):** τα ανώριμα Β λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν πολυσθενή αντιγόνα (πχ MHC στην επιφάνεια των κυττάρων) μέσω της επιφανειακής IgM υφίστανται εξάλειψη με απόπτωση

2. **Ανεργία (anergy):** τα ανώριμα Β λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν χαμηλού σθένους αντιγόνα (πχ διαλυτά) γίνονται ανεργικά, χάνουν την επιφανειακή IgM (διατηρούν, ωστόσο, IgM στο κυτταρόπλασμα), ενώ στην επιφάνεια εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgD

3. **Διόρθωση υποδοχέα (receptor editing):** πολύ συχνά η πρόσδεση της IgM στον αντίστοιχο προσδέτη ενεργοποιεί το αυτοαντιδραστικό ανώριμο Β κύτταρο να εκφράσει τις πρωτεΐνες ανασυνδυασμού *RAG* (recombination activating gene) -1 και -2 επιτρέποντας να συμβεί περαιτέρω ανασυνδυασμός. Η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει αντικατάσταση μιας ελαφριάς αλυσίδας από μια νέα ελαφριά αλυσίδα, γεγονός που δημιουργεί μια νέα αντιγονική ειδικότητα (Εικόνα 17,18).

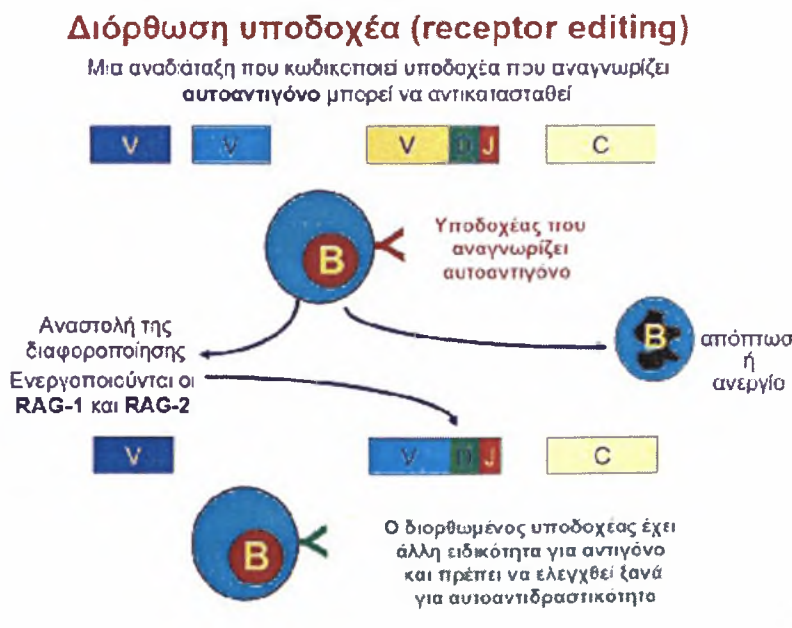
Τα ανώριμα λεμφοκύτταρα που έχουν ελεγχθεί για αυτοανοχή και αντιστοιχούν περίπου στο 10% του συνόλου των παραγόμενων Β λεμφοκυττάρων, είναι έτοιμα να ωριμάσουν αφού εγκαταλείψουν τον μυελό των οστών. Το ώριμο Β λεμφοκύτταρο φέρει στην επιφάνεια του IgM και IgD όπως και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται





Εικόνα 17. Η οργάνωση των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας δίνει την ευκαιρία στα B λεμφοκύτταρα που έχουν κάνει μια αναδιάταξη εκτός πλαισίου να διασωθούν με περαιτέρω ανασυνδυασμό. Έτσι μια μη παραγωγική αναδιάταξη στα γονίδια ελαφριάς αλυσίδας μπορεί να αντικατασταθεί από μια παραγωγική αναδιάταξη εντός αναγνωστικού πλαισίου.

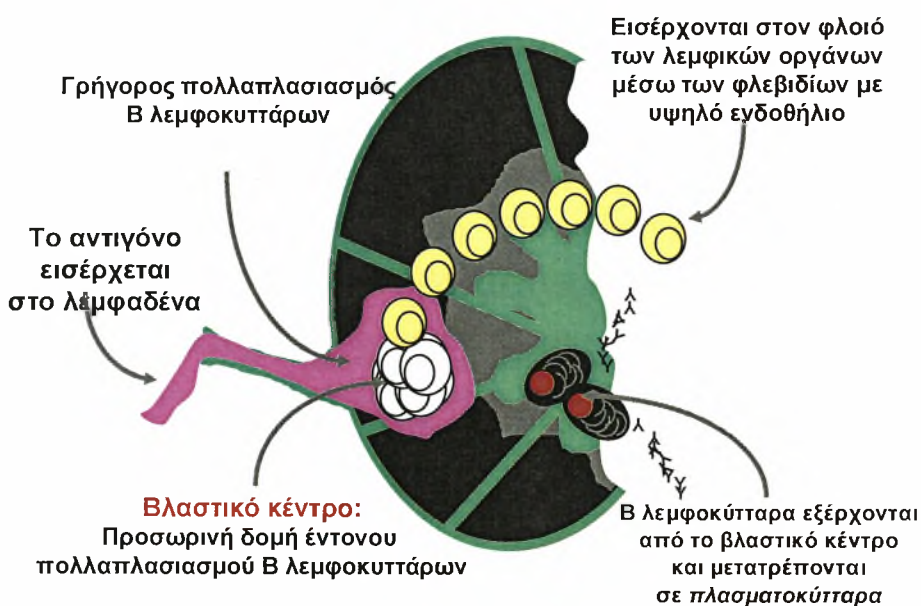
στη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης στο αντιγόνο και στα υπόλοιπα ρυθμιστικά κύτταρα. Πολλά γονίδια, μεταξύ άλλων και τα VpreB, λ5, RAG1, RAG2, TdT, και LEF-1, που ήταν απαραίτητα για την πρώιμη ανάπτυξη καταστέλλονται. Το ώριμο B κύτταρο, μέσω του εξειδικευμένου αντιγονικού υποδοχέα του, μπορεί να διεγερθεί για περαιτέρω διαφοροποίηση υπό την επίδραση του αντιγόνου ή την επαφή του με T λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 18. Η διόρθωση υποδοχέα (receptor editing) είναι ένας από τους τρόπους με τους οποίους εξασφαλίζεται η αυτοανοχή. Η αναγνώριση αυτοαντιγόνου από τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των γονιδίων RAG-1 και RAG-2. Αυτό επιτρέπει τη διάσωση του κυττάρου με περαιτέρω ανασυνδυασμό.

## 4.2 Η εξαρτώμενη από το αντιγόνο φάση διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων

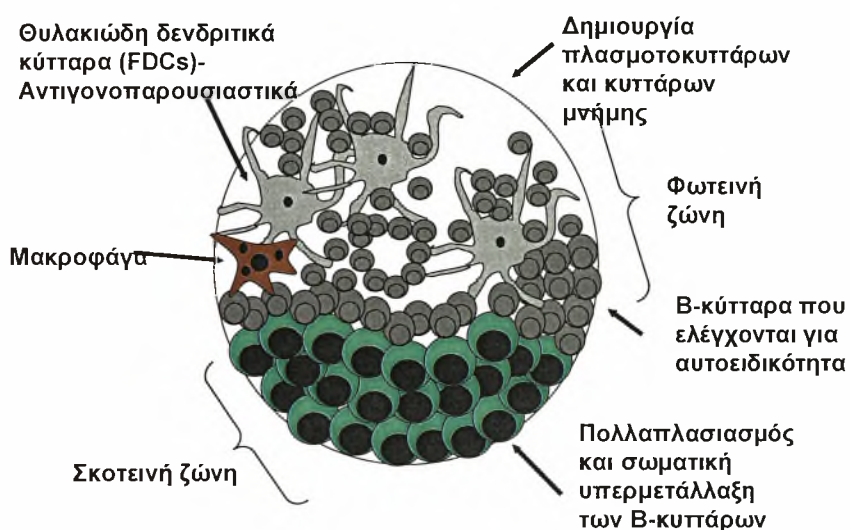
Τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στα δευτερογενή λεμφικά όργανα [σπλήνας, λεμφαδένες, λεμφικός ιστός των βλεννογόνων (*mucosa-associated lymphoid tissue, MALT*)] και περνούν στη δεύτερη, εξαρτώμενη από το αντιγόνο, φάση διαφοροποίησης (Εικόνα 19). Τα «παρθένα» ώριμα Β λεμφοκύτταρα αφήνουν την κυκλοφορία και εισέρχονται στον φλοιό των λεμφικών οργάνων μέσω των φλεβιδίων με υψηλό ενδοθήλιο. Αν δεν συναντήσουν αντιγόνο, μεταναστεύουν μέσω των πρωτογενών λεμφοζιδίων και επιστρέφουν στην κυκλοφορία μέσω του λεμφικού συστήματος. Αν όμως συναντήσουν αντιγόνο και ενεργοποιηθούν από κατάλληλα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, πρώτα πολλαπλασιάζονται στις περιοχές των Τ κυττάρων και, έπειτα, μερικά από τα διαιρούμενα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν τα βλαστικά κέντρα (*germinal centers*) (53).



Εικόνα 19. Τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών μέσω του αίματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Αν δεν συναντήσουν αντιγόνο επιστρέφουν στην κυκλοφορία μέσω των απαγωγών λεμφαγγείων. Αν συναντήσουν αντιγόνο ενεργοποιούνται και σχηματίζουν τα βλαστικά κέντρα.

Τα βλαστικά κέντρα είναι περιοχές γρήγορου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων (Εικόνα 20). Στο βλαστικό κέντρο τα ώριμα Β κύτταρα διαφοροποιούνται σε *κεντροβλάστες* (*centroblasts*). Οι κεντροβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα που διαιρούνται μια φορά κάθε έξι ώρες περίπου, ενώ δεν εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των Β λεμφοκυττάρων στο βλαστικό κέντρο, αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των ειδικών για

το αντιγόνο Β λεμφοκυττάρων που εκδηλώνουν την άνοση απάντηση. Τελικά, σε κάθε πόλο του βλαστικού κέντρου σχηματίζονται δυο περιοχές, η «σκοτεινή ζώνη» (dark zone) και η «φωτεινή ζώνη» (light zone). Η «σκοτεινή ζώνη» είναι η περιοχή όπου συμπιέζονται οι διαιρούμενες κεντροβλάστες, οι οποίες υπόκεινται στη διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (somatic hypermutation) (54,56) .



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση του βλαστικού κέντρου. Διακρίνονται τα σημαντικότερα κύτταρα που παίζουν ρόλο στη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στο βλαστικό κέντρο όπως και η πόλωση του σε σκοτεινή και φωτεινή ζώνη.

#### 4.2.1 Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (somatic hypermutation), ένας από τους μηχανισμούς που αυξάνουν την ποικιλότητα των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, είναι προϋπόθεση για την παραγωγή ανοσοσφαιρινών επιφανείας με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο (55,57,58). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *ωρίμανση συγγένειας* (affinity maturation). Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση χαρακτηρίζεται από εισαγωγή μεταλλάξεων (κυρίως σημειακών) στις μεταβλητές περιοχές των γονιδίων της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών με πολύ υψηλή συχνότητα ( $1/10^3$  ανά κυτταρική γενιά), γεγονός που μεταβάλλει τη συγγένεια της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο (59-63). Η περιοχή-στόχος για εισαγωγή μεταλλάξεων είναι η μεταβλητή περιοχή και ένα μικρό τμήμα του ιντρονίου J-C, ενώ η σταθερή περιοχή δεν επηρεάζεται. Η στόχευση αυτή πιθανόν κατευθύνεται από *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία που σχετίζονται με τη μεταγραφή, όπως ο ενισχυτής και ο υποκινητής, ο οποίος όμως μπορεί να αντικατασταθεί από ετερόλογο υποκινητή χωρίς να επηρεαστεί η υπερμεταλλαξιγένεση (64-68). Δεν είναι σαφές αν η

μεταγραφή παίζει άμεσο ρόλο στη στόχευση της διεργασίας ή αν δρα με έμμεσο τρόπο, «ανοίγοντας» τον γενετικό τόπο και κάνοντάς τον προσπελάσιμο στον μηχανισμό της υπερμεταλλαξιγένεσης.

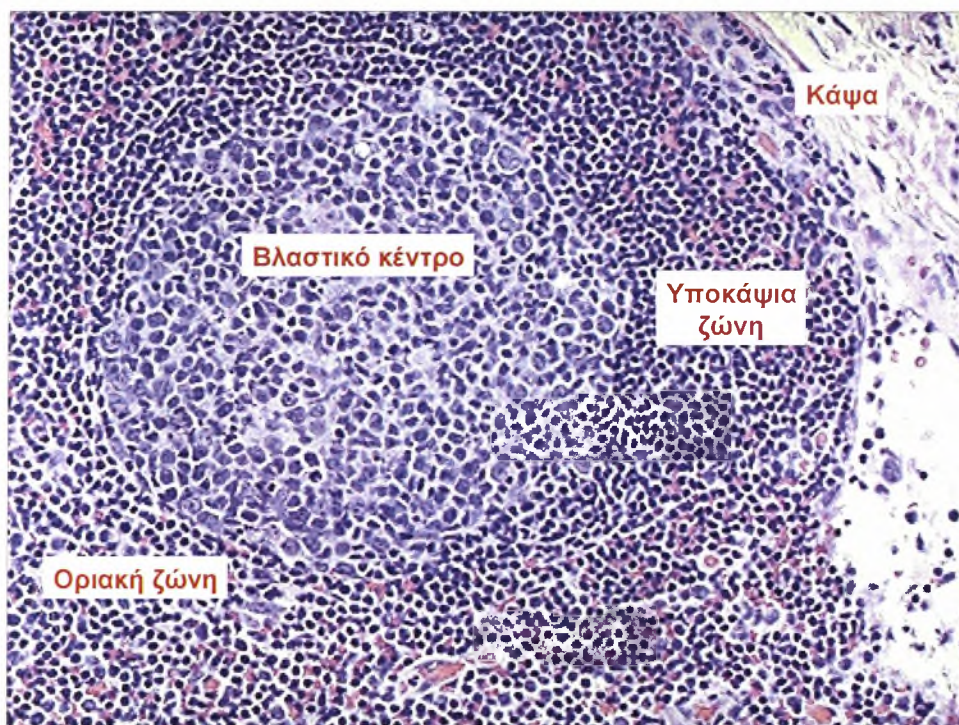
Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση συμβαίνει τόσο στα εκφρασμένα παραγωγικά γονίδια όσο και στα μη παραγωγικά, υπάρχει όμως διαφορά στην κατανομή των μεταλλάξεων. Στα γονίδια που εκφράζονται, οι μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος (*replacement mutations, R*) συγκεντρώνονται στις περιοχές CDRs, δηλαδή στις περιοχές επαφής με το αντιγόνο. Αντίθετα οι «σιωπηρές» μεταλλάξεις (*silent mutations, S*) κατανέμονται σε όλες τις περιοχές πλαισίου (69-71). Στα μη παραγωγικώς αναδιαταγμένα γονίδια δεν παρατηρείται τέτοια εστίαση. Αυτό το πρότυπο κατανομής μεταλλάξεων υποδεικνύει ότι το αντιγόνο «επιλέγει» εκείνα τα Β κύτταρα που έχουν μεταλλαγμένους υποδοχείς οι οποίοι το δεσμεύουν καλύτερα. Έτσι, ο αυξημένος λόγος R/S μεταλλάξεων είναι αξιόπιστη ένδειξη της επιλογής από αντιγόνο για υψηλότερη συγγένεια. Ωστόσο, ανεξάρτητα από την επιλογή από αντιγόνο, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση φαίνεται να στοχεύει συχνότερα σε μερικά κωδικόνια των V γονιδίων, σε σχέση με άλλα. Τα σημεία αυτά ονομάζονται «επίκεντρα» (“hotspots”) για εισαγωγή μεταλλάξεων και ακολουθούν συχνά μοτίβα τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων όπως το RGYW (R: πουρίνη, Y: πυριμιδίνη, W: A ήT) με το συμπληρωματικό του WRCY (72).

Ο μοριακός μηχανισμός της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στον άνθρωπο δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, όμως η διαδικασία παρουσιάζει ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά (73). Τέτοια είναι η προτίμηση για μεταβάσεις (transitions) έναντι των μεταπτώσεων (transversions), η επιλεκτική στόχευση των πουρινών έναντι των πυριμιδινών και η επικράτηση των σημειακών μεταλλάξεων σε σχέση με τις ελλείψεις (deletions) ή ενθέσεις (insertions). Ακόμη, επικρατούν μεταλλάξεις σε νουκλεοτίδια G και C έναντι των μεταλλάξεων σε A και T. Έχει προταθεί ότι στη διαδικασία παίζουν καίριο ρόλο η δεαμινάση της κυτιδίνης (AID; *activation-induced deaminase*) που εκφράζεται στο βλαστικό κέντρο και είναι ένζυμο επιδιόρθωσης του RNA, όπως και πολυμεράσες επιρρεπείς σε λάθη (error-prone polymerases), όπως η πολυμεράση I (74).

Από τις κεντροβλάστες που ωριμάζουν προκύπτουν τα *κεντροκύτταρα* (centrocytes), μικρά, μη διαιρούμενα κύτταρα που συγκεντρώνονται στον αντίθετο πόλο του βλαστικού κέντρου και σχηματίζουν τη «φωτεινή ζώνη». Τα κεντροκύτταρα εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη επιφανείας που μπορεί να δεσμεύει το αντιγόνο καλύτερα, λιγότερο καλά ή καθόλου. Στη φωτεινή ζώνη



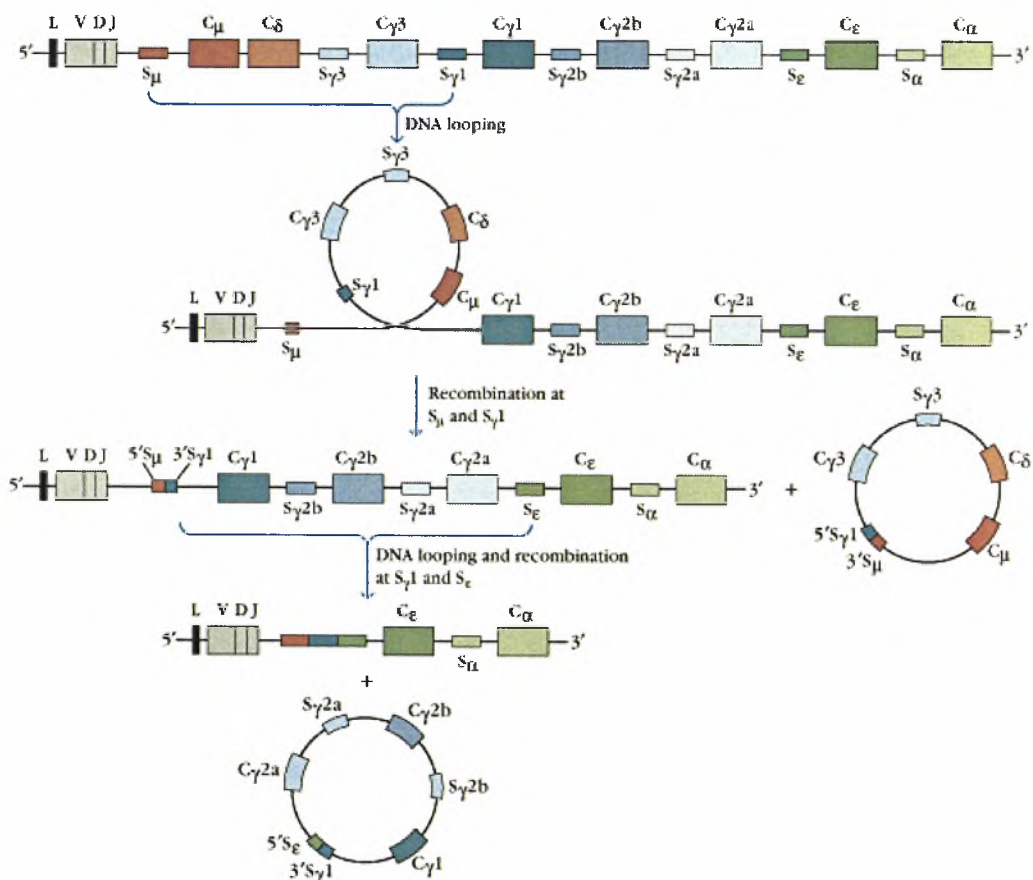
υπάρχουν επίσης τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular dendritic cells, FDC), κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου (antigen presenting cells, APC) που παρουσιάζουν το αντιγόνο για μεγάλες περιόδους στην επιφάνεια τους και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των κεντροκυττάρων τα οποία δεσμεύουν το αντιγόνο με υψηλή συγγένεια. Τα κεντροκύτταρα δέχονται συνδιεγερτικά σήματα από τα Τ λεμφοκύτταρα και τα FDC. Αν η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση έχει ελαττώσει τη συγγένεια της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο, τα κεντροκύτταρα πεθαίνουν γρήγορα με απόπτωση, ενώ, αντίθετα, τα κεντροκύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη που προσδένει ικανοποιητικά το αντιγόνο ενεργοποιούν την έκφραση του αντιαπόπτωτικού γονιδίου bcl-2 και διασώζονται από την απόπτωση (Εικόνα 21). Αμέσως μετά τη σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, στη φωτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου συμβαίνει ακόμη μια διεργασία τροποποίησης των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας, γνωστή ως μεταστροφή ισotyπού (class switch recombination, CSR).



Εικόνα 21. Μικροφωτογραφία ενός λεμφοζιδίου: διακρίνεται το βλαστικό κέντρο και η οριακή ζώνη.

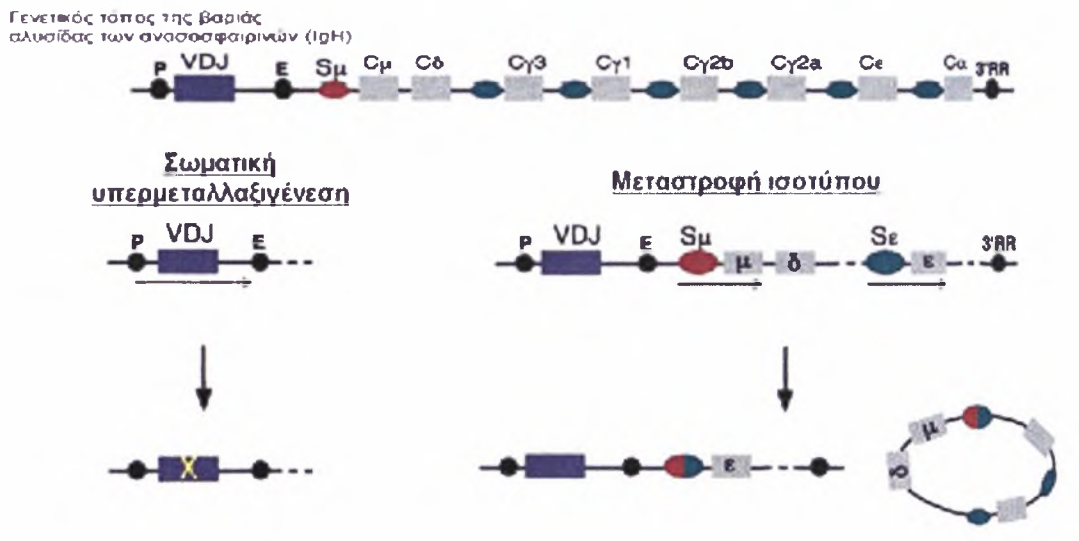
## 4.2.2 Μεταστροφή Ισοτύπου

Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τα αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να εκφράζονται με διαφορετικούς ισοτύπους και κατά συνέπεια να έχουν διαφορετική λειτουργία. Κατά τη μεταστροφή ισοτύπου, το αναδιαταγμένο γονίδιο V-D-J που συνδέεται αρχικά με το πρώτο γονίδιο σταθερής περιοχής C $\mu$ , μπορεί να συνδυαστεί με τα υπόλοιπα γονίδια σταθερής περιοχής εκτός από το C $\delta$  (η IgD εκφράζεται σχεδόν πάντα ταυτόχρονα με την IgM). Η μεταστροφή ισοτύπου είναι μη αντιστρεπτή διαδικασία, η οποία επιτυγχάνεται με ανασυνδυασμό μεταξύ ειδικών αλληλουχιών μεταστροφής (switch regions), που εντοπίζονται περίπου 2 kb στην 5' θέση κάθε C γονιδίου (εκτός του C $\delta$ ) (Εικόνα 22). Οι αλληλουχίες αυτές αποτελούνται από 20-80 επαναλήψεις νουκλεοτιδίων (βραχείες επαναλήψεις GGGCT και GAGCT όπως και βραχείες επαναλήψεις TGGG ή TGAG) κοντά στο σημείο του ανασυνδυασμού (75,76).



Εικόνα 22. Η μεταστροφή ισοτύπου προϋποθέτει ανασυνδυασμό μεταξύ ειδικών αλληλουχιών μεταστροφής (switch regions) που εντοπίζονται στο 5' άκρο κάθε γονιδίου σταθερής περιοχής εκτός από το C $\delta$ . Από αναφορά: 1.

Η μεταστροφή ισotyπou είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CD40 του Β λεμφοκυττάρου με τον συνδέτη CD40L ενός Τ λεμφοκυττάρου παρουσία κυτταροκινών, όπως οι IFN $\gamma$ , IL-4, και TGF $\beta$ . Οι ιντερλευκίνες κατευθύνουν την διεργασία προκαλώντας επιλεκτικά αλλαγές διαφορετικών ισotyπων (πχ. IFN $\gamma$ : IgG3, IgG2a, IL-4: IgG1, IgE, TGF $\beta$ : IgG2 $\beta$ , IgA). Οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν υποκινητές που βρίσκονται στο 5' άκρο κάθε αλληλουχίας μεταστροφής, οδηγώντας σε παραγωγή «στείρων» μεταγράφων (sterile transcripts, δηλαδή μεταγράφων που δεν μεταφράζονται). Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων C συμβαίνει πριν από τη μεταστροφή ισotyπου. Τα μετάγραφα που παράγονται δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη αλλά φαίνεται να κατευθύνουν σε επίπεδο DNA τον μηχανισμό της μεταστροφής ισotyπου. Η δεαμινάση της κυτιδίνης AID απαιτείται και για τη μεταστροφή ισotyπου (77) (Εικόνα 23). Η AID ίσως δρα ως καταλυτική υπομονάδα ενός ενζυμικού συμπλόκου επιδιόρθωσης RNA, το οποίο επιδιορθώνει το RNA μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στη μεταστροφή ισotyπου, ή πιο άμεσα, ως ένζυμο που εισάγει εντομές στο RNA (78,79).



Εικόνα 23. Η δεαμινάση της κυτιδίνης AID (*activation-induced deaminase*) είναι ένα ένζυμο επιδιόρθωσης του RNA που εκφράζεται στο βλαστικό κέντρο και παίζει κύριο ρόλο στους μηχανισμούς της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης και της μεταστροφής ισotyπου.

Τα Β λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από αντιγόνο αφήνουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε *πλασματοκύτταρα* (εκκρίνουν αντισώματα) ή σε *Β-λεμφοκύτταρα μνήμης* (Εικόνα 24).

#### Πλασματοκύτταρα:

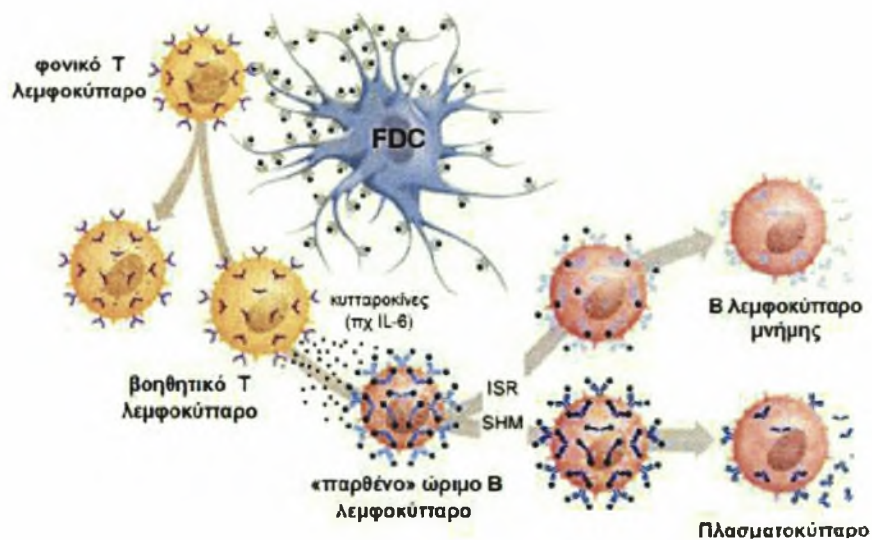
Η διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα φαίνεται ότι καθορίζεται από την παρουσία μορίων CD23, διαλυτών ή δεσμευμένων στα FDC. Τα πλασματοκύτταρα εκφράζουν χαμηλά ή ανύπαρκτα επίπεδα επιφανειακής Ig και MHCII και έτσι η



έκκριση αντισωμάτων είναι ανεξάρτητη από την επίδραση του αντιγόνου ή των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Έχουν πλούσιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και το κυτταρόπλασμα τους είναι πλούσιο σε ανοσοσφαιρίνες, που αποτελούν το 10-20% των συντιθέμενων πρωτεϊνών. Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Ζουν τέσσερις εβδομάδες στο μυελό των οστών ή στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών επιφανειών, έτσι ώστε να περιορίζεται ο χρόνος της άνοσης απάντησης (41). Το νεόπλασμα που αντιστοιχεί στα πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών είναι το *πολλαπλούν μυέλωμα*.

### *B κύτταρα μνήμης:*

Τα B-λεμφοκύτταρα μνήμης, αντίθετα από τα πλασματοκύτταρα, είναι κύτταρα σε ηρεμία, με μεγάλη διάρκεια ζωής, που δεν παράγουν αντισώματα. Ωστόσο, διαθέτουν υποδοχέα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο και έχουν υποστεί μεταστροφή ιστού. Τα κύτταρα αυτά, σε επόμενη επαφή με το αντιγόνο, μπορεί να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να εκδηλώσουν ταχύτερη και εντονότερη δευτερογενή άνοση απάντηση. Ακόμη δεν περιορίζονται στο σημείο της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο, αλλά κυκλοφορούν στην περιφέρεια. Η διαφοροποίηση σε B-λεμφοκύτταρα μνήμης ίσως διεγείρεται από τον συνδέτη του CD40 (CD40-L) των T4 λεμφοκυττάρων που υπάρχουν στις T-ζώνες. Η αλληλεπίδραση CD40L-CD40 έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου Bcl-x<sub>L</sub>. Η έκφραση του bcl-2 στα B κύτταρα μνήμης ίσως τα προστατεύει από την απόπτωση.



Εικόνα 24. Τα κεντροκύτταρα δέχονται συνδιεγερτικά σήματα από τα T λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (FDC) στη φωτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου. Τα B λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από αντιγόνο μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή σε B-λεμφοκύτταρα μνήμης. *ISR*: μεταστροφή ιστού, *SHM*: σωματική υπερμεταλλαξίγνεση.

## 5. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

### 5.1 Εισαγωγή

Η Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, κάθε χρόνο περίπου 7500 άνθρωποι εμφανίζουν ΧΛΛ και σχεδόν 5000 πεθαίνουν από την ασθένεια. Η ΧΛΛ προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους. Η αναλογία ανδρών:γυναικών ασθενών είναι 2:1 και ίσως η νόσος έχει χειρότερη κλινική εξέλιξη στους άνδρες. Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από σταδιακή συγκέντρωση μικρών, ώριμων λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών και στους λεμφικούς ιστούς. Τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ευδιάκριτα μορφολογικά χαρακτηριστικά (μικρά λεμφοκύτταρα με στρογγυλό πυρήνα, πυκνή χρωματίνη και λιγοστό κυτταρόπλασμα). Τα περισσότερα από τα κύτταρα διαιρούνται αργά, έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο (CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> Β λεμφοκύτταρα) και φέρουν στην επιφάνεια τους χαμηλά επίπεδα επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Δεν υπάρχει σαφής γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη ΧΛΛ, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κάποια κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία ανάμεσα στους ασθενείς. Έτσι, η αιτιολογία της νόσου είναι μέχρι τώρα άγνωστη.

Τα δύο κύρια κλινικά συστήματα σταδιοποίησης για τη ΧΛΛ (Rai και Binet) αναπτύχθηκαν για να διαχωρίσουν την κλινική ετερογένεια της ασθένειας (80,81). Παρότι αυτά τα συστήματα έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την επιβίωση, δεν ήταν ικανά να προβλέπουν με ακρίβεια αν οι ασθενείς που είναι σε πρώιμο στάδιο ή έχουν μέτριο κίνδυνο θα έχουν πιο ήπια εξέλιξη της νόσου ή αν η νόσος θα έχει επιθετική συμπεριφορά και θα εξελιχθεί γρηγορότερα. Έτσι, καινούργιοι προγνωστικοί παράγοντες για τον προσδιορισμό των κλινικών ομάδων με καλή ή κακή πρόγνωση θα βοηθούσαν στην καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενών. Για το σκοπό αυτό άρχισαν να εκτιμούνται αρκετές παράμετροι, όπως ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, τα επίπεδα της β2 μικροσφαιρίνης και του διαλυτού CD23 στον ορό, τα επίπεδα της κινάσης της θυμιδίνης στον ορό, η ιστολογία του μυελού των οστών και οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες (82-84).

Τα συστήματα σταδιοποίησης Binet και Rai συμπληρώνονται από πρόσφατα ευρήματα που υποδιαιρούν περαιτέρω τη ΧΛΛ. Οι περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο ήπια εξέλιξη και υψηλότερη ολική επιβίωση. Αντίθετα, οι ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτες αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών έχουν πιο δυσμενή εξέλιξη (86). Σε μερικές περιπτώσεις ΧΛΛ

φαίνεται ότι στα κύτταρα του κλώνου συνεχίζεται η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και η μεταστροφή ισotyπou, επειδή εμφανίζουν ιδiosύστατα ενεργό το ένζυμο AID (activation –induced deaminase), όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά κύτταρα του βλαστικού κέντρου. Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Zap-70 ή CD38 έχει επίσης αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό περιπτώσεων Β-ΧΛΛ με διαφορετική κλινική εξέλιξη (85-88). Πρόσφατες ανοσοφαινοτυπικές και μοριακές μελέτες έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν φαινότυπο Β λεμφοκυττάρου μνήμης. Εφόσον η ΧΛΛ πιθανόν προέρχεται από έναν πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων μνήμης που έχουν εκτεθεί σε αντιγόνο, τα χαρακτηριστικά του λεμφοκυττάρου μνήμης ίσως αποκτώνται μετά τη νεοπλασματική εξαλλαγή (86). Ωστόσο δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν τα εμπλεκόμενα αντιγόνα είναι ξένα αντιγόνα ή αυτοαντιγόνα όπως και ποιος θα μπορούσε να είναι ο ακριβής ρόλος των αντιγόνων. Τα άτομα ενός πληθυσμού ίσως έχουν διαφορετική γενετική προδιάθεση σε ανάπτυξη κλώνων Β-ΧΛΛ κατά την απάντηση σε συγκεκριμένα αντιγόνα λόγω πολυμορφισμών στους γενετικούς τόπους των ανοσοσφαιρινών.

## 5.2 Γενετικές ανωμαλίες στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Πάρα το ότι δεν υπάρχει μια μοναδική κυτταρογενετική βλάβη που να θεωρείται διαγνωστική για τη ΧΛΛ, κάποιες κυτταρογενετικές ανωμαλίες παρατηρούνται συχνότερα (89,90). Στο 40-50% των περιπτώσεων εντοπίζονται κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες με συμβατικές μεθόδους κυτταρογενετικής. Η μέθοδος του φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* (FISH) βελτίωσε σημαντικά τη μεθοδολογία και επέτρεψε την ανάλυση των αλληλουχιών DNA ακόμη και σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Χρησιμοποιώντας τη μοριακή κυτταρογενετική μέθοδο FISH με μεγάλη ομάδα ανιχνευτών, γενετικές ανωμαλίες εντοπίζονται στο 80% των περιπτώσεων ΧΛΛ (91). Ο έλεγχος για χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε επίπεδο γονιδιώματος μπορεί να γίνει με τη μέθοδο του συγκριτικού υβριδισμού του γονιδιώματος (comparative genomic hybridization, CGH). Με τη μέθοδο αυτή υβριδίζονται σήμασμενα γενετικά δείγματα από καρκινικά κύτταρα και φυσιολογικά κύτταρα (μάρτυρες). Από τα πρότυπα υβριδισμού μπορεί να εντοπιστεί οποιαδήποτε προσθήκη ή απώλεια χρωμοσωμικών τμημάτων στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η συνδυασμένη χρήση των παραπάνω τεχνικών οδήγησε στην αναγνώριση των εξής κύριων χρωμοσωμικών ανωμαλιών:

### **5.2.1 Τρισωμία του χρωμοσώματος 12**

Η τρισωμία του χρωμοσώματος 12 αναφέρθηκε ως η πρώτη σταθερή χρωμοσωμική ανωμαλία στη ΧΛΛ και ήταν η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία σε πολλές κυτταρογενετικές μελέτες (89). Η συχνότητα της στις διάφορες μελέτες κυμαίνονταν από 7% έως 25% ή και περισσότερο. Η τρισωμία 12 έχει συσχετισθεί με αυξημένα ποσοστά άτυπων λεμφοκυττάρων ή προλεμφοκυττάρων, ανώμαλο ανοσοφαινότυπο και χειρότερη κλινική εξέλιξη.

### **5.2.2 Ελλείψεις στη χρωμοσωμική ζώνη 13q14**

Οι δομικές ανωμαλίες στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 13 είναι οι πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στη ΧΛΛ. Οι περισσότερες είναι ελλείψεις, ενώ κάποιες είναι ισοζυγισμένες μεταθέσεις (90). Στη χρωμοσωμική ζώνη 13q14 εντοπίζεται το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος RB1, γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που αρχικά θεωρήθηκε ότι συμβάλλει στην παθογένεση της ΧΛΛ. Ωστόσο ανωμαλίες που καταστρέφουν και τα δύο αλληλόμορφα του RB1 σπάνια παρατηρούνται στη ΧΛΛ, γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν έχει σημαντικό παθογενετικό ρόλο. Έτσι, το υποθετικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στις ελλείψεις του 13q και συμβάλλει στην ανάπτυξη ΧΛΛ δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Σχετικά με την κλινική σημασία των ανωμαλιών στη χρωμοσωμική ζώνη 13q14, αποδείχτηκε ότι ασθενείς με τέτοιες δομικές ανωμαλίες φαίνεται να έχουν πιο καλή πρόγνωση και πιθανότητες επιβίωσης παρόμοιες με τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο.

### **5.2.3 Ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23**

Η έλλειψη στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 ήταν η δεύτερη πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία και βρέθηκε ότι καθορίζει μια ομάδα ασθενών με ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρή επιβίωση. Ανάμεσα στα γονίδια που εντοπίζονται σε αυτό το χρωμοσωμικό τμήμα, πιο σημαντικά από παθογενετική άποψη μάλλον είναι τα γονίδια RDX (radixin) και ATM (ataxia telangiectasia mutated) (93). Παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλάξεις του ATM δε συμβαίνουν μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ, εύρημα που υποδηλώνει ότι οι ετερόζυγοι φορείς ATM μεταλλάξεων ίσως έχουν αυξημένη προδιάθεση σε ανάπτυξη ΧΛΛ (94).



### **5.2.4 Ελλείψεις στο χρωμόσωμα 17p και μεταλλάξεις του p53**

Οι δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος 17, οι περισσότερες με απώλεια του μικρού βραχίονα, ήταν σπάνιες στις αρχικές μελέτες. Παρόλα αυτά η ανακάλυψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική ζώνη 17q13 και η εξακρίβωση της σημασίας του στην εξέλιξη της νόσου αλλά και στη μικρή απάντηση στη θεραπεία υποκίνησαν αρκετές μελέτες που έδειξαν μεταλλάξεις του p53 σε ποσοστό 10-20% των περιπτώσεων ΧΛΛ (91,95). Το προϊόν του γονιδίου p53 έχει κείριο ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής απάντησης σε βλάβη του DNA, στον κυτταρικό θάνατο και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, δεν είναι παράδοξο ότι η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 σχετίζεται με κακή πρόγνωση και ανθεκτικότητα στη θεραπεία.

### **5.2.5 Άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες**

Μεταθέσεις που διαταράσσουν τα ογκογονίδια bcl-1 ή bcl-2 ανιχνεύονται στη ΧΛΛ, παρότι σπάνια. Στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης BCL-2 είναι υψηλά. Ακόμα οι περιπτώσεις με τα υψηλότερα επίπεδα bcl-2 ίσως έχουν πιο δυσμενή κλινική εξέλιξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, δεν υπάρχει εμφανής μετάθεση του ογκογονιδίου bcl-2 και έτσι δεν είναι σαφής ο λόγος για την υπερέκφραση της BCL-2 (95). Η ενεργοποίηση της BCL-2 ίσως σχετίζεται με την ενεργοποιημένη κατάσταση των λευχαιμικών κυττάρων στη Β-ΧΛΛ. Πρόσφατα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο TCL-1 υπερεκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις Β-ΧΛΛ. Στα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα, το γονίδιο TCL-1 εκφράζεται στα πρώιμα στάδια της οντογένεσης και καταστέλλεται στα όψιμα στάδια, πιθανόν μετά την επαφή των Β κυττάρων με ειδικό αντιγόνο και τη διέλευσή τους από το βλαστικό κέντρο.

### **5.3 Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία**

Η ανάλυση των μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στη μελέτη των νεοπλασμάτων των Β λεμφοκυττάρων. Οι κακοήθειες αυτές κατατάσσονται σε όγκους πριν το βλαστικό κέντρο, όγκους του βλαστικού κέντρου, ή όγκους μετά το βλαστικό κέντρο, ανάλογα με το αν έχει συμβεί σωματική υπέρμεταλλαξιγένεση και αν υπάρχει ενδοκλωνική ετερογένεια (intraclonal diversity). Η ανάλυση των γονιδίων IGH μπορεί να γίνει σε επίπεδο γενωμικού DNA ή cDNA. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου IGHV καταμετρούνται από την αρχή της περιοχής FR1 έως το τέλος της περιοχής FR3. Ο ορισμός της αλλαγής ενός

νουκλεοτιδίου ως μετάλλαξης και όχι ως πολυμορφισμού εξαρτάται από τη σύγκριση της κλωνικής αλληλουχίας με τη φυσιολογική μη αναδιαταγμένη αλληλουχία.

Παρότι οι αρχικές μελέτες των καρκινικών κυττάρων στη ΧΛΛ είχαν δείξει ότι τα κύτταρα αυτά είχαν λίγες ή καθόλου σωματικές μεταλλάξεις, αργότερα αυτό άλλαξε εντυπωσιακά. Η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών αποκάλυψε δυο κατηγορίες ΧΛΛ, με ή χωρίς σωματικές μεταλλάξεις (82). Στις σχετικές μελέτες, τα γονίδια VH με διαφορές >2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρήθηκαν ως «μεταλλαγμένα» (το όριο του 2% επιλέχθηκε ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τόπου IGH). Οι αλληλουχίες των γονιδίων VH που είχαν διαφορές <2% σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρήθηκαν ως «αμετάλλακτες». Οι μισές περίπου περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν IgM όπως και σχεδόν 75% των περιπτώσεων που έχουν υποστεί μεταστροφή ισοτύπου (και εκφράζουν IgG ή, σπανιότατα, IgA) παρουσιάζουν διαφορές >2% από το πλησιέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο. Η παρουσία και το φορτίο των μεταλλάξεων ποικίλει ανάμεσα στις διαφορετικές περιπτώσεις ΧΛΛ και φαίνεται να ακολουθείται μια ιεραρχία με βάση τη γονιδιακή οικογένεια IGHV και το συγκεκριμένο γονίδιο IGHV της οικογένειας που εκφράζεται από τα λευχαιμικά κύτταρα. Επίσης, οι μεταλλάξεις αντικατάστασης (replacement mutations, R) συσσωρεύονται κυρίως στις περιοχές CDR και όχι στις περιοχές FR (96,97).

Με βάση αυτά τα δεδομένα, η ΧΛΛ θεωρείται ετερογενής νόσος σε κυτταρικό επίπεδο και μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο υποομάδες ανάλογα με την παρουσία ή μη σημαντικού αριθμού μεταλλάξεων. Οι διαφορές αυτές μπορεί να υποδεικνύουν ότι οι πρόδρομοι των λευχαιμικών κυττάρων στη ΧΛΛ διεγέρθηκαν από διαφορετικούς τύπους αντιγόνου πριν την λευχαιμική εξαλλαγή ή ότι οι πρόδρομοι μεταμορφώθηκαν σε λευχαιμικά κύτταρα σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια της Β λεμφικής σειράς.

#### **5.4 Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία**

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ διαφέρει από το ρεπερτόριο στα φυσιολογικά CD5<sup>+</sup> κύτταρα του περιφερικού αίματος (97). Στα κύτταρα της ΧΛΛ χρησιμοποιούνται κυρίως οι γονιδιακές οικογένειες IGHV1, 3 και 4 και η κατανομή τους είναι διαφορετική από την αντίστοιχη στα φυσιολογικά περιφερικά CD5<sup>+</sup> Β λεμφοκύτταρα, τα οποία θεωρούνται ως πρόδρομοι των λευχαιμικών κυττάρων στη Β-ΧΛΛ. Ειδικότερα, η οικογένεια IGHV1 εκφράζεται περισσότερο, ενώ η οικογένεια IGHV3 λιγότερο σε σχέση με το ρεπερτόριο των κυκλοφορούντων CD5<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα γονίδια

είναι τα IGHV1-69, IGHV3-07, IGHV3-23 και IGHV4-34, μολονότι η σχετική συχνότητά τους ποικίλει στις διάφορες σειρές (98). Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ ίσως να σχετίζεται και με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως και να διαφέρει ανάλογα με την καταγωγή ή τον τόπο διαμονής των ασθενών. Μια πρόσφατη έρευνα σε Σκανδιναβούς ασθενείς με ΧΛΛ υπέδειξε μια τέτοια συσχέτιση. Στην ομάδα αυτή, συχνότερο γονίδιο στα λευχαιμικά κύτταρα ήταν το IGHV3-21, ένα γονίδιο που έχει βρεθεί σπάνια σε μελέτες σε ομάδες από άλλες γεωγραφικές περιοχές (99,100,101). Η χρήση των οικογενειών γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων και συγκεκριμένων γονιδίων IGKV/IGLV επίσης δεν είναι τυχαία. Ωστόσο, αντίθετα από το ρεπερτόριο IGHV, η έκφραση των γονιδίων IGKV/IGLV στη Β-ΧΛΛ δεν διαφέρει από το ρεπερτόριο των φυσιολογικών CD5<sup>+</sup> ή CD5<sup>-</sup> Β λεμφοκυττάρων.

Όταν εξετάζονται συνολικά τα δομικά χαρακτηριστικά των αναδιατάξεων των βαριών και ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ, τα λευχαιμικά κύτταρα μπορεί να διαιρεθούν σε δύο υποκατηγορίες που διαφέρουν ως προς τη χρησιμοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV, την παρουσία σημαντικού αριθμού μεταλλάξεων και ως προς τα χαρακτηριστικά της περιοχής HCDR3. Ο ένας τύπος αναδιάταξης VHDJH ανήκει στην «αμετάλλαχτη» ομάδα (διαφορά από το μη αναδιαταγμένο γονίδιο <2%) και έχει το γονίδιο IGHV1-69 ενώ η περιοχή HCDR3 να περιλαμβάνει ένα γονιδιακό τμήμα IGHD3-3 ενωμένο με ένα IGHJH6. Η ένωση τους έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μια σχετικά μακριάς δομής που περιέχει αρκετά κατάλοιπα τυροσίνης και έχει πιο όξινο φορτίο. Αντίθετα, ο τύπος αναδιάταξης που ανήκει στη «μεταλλαγμένη» ομάδα (διαφορά από το μη αναδιαταγμένο γονίδιο >2%) χρησιμοποιεί το γονίδιο IGHV3-07 με μια βραχεία και λιγότερο όξινη περιοχή HCDR3 που περιέχει το γονίδιο IGHJH4. Οι τύποι που αναφέρθηκαν παραπάνω υποδηλώνουν την τάση για κοινή δομή του Β κυτταρικού υποδοχέα στη ΧΛΛ. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ δεν παρατηρείται εμφανής προτίμηση για συγκεκριμένους συνδυασμούς γονιδίων VH και VK/VL (100).

## **5.5 Ενεργοποίηση και στάδια ωρίμανσης των λευχαιμικών κυττάρων στη Β-ΧΛΛ**

Υπό την προϋπόθεση ότι η εισαγωγή μεταλλάξεων στα γονίδια IgV των ανοσοσφαιρινών συμβαίνει μετά από διέγερση του Β κυτταρικού υποδοχέα από αντιγόνο, οι περιπτώσεις ΧΛΛ με μεταλλαγμένο αντιγονικό υποδοχέα (ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας) πρέπει να προέκυψαν από διεγερμένα Β λεμφοκύτταρα. Με τη λογική αυτή, τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ θα μπορούσε να είναι απόγονοι ώριμων «παρθένων» Β λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, επειδή η απουσία μεταλλάξεων

δεν σημαίνει αναγκαστικά και απουσία προηγούμενης διέγερσης από αντιγόνο, οι περιπτώσεις αυτές θα μπορούσε να προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που είχαν διεγερθεί από αντιγόνο αλλά δεν συγκέντρωσαν μεταλλάξεις. Αυτό θα μπορούσε να είναι συνέπεια του τύπου της αντιγονικής διέγερσης (πχ Τ ανεξάρτητη διέγερση) ή του χρόνου στον οποίο συνέβη η νεοπλασματική εξαλλαγή. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τη θεωρία ότι όλα τα λευχαιμικά κύτταρα στη ΧΛΛ προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που ήρθαν σε επαφή με αντιγόνο και συνεπώς δεν είναι «παρθένα» Β λεμφοκύτταρα. Επίσης, πρόσφατα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η διέγερση από αντιγόνο είναι προαπαιτούμενο για την εξέλιξη της Β-ΧΛΛ ακόμη και σε περιπτώσεις χωρίς σωματικές μεταλλάξεις (100-104).

### **5.6 Ανοσοφαινοτυπικές μελέτες**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων που εντοπίζονται στην επιφάνεια, στο κυτταρόπλασμα ή και στον πυρήνα των λεμφοκυττάρων, ονομάζονται κυτταρικοί δείκτες και χρησιμοποιούνται για τη διάκριση κυτταρικών υποπληθυσμών. Για τους κυτταρικούς δείκτες που αναγνωρίζονται με μονοκλωνικά αντισώματα έχει καθιερωθεί διεθνής ονοματολογία (Cluster of Differentiation, CD).

Ορισμένοι κυτταρικοί δείκτες εμφανίζονται σε ειδικά στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων. Με βάση την αρχή ότι τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα διατηρούν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αντίστοιχου φυσιολογικού λεμφοκυττάρου από το οποίο προήλθαν, η μελέτη των κυτταρικών δεικτών βοηθά ν' αναγνωριστεί η κυτταρική προέλευση των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι κυτταρικοί δείκτες ανιχνεύονται είτε με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής είτε με ανοσοενζυμικές τεχνικές και ανοσοϊστοχημεία. Σήμερα, η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση με τη χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιείται ευρέως για την αναγνώριση και καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος, του μυελού των οστών και των λεμφικών ιστών όπως επίσης και για τη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση ασθενών με λευχαιμίες και λεμφώματα.

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση είναι απαραίτητο εργαλείο για τη διάγνωση της ΧΛΛ. Ο Β- κυτταρικός πληθυσμός ποσοτικοποιείται από τη μέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν τους παν-Β δείκτες CD19 και CD20. Η κλωνικότητα του Β κυτταρικού πληθυσμού προσδιορίζεται από το λόγο των κ και λ ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών που εκφράζουν τα λεμφοκύτταρα σε συνέκφραση με τους Β δείκτες. Επίσης μετράται η συνέκφραση CD5 και CD20, ενώ στο διαγνωστικό πάνελ περιλαμβάνονται επίσης οι δείκτες CD10, CD23, FMC7 και HLA DR.

Χαρακτηριστικός φαινότυπος της ΧΛΛ είναι ένας μονοκλωνικός Β-λεμφοκυτταρικός πληθυσμός (CD19+) με χαμηλή ένταση (dim) έκφρασης των ανοσοσφαιρινών επιφάνειας, μονοτυπική ελαφριά αλυσίδα (κ ή λ), CD20+ (ασθενής), CD5+, CD23+ και CD22 αρνητικό. Σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης που προτάθηκε από τη Matutes, χαρακτηριστικό της ΧΛΛ είναι η έλλειψη έκφρασης του FMC7, που την διαφοροποιεί από άλλα Β κυτταρικά νεοπλάσματα. Άλλος παν-Β δείκτης είναι το CD79b, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία σε ετεροδιμερές σύμπλοκο με το CD79a μεσολαβεί στη διαβίβαση σήματος από την ανοσοσφαιρίνη στο εσωτερικό του Β-λεμφοκυττάρου. Η έκφραση του CD79b στη ΧΛΛ είναι ασθενής. Γι' αυτό το λόγο η προσθήκη του CD79b σε ένα πάνελ με πέντε στάνταρ δείκτες (CD5, CD22, CD23, FMC7, slg) βελτιώνει τη διαγνωστική ακρίβεια (ειδικότητα) του πάνελ.

Το CD20 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα CD5+ νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ εκφράζουν ασθενέστερα τον δείκτη CD20 από ότι τα άλλα Β κύτταρα και αυτή η ασθενής έκφραση (dim) έκφραση είναι διαγνωστική της ΧΛΛ. Άλλο ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηριστικό της ΧΛΛ είναι η ύψηλη έκφραση της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης CD23, η οποία υφίσταται πρωτεόλυση δίνοντας μόρια διαλυτού CD23. Ανεξαιρέτως όλα τα Β- ΧΛΛ κύτταρα εκφράζουν το μόριο CD27 που είναι μια διμερής μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και θεωρείται ως δείκτης για τα κύτταρα μνήμης. Τέλος, καθώς τα λευχαιμικά Β κύτταρα στη ΧΛΛ εμφανίζουν χαμηλή έκφραση των ανοσοσφαιρινών επιφάνειας, οι δύο πρωτεΐνες CD79b και CD79a οι οποίες αποτελούν μέρος του υποδοχέα του Β κυττάρου και απαραίτητες για τη διαβίβαση του αντιγονικού ερεθίσματος από την ανοσοσφαιρίνη εκφράζονται ασθενώς στη ΧΛΛ.

Οι ανοσοφαινοτυπικές μελέτες υποδεικνύουν ότι όλα τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και είναι ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά σε όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ υπερεκφράζουν τους δείκτες ενεργοποίησης CD23, CD25, CD69 και CD71 και υποεκφράζουν δείκτες που καταστέλλονται μετά από κυτταρική διέγερση και ενεργοποίηση, όπως οι CD22, FcγRIIb, CD79b και IgD (105). Αυτά τα λευχαιμικά κύτταρα αντιστοιχούν σε κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο: αυτό τεκμαίρεται και από την ομοιογενή έκφραση του CD27, ενός δείκτη που ταυτοποιεί τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης (106-108). Όταν συγκριθεί ο φαινότυπος της επιφάνειας των λευχαιμικών κυττάρων στις «αμετάλλακτες» και στις «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις ΧΛΛ, παρατηρούνται διαφορές ως προς την έκφραση των CD38, CD69, CD40 και HLA-DR. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα όλων των



περιπτώσεων ΧΛΛ, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων, είναι κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με το αντίγονο και έχουν ενεργοποιηθεί (109).

Η έκφραση του CD38 διαχωρίζει σαφώς δύο φαινοτυπικές υποομάδες. Σε κάποιες περιπτώσεις ελάχιστα νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα (ή και κανένα) εκφράζουν το δείκτη CD38, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τα ποσοστά είναι πολύ υψηλότερα και μπορεί να πλησιάζουν το 100%. Χαμηλή έκφραση CD38 παρατηρείται συχνότερα στις «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις Β-ΧΛΛ, και αντίστροφα. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες δεν επιβεβαιώνουν αυτή την ισχυρή συσχέτιση και η έκφραση του CD38 φαίνεται πως δεν αποτελεί έναν έγκυρο δείκτη που θα υποκαταστήσει το ποσοστό των μεταλλάξεων στα γονίδια VH στη ΧΛΛ (110).

### **5.7 Μήκος των τελομεριδίων και έκφραση της τελομεράσης**

Τα τελομερίδια είναι επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων που μειώνονται με κάθε κυτταρική διαίρεση. Έτσι, για ένα κύτταρο το μήκος των τελομεριδίων είναι ένα μέτρο της ιστορίας των διαιρέσεών του. Το μήκος των τελομεριδίων στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ, όπως προσδιορίζονται από την τεχνική FISH, είναι πολύ μικρότερα αν συγκριθούν με Β λεμφοκύτταρα από υγιείς δότες ίδιας ηλικίας. Επίσης, το μήκος των τελομεριδίων των «αμετάλλακτων» περιπτώσεων ΧΛΛ είναι πολύ μικρότερο από το αντίστοιχο των Β λεμφοκυττάρων υγιών δοτών της ίδιας ηλικίας: ακόμα πιο αξιοσημείωτο, είναι μικρότερο και από το μήκος των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων (111). Έτσι, φαίνεται ότι τα αμετάλλακτα λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα έχουν μακρά ιστορία κυτταρικών διαιρέσεων. Τέλος, προσδιορισμοί ενζυμικής ενεργότητας έδειξαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης στις αμετάλλακτες περιπτώσεις ΧΛΛ σε σχέση με τις μεταλλαγμένες (112).

### **5.8 Μεταβίβαση σήματος μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα στα λευχαιμικά κύτταρα της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας**

Τα παραπάνω μοριακά και φαινοτυπικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα πρόδρομα Β λεμφοκύτταρα από τα οποία προκύπτουν τα λευχαιμικά κύτταρα της Β-ΧΛΛ πιθανόν διεγέρθηκαν από αντιγόνο πριν ή κατά τη διάρκεια της λευχαιμικής εξαλλαγής. Ωστόσο είναι επίσης πιθανό η διέγερση από αντιγόνο να επάγει την ανάπτυξη συγκεκριμένων κλώνων ΧΛΛ μετά την εξαλλαγή. Αυτό υποστηρίζεται από το εύρημα ότι αρκετές περιπτώσεις ΧΛΛ έχουν ακέραια οδό μεταβίβασης σήματος

μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα. Οι περιπτώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα συχνές στην CD38+ «αμετάλλακτη» υποομάδα της Β-ΧΛΛ (113,114).

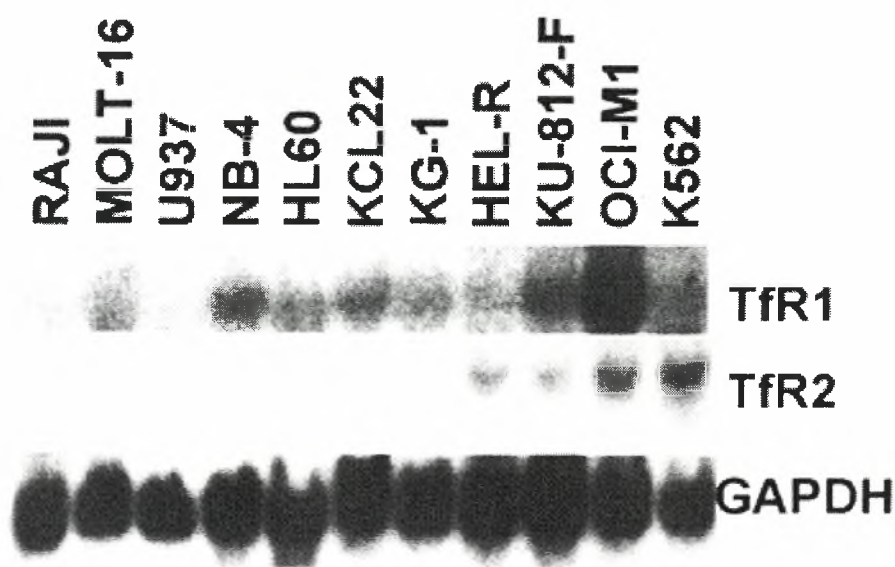
Τα σήματα που μεταβιβάζονται μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα μπορεί να έχουν διαφορετικές συνέπειες που εξαρτώνται από το στάδιο της ωρίμανσης και/ή την ενεργοποίηση των κυττάρων. Για παράδειγμα, τα ίδια σήματα μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απόπτωση των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων αλλά τον πολλαπλασιασμό των ώριμων λεμφοκυττάρων (115,116). Το επίπεδο της ενεργοποίησης του Β κυτταρικού υποδοχέα ποικίλει ανάλογα με το σθένος του αντιγόνου, την πυκνότητα του αντιγονικού επιτόπου και την οργάνωση του. Τα ώριμα, «παρθένα» Β λεμφοκύτταρα απαιτούν υψηλότερη συγκέντρωση αντιγόνου για την έναρξη μιας απάντησης από τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Αποδείχθηκε ότι στην πλειονότητα των «αμετάλλακτων» περιπτώσεων ΧΛΛ μπορεί να μεταβιβάζεται σήμα μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM. Αντίθετα, στην πλειονότητα των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ, είναι αδύνατη η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM *in vitro*. Σε ποσοστό περίπου 50% των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ στις οποίες η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM δεν ήταν δυνατή, η όλη διεργασία εξελισσόταν μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgD (116-119). Σε μια μικρότερη υποομάδα, η μεταβίβαση σήματος ήταν δυνατή μόνο μέσω της Ig-α. Η δυνατότητα μεταβίβασης σήματος μέσω άλλων μορίων του Β κυτταρικού υποδοχέα υποδεικνύει ότι τα επόμενα στοιχεία της οδού μεταβίβασης είναι λειτουργικά στη ΧΛΛ. Έτσι, η αστοχία της μεταβίβασης σήματος οφείλεται σε γεγονότα κοντά στη μεμβράνη και αποτελεί χαρακτηριστικό των ανεργικών κυττάρων. Η χαρακτηριστική ανεργική κατάσταση στην πλειονότητα των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ, και σε ένα ποσοστό «αμετάλλακτων», είναι πιθανώς το αποτέλεσμα προγενέστερων γεγονότων σηματοδότησης που κατέστησαν την κυτταρική μεμβράνη ανθεκτική σε περαιτέρω διέγερση. Παρόλα αυτά, στις «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις ΧΛΛ η έκφραση του CD38 τροποποιεί την ικανότητα για μεταβίβαση σήματος. Τα σήματα που μεταβιβάζονται μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα ίσως οδηγούν σε αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα και αυτό συνάδει με την παρουσία μικρότερων τελομεριδίων στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ (120).

Δυο μόρια που επιδρούν στο Β κυτταρικό υποδοχέα συνήθως εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ σε σχέση με τις «μεταλλαγμένες». Το πρώτο είναι το ένζυμο δεαμινάση της κυτιδίνης (AID), το οποίο εκφράζεται περισσότερο τουλάχιστον σε επίπεδο mRNA (121). Το δεύτερο γονίδιο που εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις είναι η ZAP-70 (zeta-associated protein 70), πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης που συνδέεται με



τμήμα με μεγάλη ομολογία (45% ταυτότητα και 66% ομοιότητα) με τον TfR-1. Η πρωτεΐνη TfR-2α περιέχει δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχηματίζει ομοδιμερές όπως ο TfR-1. Αντίθετα, η ισομορφή TfR2-β δεν έχει τα εξόνια 1-3, τα οποία κωδικοποιούν το κυτταροπλασματικό, το διαμεμβρανικό και το τμήμα της εξωκυττάριας περιοχής του TfR2-α, γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως είναι μια διαλυτή, ενδοκυττάρια μορφή του TfR-2 (136).

Όπως φάνηκε από αναλύσεις κατά Northern, το mRNA του TfR2-α εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στο ήπαρ, στα φυσιολογικά πρόδρομα ερυθροκύτταρα, σε ερυθρολευχαιμικές σειρές (K562, OCI-M1) και σε δείγματα μυελού των οστών από διάφορους ασθενείς με λευχαιμία της ερυθράς και μυελικής σειράς. Σε αυτές τις αναλύσεις δεν ανιχνεύθηκαν μετάγραφα που αντιστοιχούν στον TfR2-β. Αντίθετα, με ανάλυση RT-PCR διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της α- ισομορφής ήταν περιορισμένη στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους πνεύμονες, στους μυς, στον προστάτη και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ η β- ισομορφή του TfR-2 βρέθηκε σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς που εξετάστηκαν. Επιπλέον, μελετήθηκαν ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές από διάφορους ιστούς και οι περισσότερες από αυτές εξέφραζαν και τα δύο μετάγραφα του TfR-2 (α και β) (Εικόνες 28,29). Η ρύθμιση της έκφρασης του TfR-2 είναι διαφορετική από την αντίστοιχη του TfR-1. Επειδή το mRNA του TfR-2 δεν περιέχει IREs, η έκφρασή του δε ρυθμίζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα του σιδήρου αλλά από την κυτταρική διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η έκφραση του TfR-2 στο ήπαρ αυξάνει σε αντίθεση προς την έκφραση του TfR-1, που είναι αυξημένη στο εμβρυϊκό ήπαρ και μειώνεται κατά την ενήλικη ζωή(137). Η έκφραση των TfR-1 και -2 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης της ερυθράς σειράς είναι επίσης διαφορετική. Ο TfR-2 παρουσιάζει μείωση κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων, σε αντίθεση με τον TfR-1 που αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των MEL κυττάρων και των ερυθροκυττάρων του ανθρώπου (138) .



Εικόνα 29. Έκφραση του υποδοχέα-2 της τρανσφερίνης (TfR2) σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Εκτύπωση κατά Northern. Από (137).

Ο TfR-2 συνδέεται επίσης με την τρανσφερίνη, ανεξάρτητα από το pH, με μικρότερη συγγένεια σύνδεσης από την αντίστοιχη του TfR-1 (25-30 φορές). Μέχρι τώρα, η συμμετοχή του TfR-2 στον μεταβολισμό του σιδήρου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και ίσως συμμετέχει στη ρύθμιση της απορρόφησης του σιδήρου και στην ομοιόστασή του. Οι Vogt και συνεργάτες έδειξαν μια αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων TfR-1 και -2 σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν ταυτόχρονα και τους δύο υποδοχείς. Στην κυτταρική επιφάνεια και οι δύο υποδοχείς ταυτοποιούνται σε παρόμοιες θέσεις, ενώ στο εσωτερικό του κυττάρου και οι δύο υποδοχείς βρίσκονται σε κυστίδια, όπως τα ενδοσωμάτια (147). Οι πρωτεΐνες HFE και η τρανσφερίνη δεν εμποδίζουν τη σύνδεση TfR-1 και -2, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο TfR-2 συνδέεται με τον TfR-1 σε διαφορετική θέση από την κοινή για HFE και τρανσφερίνη (139,140,141).

## 6.2 Υποδοχείς τρανσφερίνης και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων συνοδεύεται από αλλαγές στην κυτταρική επιφάνεια τόσο ως προς την έκφραση όσο και ως προς την πυκνότητα κρίσιμων λειτουργικών μορίων. Τα νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ εκράζουν τους κλασικούς δείκτες ενεργοποίησης CD23, CD25, CD69 και CD71 (TfR-1). Επίσης, τα κύτταρα της ΧΛΛ εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των μορίων CD5 και CD27, εύρημα σύμφωνο με την υπόθεση της ενεργοποίησης, επειδή τα επίπεδα και των δύο αυτών δεικτών αυξάνουν κατά την κυτταρική ενεργοποίηση. Το CD27 είναι δείκτης του κυττάρων μνήμης: συνεπώς, η θετικότητα για το CD27 σε όλες σχεδόν τις

περιπτώσεις ΧΛΛ υποδηλώνει τα νεοπλασματικά κύτταρα της νόσου αντιστοιχούν σε Β λεμφοκύτταρα μνήμης που έχουν εμπειρία επαφής με αντιγόνο. Τα μόρια CD69 και CD71 είναι δείκτες κυτταρικής ενεργοποίησης που ακολουθούν διαφορετικό τρόπο έκφρασης. Το CD69 εκφράζεται αμέσως (μέσα σε 4 ώρες) μετά την κυτταρική διέγερση, σε αντίθεση προς το CD71 που εκφράζεται πολύ αργότερα. Τα μέχρι τώρα δεδομένα για την έκφραση του CD71 (TfR-1) σε αιματολογικές κακοήθειες έχουν δείξει ότι το CD71 πιθανόν συνδέεται με ορισμένα χαρακτηριστικά των νεοπλασματικών κυττάρων. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η προγνωστική σημασία της έκφρασής του. Οι Damle και συνεργάτες μελέτησαν την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης σε δείγματα ασθενών με ΧΛΛ και έδειξαν ότι οι περιπτώσεις που εκφράζουν το CD71 ανήκουν συνήθως στην ομάδα των ασθενών με μεταλλαγμένα γονίδια ανοσοσφαιρινών, σε αντίθεση προς το CD69 που εκφράζεται σε πολύ συχνότερα στην ομάδα των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις (100).

## **ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

## ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ομάδα μελέτης περιλαμβάνει 276 ασθενείς με τυπική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CD5+CD19+CD20+CD23+) που παρακολουθούνται στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ «Γ. Παπανικολάου» και στο Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας. Με βάση τα αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης, 180 ασθενείς εξέφραζαν κ ελαφριά αλυσίδα (λόγος κ/λ  $\geq 6$ ), ενώ 96 ασθενείς εξέφραζαν λ ελαφριά αλυσίδα (λόγος κ/λ  $<0,3$ ).

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα έγινε μετά από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση φικόλλης (Ficoll-Hyraque).

*Διαδικασία:*

1. Επιστοίβαση 5-7 ml ολικού αίματος σε 3 ml φικόλλης.
2. Φυγοκέντρηση σε 2000 rpm επί 15 λεπτά.
3. Συλλογή της στιβάδας των μονοπύρηνων και μεταφορά σε νέο σωληνάριο.
4. Προσθήκη 8 ml διαλύματος PBS.
5. Φυγοκέντρηση του δείγματος μετά από ήπια ανακίνηση σε 1800 rpm επί 5 λεπτά.
6. Απόρριψη υπερκείμενου και επανάληψη της φυγοκέντρησης.
7. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 1ml διαλύματος PBS.
8. Μέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο με τη χρήση πλάκας Neubauer και χρωστικής Trypan blue.

### 2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε με πέψη με πρωτεΐνάση K με τη βοήθεια του QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Οι στήλες (QIAamp Spin Columns) χρησιμοποιούνται για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων. Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτική σιλικόνης η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR. Έτσι δεν είναι αναγκαία η οργανική εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με την κλασική μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου.

Το kit περιέχει τις κατάλληλες στήλες, πρωτεΐνάση K, το διάλυμα AL (διάλυμα λύσης), τα διαλύματα AW1 και AW2 (διαλύματα για τις εκπλύσεις, απαιτείται αρχικά η προσθήκη αιθανόλης) και το διάλυμα AE (διάλυμα έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA).

#### *Διαδικασία:*

1. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάσης K, 200μl δείγματος (περίπου  $5 \times 10^6$  λεμφοκύτταρα σε 200μl PBS) και 200μl AL buffer (διάλυμα λύσης) σε σωληνάριο erpendorff (1,5ml)
2. Ανακίνηση ή vortex.
3. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 10 λεπτά.
4. Προσθήκη 200μl αιθανόλης (96%-100% αιθανόλη) στο σωληνάριο erpendorff και ανάδευση.
5. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη QIAamp και φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
6. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από την στήλη. Προσθήκη στην στήλη 500μl διαλύματος AW1. Φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
7. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από την στήλη. Προσθήκη στην στήλη 500μl AW2 buffer. Φυγοκέντρηση (20000g (14000rpm, 3 min).
8. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο erpendorff (1,5 ml) και προσθήκη στην στήλη 100μl AE buffer. Φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
9. Η στήλη απομακρύνεται. Το σωληνάριο erpendorff περιέχει το DNA και φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.

### **3. Απομόνωση RNA**

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο του θειοκυανικού γουανιδινίου (110) σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

1. *Ομοιογενοποίηση.* Λύση των κυττάρων με διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα σε 1.2 ml διαλύματος φαινόλης/θειοκυανικού γουανιδινίου (Fenozol).
2. *Διαχωρισμός φάσεων.* Οι χειρισμοί γίνονται ενώ τα δείγματα είναι στον πάγο. Προσθήκη 150 μl χλωροφορμίου και έντονη ανάδευση. Φυγοκέντρηση στις 15,130 rpm επί 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση. Το RNA έχει απομονωθεί στην υδατική φάση.
3. *Κατακρήμνιση του RNA.* Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο erpendorff. Το RNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης και το δείγμα ψύχεται στους -20°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15,130 rpm επί 15



λεπτά στους 4°C. Σχηματίζεται έτσι το ίζημα RNA, πλευρικά στον πυθμένα του σωληναρίου erpendorff.

4. Έκπλυση του RNA. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 1ml αιθανόλη 70%. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 15,130rpm επί 15 λεπτά στους 4°C. Αφαίρεση υπερκειμένου. Επανάληψη.

5. Εναπαναδιάλυση του RNA. Το ίζημα του RNA στεγνώνει και στη συνέχεια διαλύεται σε νερό ελεύθερο από RNAάσες.

6. Αποθήκευση στους -80°C.

#### 4. Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 30μl (Βλ.Πίνακα Ι). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl). Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν επίσης RT buffer (5x), dNTPs (10mM), αναστολέας RNAασών, DTT (0.1M). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό κυτταρικό RNA, το οποίο αρχικά διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA αρχικά θερμάνθηκε στους 65°C επί 10min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.

Πίνακας Ι. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη αντίδραση σύνθεσης cDNA.

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
RT buffer 5x*	6μl
Αναστολέας RNAασών(40U/μl)	1.5μl
dNTPs(10mM)	1.5μl
DTT(0.1M)	3μl
Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/ml)	3μl
MMLV RT (200U/μl)	1.5μl (300U)
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 30 μl
<b>Υπόστρωμα:</b>	
RNA	1 μg
ddH <sub>2</sub> O	3.5μl

\*Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος (RT buffer) 5x: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>

*Συνθήκες αντίδρασης:*

1. 37°C , 60 λεπτά
2. 65°C , 10 λεπτά
3. τελική θερμοκρασία: 18 °C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 3μl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας II) χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8, Πίνακας V) (149).

*Συνθήκες αντίδρασης:*

- αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5min
- κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
  - φάση αποδιάταξης: 94°C, 1min
  - φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1min
  - φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1:30 min
- τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10min

Πίνακας II. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης RARα.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκοι/συγκεντρώσεις</b>
Υπόστρωμα: cDNA	3μl
RB 10x	5μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2μl (2mM)
dNTPs(10mM)	1 μl (200μM για κάθε ένα)
RAR6	1.5 μl
RAR8	1.5 μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0,5 μl (2.5 units)
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl

## 5. Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Εκφραζόμενες κλωνικές αναδιατάξεις της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών ενισχύθηκαν με την τεχνική PCR. Για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-J χρησιμοποιήθηκαν οι συναινετικοί εκκινητές (consensus primers) Vκ1-6, Vκ1-IV, και Jκ1-5 ως μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (βλ. Πίνακα V). Οι εκκινητές αυτοί είναι αντιπροσωπευτικοί για καθεμιά από τις έξι οικογένειες γονιδιακών τμημάτων IGKV και αντίστοιχα για τα γονιδιακά τμήματα IGKJ1-5. Στις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα cDNA.

Η αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 100μl. Εκτός από εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν επίσης RB buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> (50mM), dNTPs (10mM), Taq polymerase (5 units/μl). Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις και ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στους πίνακες III και IV (αντίδραση PCR για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-J) και στους πίνακες VI και VII (αντίδραση PCR για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-KDE και JKI-KDE).

Πίνακας III. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την ενίσχυση των αναδιατάξεων IGKV-J με τους εκκινητές Vκ1-6 και Jκ1-5.

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα	cDNA:5 μl , DNA:1μg
RB 10x*	10μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3 μl (1.5mM)
dNTPs(10mM)	2 μl (0.2mM για κάθε ένα)
μείγμα εκκινητών Vκ 1-6	6 μl
μείγμα εκκινητών Jκ 1-5	6 μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 100 μl

\*Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RB10x (PCR buffer): 500mM KCL, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4).

Πίνακας IV. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την ενίσχυση των αναδιατάξεων IGKV-J με τους εκκινητές VκI-IV και Jκ1-5.

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα	cDNA:5 μl , DNA:1μg
RB 10x	10μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3 μl
dNTPs(10mM)	2 μl (0.2mM για κάθε ένα)
VκI-IV	4 μl
μείγμα εκκινητών Jκ 1-5	6 μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 100 μl

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίδρασης και τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβανόταν ένα σωληνάριο που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από υπόστρωμα (PCR control).

Οι συνθήκες αντίδρασης είναι κοινές για τις αντιδράσεις ενίσχυσης των συμβολών IGKV-J. Τα στάδια της αντίδρασης PCR και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες αναλύονται παρακάτω:

#### Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5min

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

    φάση αποδιάταξης: 94°C, 1min

    φάση σύνδεσης εκκινητών: 59°C, 1min

    φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1,5min

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10min

## 6. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 3% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, 10mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE buffer. Κάθε προϊόν PCR απομονώνεται κόβοντας με προσοχή την πηκτή ακριβώς δίπλα στη ζώνη του προϊόντος. Το κομμάτι πηκτής που περιέχει τη ζώνη τοποθετείται σε σωληνάριο erpendorff. Για τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από το gel αγαρόζης χρησιμοποιείται το QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Χρησιμοποιούνται στήλες με ικανότητα δέσμευσης του προϊόντος PCR σε μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης. Τα διαλύματα του kit βοηθούν την σωστή ανάκτηση του DNA το οποίο προσροφάται στη μεμβράνη παρουσία υψηλής αλατότητας, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά διέρχονται από τη στήλη. Το προϊόν PCR τελικά εκλύεται με διάλυμα Tris.

Διαλύματα που περιέχονται στο kit:

- Διάλυμα QG : περιέχει θειοκυανικό γουανιδίνιο
- Διάλυμα PE : απαιτεί προσθήκη αιθανόλης (96-100%)
- Διάλυμα EB : (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)

*Διαδικασία:*

1. Ζύγισμα του κομματιού πηκτής και προσθήκη 3 όγκων διαλύματος QG για 1 όγκο πηκτής (100mg ~ 100μl).
2. Επώαση στους 50°C επί 10λεπτά. Vortex κάθε 2-3λεπτά. Πλήρης διαλυτοποίηση της αγαρόζης.
3. Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης στο δείγμα και ανάδευση.
4. Μεταφορά του μείγματος στη στήλη που είναι τοποθετημένη σε δοχείο συλλογής 2 ml
5. Φυγοκέντρηση (12,000 rpm, 2 λεπτά)
6. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο συλλογής.
7. Προσθήκη 0.5ml διαλύματος QG και φυγοκέντρηση (12,000 rpm, 2 λεπτά)
8. Απόρριψη διηθήματος, προσθήκη 0.75ml διαλύματος PE.
9. Αναμονή 2-5 λεπτά και φυγοκέντρηση (12,000 rpm, 2 λεπτά)
10. Απόρριψη διηθήματος και φυγοκέντρηση επί 1 λεπτό (13,000 rpm)
11. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (1.5 ml)
12. Προσθήκη 50μl διαλύματος EB στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης και φυγοκέντρηση (13,000 rpm, 1 min) για την έκλυση του DNA.



## **7. Ανάλυση αλληλουχίας των προϊόντων PCR**

Άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των καθαρισμένων προϊόντων PCR με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυντεθειμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger) (150) σε αυτόματο αναλυτή [Applied Biosystems ABI 3730 sequencer, version 1 "Big Dye" dye-terminator chemistry (ABI)]. Για την ανάλυση του αντισυνθετικού (3'→5', antisense) κλώνου χρησιμοποιήθηκαν συναινετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες των γονιδίων IGKJ, ενώ για την ανάλυση του κωδικού κλώνου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για την αλληλουχία εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία που προέκυψε από το πρώτο διάβασμα (αλληλουχία antisense κλώνου). Κάθε αντίδραση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε προϊόντα PCR τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων ενίσχυσης που είχαν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές ημέρες.

## **8. Ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων στα αναδιαταγμένα γονίδια της μεταβλητής περιοχής των ανοσοσφαιρινών**

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που προέκυψαν μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) με τις συγγενέστερες, μη αναδιαταγμένες αλληλουχίες των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) και στη διεθνή βάση δεδομένων ανοσογενετικής IMGT (international ImMunoGeneTics database, <http://imgt.cines.fr>. δημιουργία και συντονισμός: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France) (151-153). Υπολογίστηκε η ομολογία του κάθε γονιδίου με το αντίστοιχο του μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline gene).

### *Ονοματολογία*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το σύστημα ονοματολογίας της IMGT (ονοματολογία εγκεκριμένη από το HUGO, Human Genome Organization, 1999) για τα γονιδιακά τμήματα IGKV και IGKJ. Το σύστημα ονοματολογίας IMGT/HUGO εκτός από το όνομα κάθε γονιδίου παρέχει και πληροφορίες για τον αριθμό των

αλληλομόρφων και τη λειτουργικότητα του κάθε γονιδίου (ως λειτουργικά ορίζονται τα γονίδια με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης χωρίς κωδικόνιο τερματισμού, που διαθέτουν λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία, αλληλουχίες RSS ή αλληλουχίες συρραφής), όπως και τους αριθμούς πρόσβασης των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences) και τον κωδικό πρόσβασης ID στις βάσεις δεδομένων Genome Database GDB και NCBI LocusLink, όπου έχουν κατατεθεί οι αλληλουχίες όλων των γονιδίων IGK στον άνθρωπο. Ανάλογα με τη βαρύτητα των ελαττωμάτων σε κάποια γονίδια, αυτά θεωρήθηκαν ως ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF), ψευδογονίδια ή υπολειμματικά (154-156).

### *Οι αρχές ταξινόμησης και ονοματολογίας*

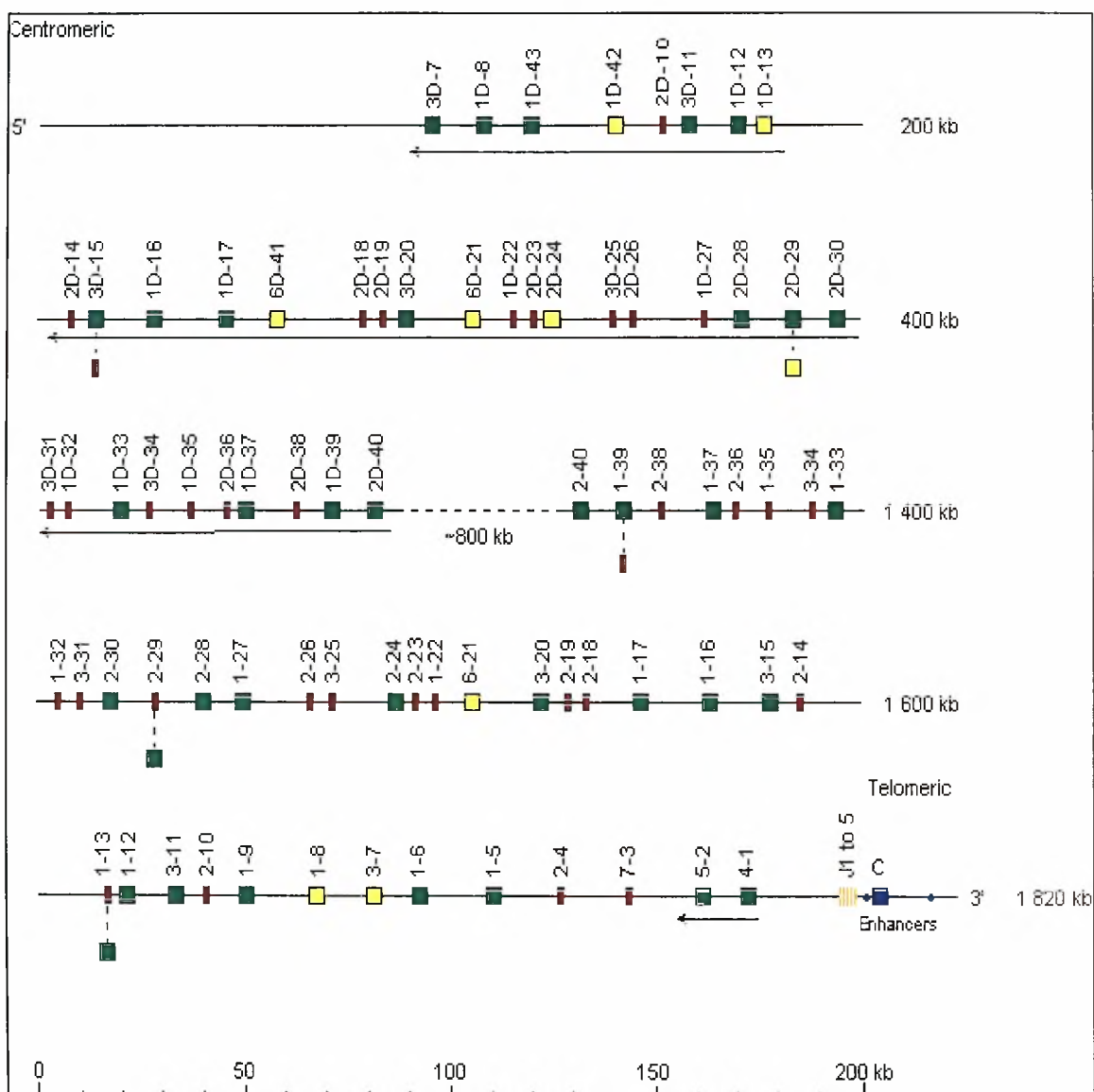
Το όνομα κάθε γονιδίου συντίθεται από τέσσερα μέρη:

- Γενετικός τόπος: ορίζεται ως IGK για την κ ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών.
- Ομάδα: δηλώνει τον τύπο του γονιδιακού τμήματος (V, D, J ή C) πχ IGKV
- Υποομάδα: δηλώνει μια οικογένεια γονιδίων που ανήκουν στην ίδια ομάδα και η ελάχιστη ομολογία μεταξύ τους είναι 75%. (πχ. IGKV3)
- Γονίδιο: ένας αριθμός προστίθεται για να ορίσει την αλληλουχία ενός γονιδίου (πχ. IGKV3-20)
- Αλληλόμορφο: για κάθε γονίδιο έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε επίπεδο αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς (το αλληλόμορφο αυτό ορίζεται ως \*01, πχ IGKV3-20\*01) (Εικόνα 1)

**Εικόνα 1. Αναπαράσταση του ανθρώπινου γονιδιακού τόπου της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGK) στη χρωμοσωμική θέση 2p11.2. Τα γονίδια δεν είναι σχεδιασμένα υπό κλίμακα ενώ τα εξόνια δεν φαίνονται. Στο 3' άκρο διακρίνονται τα γονίδια IGKV της J-proximal περιοχής ενώ στο 5' άκρο διακρίνονται τα γονίδια IGKV της IGKJ-distal περιοχής. Ο όρος ψευδογονίδιο χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια μη λειτουργική αλληλουχία DNA η οποία μοιάζει με γνωστό γονίδιο. Από αναφορά 154.**

Υπόμνημα: γονίδια IGKV

- Λειτουργικό γονίδιο
- Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)
- Ψευδογονίδιο (pseudogene)
- 



Το IMGT χρησιμοποιεί ένα σύστημα αρίθμησης για τα κωδικόνια των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών, που στηρίζεται στην ιδιαίτερα συντηρημένη δομή της μεταβλητής περιοχής. Για την αρίθμηση χρησιμοποιήθηκαν δομικά δεδομένα από περίθλαση ακτίνων Χ, τα όρια των περιοχών FR και CDR και ο χαρακτηρισμός των υπερμεταβλητών βρόχων. Επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι περιοχές FR και CDR (157).

#### *Ανάλυση μεταλλάξεων*

Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που βρέθηκε να περιέχουν μεταλλάξεις υποβλήθηκαν σε ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων προκειμένου να υπολογισθεί η πιθανότητα επιλογής από αντιγόνο, σύμφωνα με το πολυπαραμετρικό μοντέλο που προτάθηκε από τους Lossos et al (158). Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που «επιλέγονται» από αντιγόνο κατά κανόνα δείχνουν υψηλότερη συγκέντρωση μεταλλάξεων που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος (μεταλλάξεις R, replacement mutations) στις περιοχές CDR σε σχέση με τις περιοχές FR. Υπολογίσθηκε ο αριθμός των μεταλλάξεων R και ο αριθμός των «σιωπηρών» αντικαταστάσεων βάσεων (μεταλλάξεις S, silent mutations) στις περιοχές CDR και FR μελετώντας κάθε κωδικόνιο. Στις περιπτώσεις όπου υπήρχαν περισσότερες από μια μεταλλάξεις σε ένα κωδικόνιο, κάθε μετάλλαξη ορίστηκε ανεξάρτητα ως μετάλλαξη R ή S. Το μαθηματικό μοντέλο των Lossos et al. (μικροεφαρμογή σε JAVA διαθέσιμη στο <http://www-stat.stanford.edu/immunoglobulin>) υπολογίζει τη στατιστική πιθανότητα μια αλληλουχία να έχει επιλεγεί από αντιγόνο με βάση τον αριθμό των μεταλλάξεων R και S στις περιοχές CDR και FR, εκτιμώντας παράλληλα τον συντελεστή  $R_f$ . Ο συντελεστής  $R_f$  χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ενδογενούς επιδεκτικότητας μιας αλληλουχίας σε εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων αντικατάστασης βάσεων. Μια αλληλουχία θεωρήθηκε ότι έχει επιλεγεί από αντιγόνο μόνο στις περιπτώσεις όπου οι δύο στατιστικές πιθανότητες (P-values),  $P_{FRS}$  και  $P_{CDRS}$  δεν ξεπερνούσαν το 0.05.

## **9. Προσδιορισμός του αριθμού των μορίων του TfR στην κυτταρική επιφάνεια με κυτταρομετρία ροής**

Το πάνελ των αντισωμάτων που περιγράφεται στον Πίνακα VI χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διαφόρων κυτταροπλασματικών και επιφανειακών κυτταρικών δεικτών. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε σε ολικό αίμα και τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ανάλυση της έκφρασης κάποιου συγκεκριμένου δείκτη επιφανείας, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα πάντα σε συνδυασμό με το CD19 (Πίνακας VI).

Τα στάδια της ανάλυσης έχουν ως εξής:

1. Επώαση ολικού αίματος με τα μονοκλωνικά αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου επί 15 λεπτά.
2. Λύση των κυττάρων χωρίς πλύσιμο με χλωριούχο αμμώνιο.
3. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
4. Διάλυση του ιζήματος σε 0.5 ml PBS.
5. Ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή Coulter Epics XL-MCL.

Στον πληθυσμό των CD19+ κυττάρων μετράται το ποσοστό των θετικών κυττάρων για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα. Έχουμε τη δυνατότητα να επικεντρωνόμαστε στο πληθυσμό που μας ενδιαφέρει, αφού μαζί με κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα έχουμε προσθέσει το CD19. Το ισουπτικό κοντρόλ ορίζεται στο 1,5 – 2 % (θετικός ουδός, “cut-off”).

Η ένταση έκφρασης των δεικτών ποσοτικοποιείται μ’ έναν νέο δείκτη που ονομάστηκε «δείκτης θετικότητας» (positivity index, pi). Αυτός ο «δείκτης θετικότητας» για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα είναι ο λόγος της μέσης έντασης του φθορισμοχρώματος για το συγκεκριμένο δείκτη προς την αντίστοιχη μέση ένταση φθορισμοχρώματος του κοντρόλ. Σε περιπτώσεις κυτταρικών δεικτών με δείκτη θετικότητας μικρότερο του 2 ( $pi < 2$ ), η έκφραση ορίζεται ως ασθενής (dim). Αντίθετα, οι κυτταρικοί δείκτες που εκφράζονται έντονα (bright) έχουν δείκτη θετικότητας μεγαλύτερο του 2 ( $pi > 2$ ).

Η κλωνικότητα του B- λεμφοκυτταρικού πληθυσμού όσον αφορά την έκφραση των ελαφριών αλυσίδων, προσδιορίζεται από το λόγο του κ/λ. Στις περιπτώσεις των CD19+ κυττάρων που το κ/λ > 6, αυτά χαρακτηρίζονται ως κ-μονοκλωνικά. Αντίθετα, έχουν λ μονοκλωνικότητα οι πληθυσμοί B-λεμφοκυττάρων με λόγο κ/λ < 0.3.

Σε όλες τις περιπτώσεις το νεοπλασματικό φορτίο ήταν τουλάχιστον 70%.

## 10. Ποιοτική μοριακή ανάλυση της έκφρασης του TfR

### A. TfR1

	<i>ΕΞΟΝΙΑ 5-11</i>	<i>ΕΞΟΝΙΑ 15-17</i>
Υπόστρωμα	cDNA: 500 ng	cDNA: 500 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *	10 µl	10 µl
dNTPs	2 µl	2 µl
Εκκινητές**	5s/11as	15s/17as
Ενζυμο	Taq DNA Πολυμεράση: 2.5 U	Taq Πολυμεράση: 2.5 U
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελ. όγκου 100 µl	μέχρι τελ. όγκου 100 µl

\* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCL pH 8.3/ 50 mM KCl/ 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

\*\* Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα V.

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94<sup>o</sup> C, 5'

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94<sup>o</sup> C, 1'

φάση σύνδεσης εκκινητών: 55<sup>o</sup> C, 1'

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72<sup>o</sup> C, 1'

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72<sup>o</sup> C, 10'

### B. TfR2

	<i>TfR2α</i>	<i>TfR2β</i>
Υπόστρωμα	cDNA: 500 ng	cDNA: 500 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *	10 µl	10 µl
dNTPs	2 µl	2 µl
Εκκινητές**		
Ενζυμο	Taq DNA Πολυμεράση: 2.5 U	Taq Πολυμεράση: 2.5 U
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελ. όγκου 100 µl	μέχρι τελ. όγκου 100 µl

\* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCL pH 8.3/ 50 mM KCl/ 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

\*\* Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα V.



Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94<sup>o</sup> C, 5'

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94<sup>o</sup> C, 1'

φάση σύνδεσης εκκινητών: 58<sup>o</sup> C (TfR2α), 1' / 59<sup>o</sup> C (TfR2β), 1'

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72<sup>o</sup> C, 1'

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72<sup>o</sup> C, 10'

### **11. Ποσοτική μοριακή ανάλυση της έκφρασης του TfR1 με την τεχνική της συναγωνιστικής PCR**

Η αντίδραση RT-PCR προσλαμβάνει “ποσοτική” διάσταση με την παράλληλη ενίσχυση cDNA από τα προς έλεγχο δείγματα (cDNA-“στόχος”) και μορίων “συναγωνιστή” (competitor), που ενισχύονται με τους ίδιους εκκινητές. Από την PCR προκύπτουν δύο ζώνες ενίσχυσης, μια για το cDNA-στόχο και μια για τον “συναγωνιστή”. Η συγκέντρωση του cDNA-στόχου εκτιμάται με βάση τη γνωστή συγκέντρωση μορίων “συναγωνιστή” στην οποία οι δύο ζώνες ενίσχυσης έχουν την ίδια ένταση.

Στην παρούσα μελέτη, ως “συναγωνιστές” θα χρησιμοποιηθούν τεχνητά μόρια DNA που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας με ενίσχυση με την τεχνική PCR αλληλουχιών του γονιδίου της γ-σφαιρίνης (τυχαία αλληλουχία) με εκκινητές που έφεραν στα άκρα τους αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν σε αλληλουχίες του γονιδίου του TfR.

Υπόστρωμα	cDNA: 500 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *	10 μl
dNTPs	2 μl
Εκκινητές**	5sy3/11asy4
Ενζυμο	Taq DNA Πολυμεράση: 2.5 U
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τελ. όγκου 100 μl

\* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCL pH 8.3/50 mM KCl/1.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

\*\* Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα V.

Συνθήκες αντίδρασης: είναι κοινές και για τα δύο στάδια:

-αρχική αποδιάταξη: 94<sup>0</sup> C, 5'

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94<sup>0</sup> C, 1'

φάση σύνδεσης εκκινητών: 55<sup>0</sup> C, 1'

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72<sup>0</sup> C, 1'

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72<sup>0</sup> C, 10'

## **12. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του Tfr με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

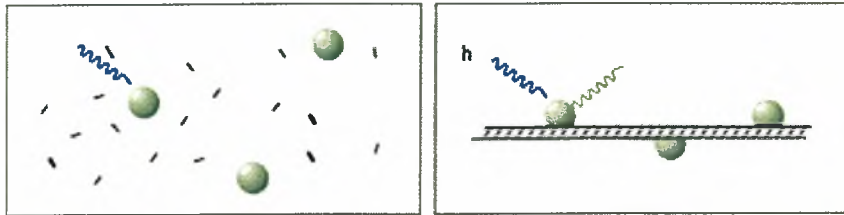
### *12.1 Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)*

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR).

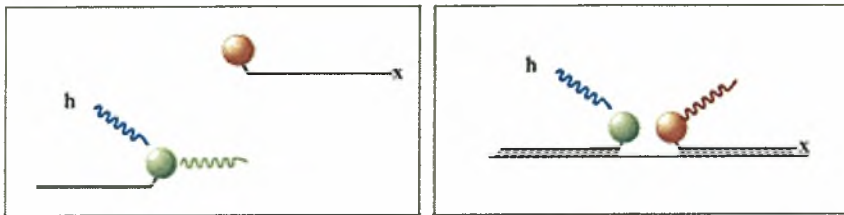
Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή μικρό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη. (159)

Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR):

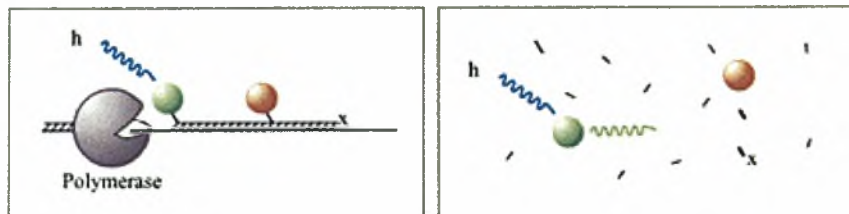
### I. SYBR Green



### II. Hybridization Probes



### III. TaqMan Probes

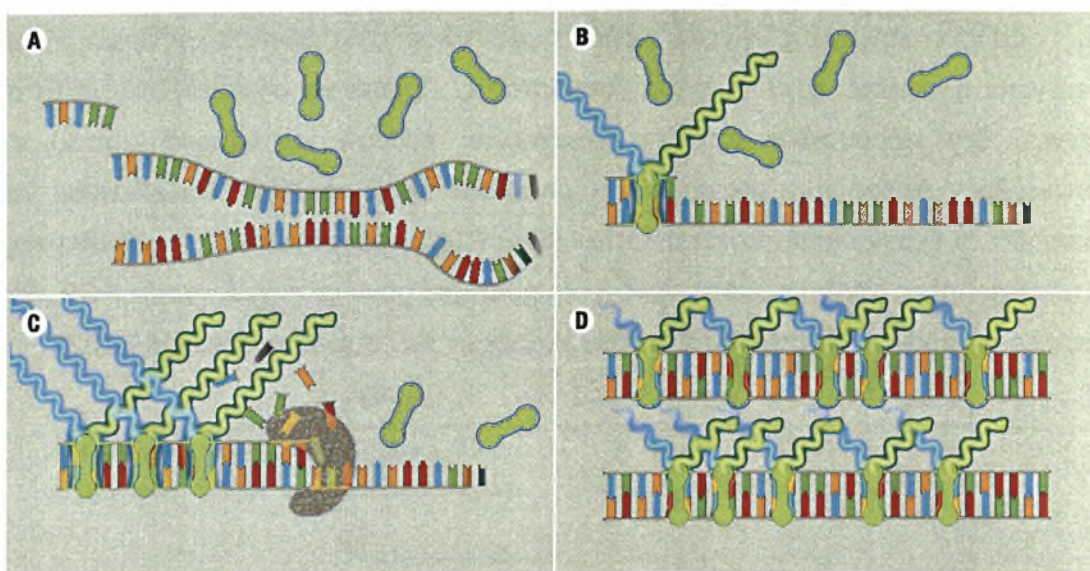


Εικόνα 2. Πρωτόκολλα PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης. Από κατάλογο Roche Applied Sciences.

#### A. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του. Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια

της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης.(160-162)

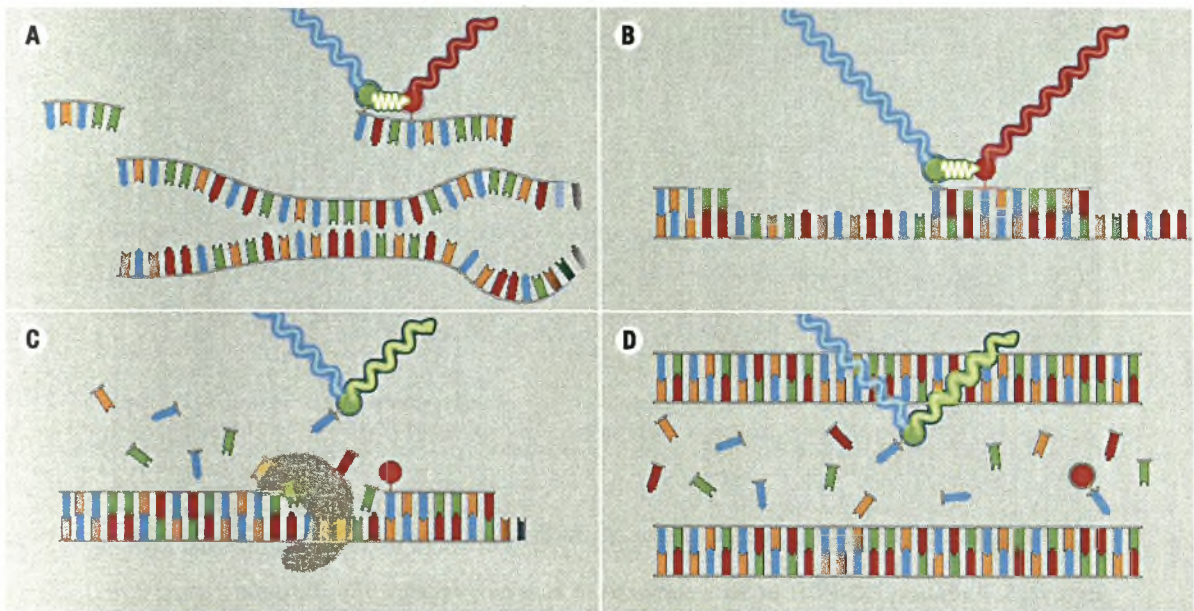


Εικόνα 3. Η χρωστική SYBR Green παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.

#### B. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για ν' ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς. (162)

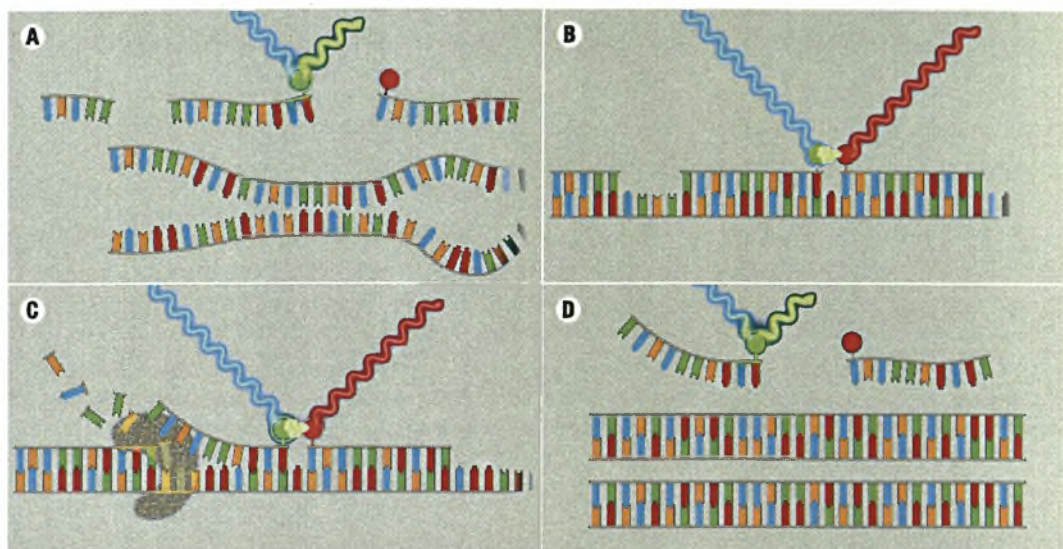




Εικόνα 4. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

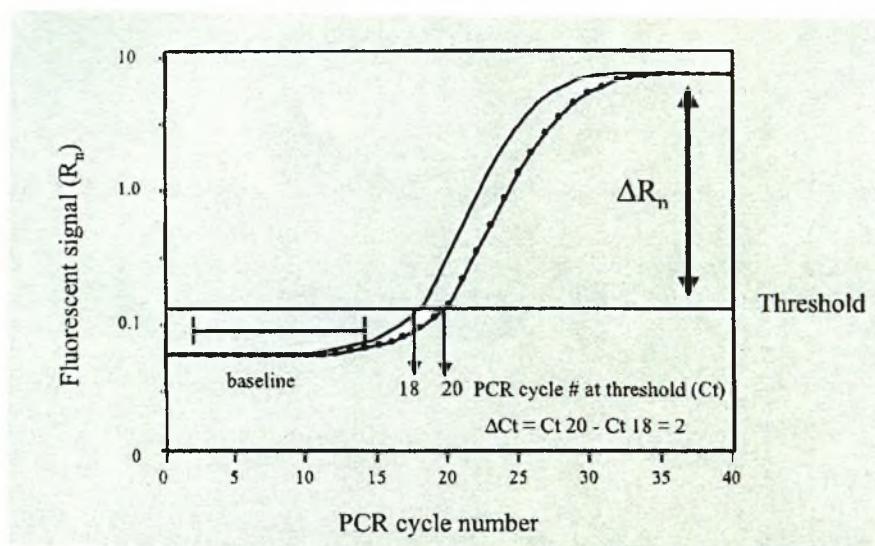
#### Γ. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). (160-162)



Εικόνα 5. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα. (163,164)



Εικόνα 6. Κύκλος-ουδός (threshold cycle). Από αναφορά 160.

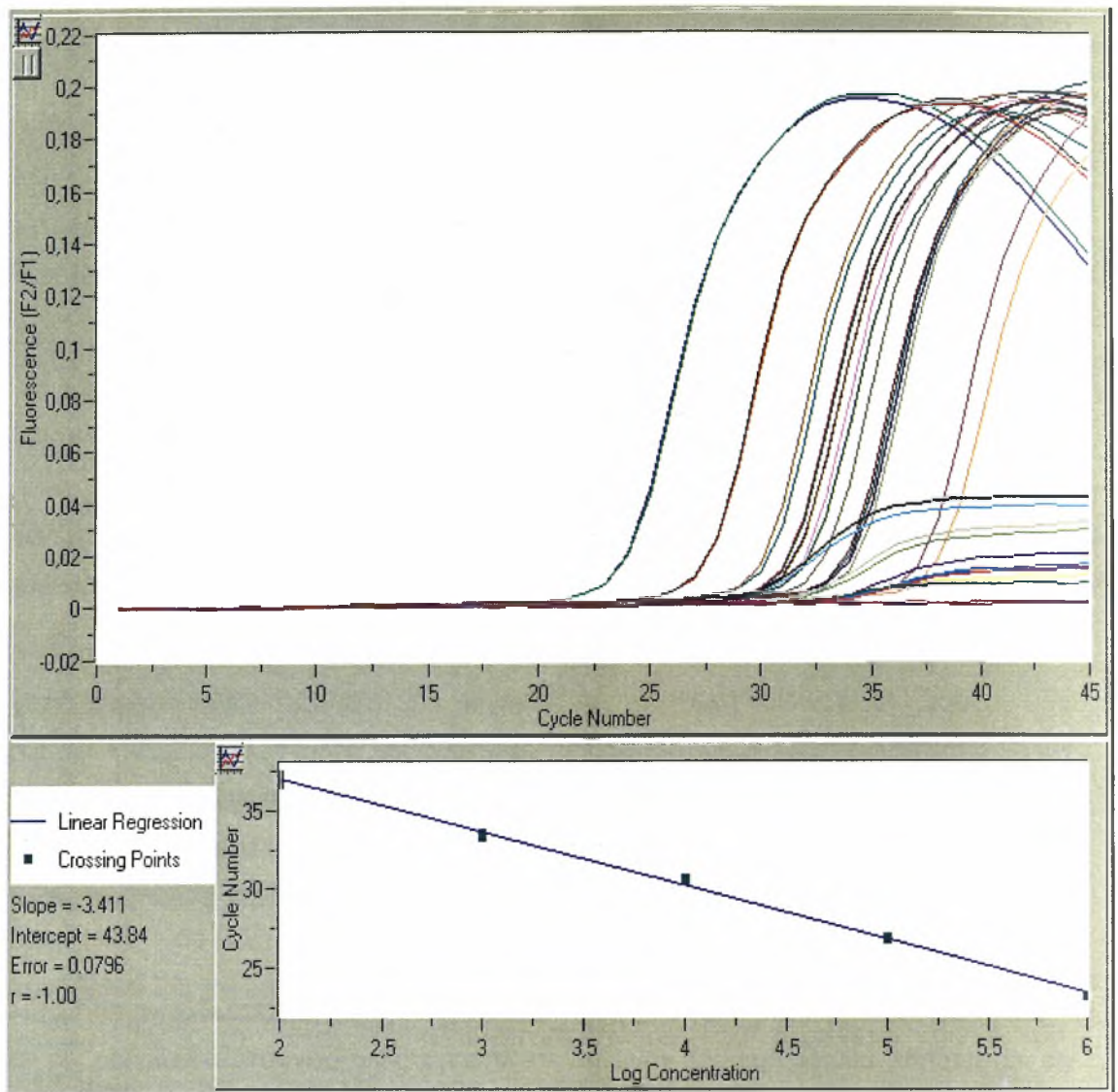
Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσοτέρων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση. (165)

Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. (166)

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. (167)





Εικόνα 7. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche). Πάνω μέρος της εικόνας: η κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και η θέση της αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωσή των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Κάτω μέρος της Εικόνας: η πρότυπη καμπύλη (standard curve).

## 12.2 Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (TfR) με την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.

### A. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA

Ολικό κυτταρικό RNA απομονώνεται από δείγματα περιφερικού αίματος με τη μέθοδο του ισοθειοκυανικού γουανιδινίου και μεταγράφεται *in vitro* σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV. Ο τελικός όγκος του cDNA (20  $\mu$ l) αραιώνεται 1:10 σε τελικό όγκο 200  $\mu$ l όπως συνιστάται.

### B. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του υποδοχέα τρανσφερρίνης 1 και των δύο ισομορφών του υποδοχέα τρανσφερρίνης 2 χρησιμοποιήθηκε το kit "Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes".

Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με "εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία" χρησιμοποιώντας το όργανο Light Cycler. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο HPRT. Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου HPRT που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων ( $5 \times 10^{-6}$  –  $5 \times 10^{-2}$  ανά 5  $\mu$ l δείγματος).

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς (HPRT) περιέχει:

- Δις απεσταγμένο νερό	: 7.6 $\mu$ l
- MgCl <sub>2</sub> 25 mM	: 2.4 $\mu$ l
-Διάλυμα ανίχνευσης h-HPRT (10X)	: 2.0 $\mu$ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 $\mu$ l
-Γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 $\mu$ l

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15  $\mu$ l προστίθενται 5  $\mu$ l cDNA του δείγματος.



Το διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (TfR) περιλαμβάνει:

-Δις απεσταγμένο νερό	: 9.4 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής TfR1- FL (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Εκκινητής TfR1- LC (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-MgCl <sub>2</sub> 25 mM	: 1.6 μl
-Ανιχνευτής FL	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής LC	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Το παραπάνω πρωτόκολλο αναφέρεται στην προετοιμασία του κυρίου διαλύματος αντίδρασης για τους υποδοχείς TfR1 και TfR2α, ενώ για τον TfR2β η μόνη διαφορά έγκειται στην ποσότητα του MgCl<sub>2</sub> (25 mM) που χρησιμοποιείται (0.8 μl) (αναφορικά με τη συγκέντρωση των 2 mM Mg<sup>2+</sup>)

- *Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης*

Το πρωτόκολλο αποτελείται από τρία προγράμματα :

Πρόγραμμα 1:

- Προ-επώαση (ενεργοποίηση του ενζύμου) επί 10 λεπτά και αποδιάταξη του cDNA στους 95°C επί 10 λεπτά, για έναν κύκλο.

Πρόγραμμα 2: Η ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται σε τρία στάδια επί 45 κύκλους :

1. Αποδιάταξη στους 95°C επί 5 δευτερόλεπτα ανά κύκλο
2. Σύνδεση με τον εκκινητή (διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του εκκινητή και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται)
  - TfR1 : 53°C επί 15 δευτερόλεπτα
  - TfR2α : 56-52°C επί 15 δευτερόλεπτα

- TfR2β : 54 -50°C επί 15 δευτερόλεπτα

3. Επιδήκυνση στους 72°C επί 20 δευτερόλεπτα

Πρόγραμμα 3: Ψύξη στους 40°C επί 30 δευτερόλεπτα για ένα κύκλο.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται ως στρογγυλοποιημένες τιμές σε σχέση με το ενδογενώς εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς HPRT. Τα ποσά των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου HPRT καθορίζονται για κάθε δείγμα με εκτίμηση του μέσου όρου των τιμών των δύο αντιγράφων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν (γονίδιο-στόχος) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς HPRT.

**Πίνακας V.** Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και ανιχνευτών

Εκκινητής	Αλληλουχία
Vκ 1	5'-GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC -3'
Vκ 2	5 -GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC-3'
Vκ 3	5'-GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC -3'
Vκ 4	5 -GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC -3'
Vκ 5	5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC -3'
Vκ 6	5'-GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC -3'
VκI	5'-GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT-3'
VκII	5'-TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC-3'
VκIII	5'-GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG-3'
VκIV	5'-GGCGAGAGGGCCACCATCAAC-3'
Jκ 1	5'-ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3'
Jκ 2	5'-ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC -3'
Jκ 3	5'-ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC-3'
Jκ 4	5 -ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'
Jκ 5	5'-ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC-3'
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'
TfR1 15s	5'-CTCACTTTAGACAATgCTGC- 3'
TfR1 17as	5'-CTCATGACACGATCATTGAG-3'
TfR1- FL	5'-GCCTGAGTTTACAGTGGCTGTA-FL
TfR1- LC	5'-LC-Red 640- TCTGCTCGTGGAGACTTCTTCC--PH
TfR2α- fw	5'-TCCTCGCTTGAATGATTCAG 3'
TfR2α- rev	5'-CCCAGGGCCTAGCAAACC 3'
TfR2α-FL	5'-TCCGTGGAGAGATGTGTAGGGGTAATGAGA-FL
TfR2α-LC	5'-LC Red 640- ATTGATCAGCAATGAGAGGTGGACTCTGAG-PH
TfR2β- fw	5'-CTCTCCCCGCTTAGGCAAA 3'
TfR2β- rev	5'-CGGATCCGGGAATTGCAG 3'
TfR2β-FL	5'-CGCCAGAAGCTGGACCACGTGTG- FL
TfR2β-LC	5'-LC Red 640-ACCGACACGCACTACGTGGGGCT-PH

**Πίνακας VI.** Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

<b>Συνδυασμός δεικτών</b>	<b>Εμπορικά διαθέσιμοι κλώνοι</b>
CD5 FITC/CD19 PE	Immunotech BL1A/Immunotech 89B (B4)
CD20 FITC/ CD19 PE	Immunotech B9E9/Immunotech 89B(B4)
CD38 FITC/ CD19 PE	Immunotech T16/Immunotech 89B (B4)
CD23 FITC/ CD19 PE	Immunotech 9P25/Immunotech 89B(B4)
CD43 FITC/ CD19 PE	Immunotech DFT1/Immunotech 89B(B4)
CD11c FITC/ CD19 PE	DAKO KB90/Immunotech 89B(B4)
CD 9 FITC/ CD19 PE	DAKO P1/33/2/Immunotech 89B(B4)
FMC7 FITC/CD19 PE	Immunotech Fmc7/Immunotech 89B(B4)
CD 79b FITC/CD19 PE	DAKO SN8/Immunotech 89B(B4)
CD79a FITC/ CD19 PE	Serotec ZL7-4/Immunotech 89B(B4)
CD19 FITC/CD 10 PE	Coulter(B4)/DAKO SS2/36
CD 19 FITC/CD 69 PE	Coulter(B4)/Immunotech TP1/55.3
CD19 FITC/CD71 PE	Coulter(B4)/Caltag T56/14
CD19 FITC/CD27 PE	Coulter(B4)/Immunotech 1A4CD27
<b>Ανοσοσφαιρίνες (επιφάνειας)</b>	
Control FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
Kappa FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
Lambda FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgM FITC/ CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgD FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgG FITC/CD 19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgA FITC/ CD 19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
<b>Ανοσοσφαιρίνες (κυτταροπλασματικές)</b>	
Control FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
Kappa FITC/ CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
Lambda FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgM FITC/ CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgD FITC/CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgG FITC/ CD19PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)
IgA FITC/ CD19 PE	DAKO Rabbit F(ab') <sub>2</sub> /Immunotech 89B (B4)

\*FITC- fluorescein isothiocyanate, PE- phycoerythrin

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



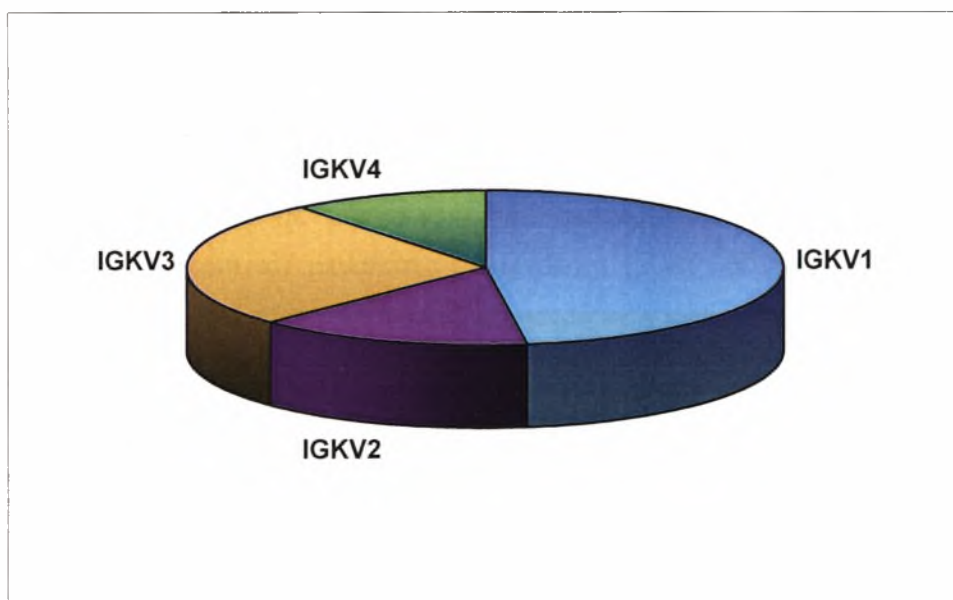
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. Ρεπερτόριο IGKV

Με την τεχνική RT-PCR ενισχύθηκαν 180 μετάγραφα εντός αναγνωστικού πλαισίου (in frame) σε 180 ασθενείς με κλωνοτυπική κ ελαφριά αλυσίδα. Αναγνωρίστηκαν γονίδια τεσσάρων υποομάδων IGKV (Πίνακας 1). Επικρατούσαν γονίδια της υποομάδας IGKV1 (86/180 περιπτώσεις, 47,7%) και ακολουθούσαν τα γονίδια της υποομάδας IGKV3 (48/180 περιπτώσεις, 26,7%). Οι υποομάδες IGKV2 (27/180 περιπτώσεις, 15%) και IGKV4 (19/180 περιπτώσεις, 10,56%) αντιπροσωπεύονταν σε μικρότερη συχνότητα (Εικόνα 1).

Πίνακας 1. Χρησιμοποίηση υποομάδων IGKV στο ρεπερτόριο της ΧΛΛ.

ΥΠΟΟΜΑΔΑ	ΣΥΝΟΛΟ (n)	ΣΥΝΟΛΟ (%)
IGKV1	86	47,78
IGKV2	27	15,00
IGKV3	48	26,67
IGKV4	19	10,56
ΣΥΝΟΛΟ	180	100,00



Εικόνα 1. Συχνότητα υποομάδων γονιδίων IGKV στο ρεπερτόριο της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

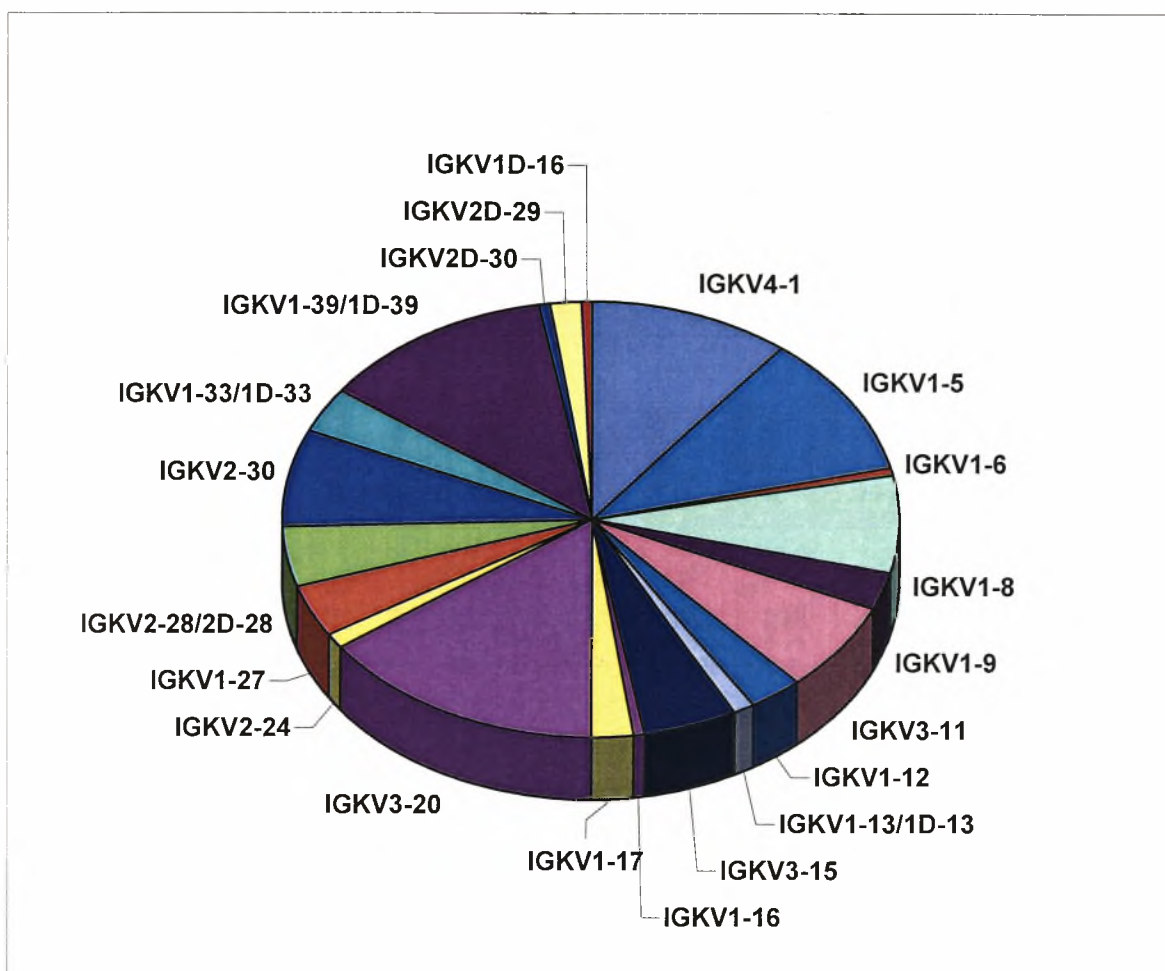
Η σύγκριση της συχνότητας των γονιδίων IGKV στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ σε σύγκριση με την αντίστοιχη συχνότητα σε παραγωγικές αναδιατάξεις του ρεπερτορίου φυσιολογικών IgM<sup>+</sup> Β λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, αλλά και με τον αριθμό των γονιδίων κάθε υποομάδας στο γονιδίωμα ανέδειξε σημαντικές διαφορές. Η υποομάδα IGKV4, η οποία χρησιμοποιείται στο φυσιολογικό παραγωγικό ρεπερτόριο με μεγαλύτερη συχνότητα από την αναμενόμενη με βάση τον αριθμό των γονιδίων της στο γονιδίωμα, βρέθηκε σε ακόμα μεγαλύτερη συχνότητα στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο στην κ-ΧΛΛ. Η υποομάδα IGKV3 βρέθηκε σε μικρότερη συχνότητα σε σχέση με το φυσιολογικό παραγωγικό ρεπερτόριο, αλλά όμως με μεγαλύτερη συχνότητα συγκριτικά με τον αριθμό των γονιδίων της οικογένειας στο γονιδίωμα. Τα γονίδια της υποομάδας IGKV2 βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται στην κ-ΧΛΛ με μικρότερη συχνότητα σε σχέση με το φυσιολογικό παραγωγικό ρεπερτόριο όπως και σχέση με τον αριθμό των γονιδίων της στο γονιδίωμα. Τέλος, η υποομάδα IGKV1 βρέθηκε σε συγκρίσιμα ποσοστά με την αναλογία της στο γονιδίωμα και σε λίγο μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με φυσιολογικό παραγωγικό ρεπερτόριο.

Στον Πίνακα II παρουσιάζονται τα 21 διαφορετικά γονίδια IGKV που αναγνωρίστηκαν στις αναδιατάξεις και η συχνότητά τους.

Πίνακας II. Χρησιμοποίηση γονιδίων IGKV στο ρεπερτόριο της ΧΛΛ.

ΓΟΝΙΔΙΟ IGKV	n	%
IGKV4-1 (B3) <sup>1</sup>	19	10,56
IGKV1-5 (L12, L12a) <sup>1</sup>	19	10,56
IGKV1-6 (L11) <sup>1</sup>	1	0,56
IGKV1-8 (L9) <sup>1</sup>	13	7,22
IGKV1-9 (L8) <sup>1</sup>	5	2,78
IGKV3-11 (L6, L6a) <sup>1</sup>	12	6,67
IGKV1-12 (L5) <sup>1</sup>	5	2,78
IGKV1-13/1D-13 (L4, L18) <sup>1</sup>	2	1,11
IGKV3-15 (L2) <sup>1</sup>	9	5,00
IGKV1-16 (L1) <sup>1</sup>	1	0,56
IGKV1-17 (A30) <sup>1</sup>	4	2,22
IGKV3-20 (A27, A27a) <sup>1</sup>	27	15,00
IGKV2-24 (A23) <sup>1</sup>	2	1,11
IGKV1-27 (A20) <sup>1</sup>	7	3,89
IGKV2-28/2D-28 (A19, A3) <sup>1</sup>	8	4,44
IGKV2-30 (A17) <sup>1</sup>	13	7,22
IGKV1-33/1D-33 (O18, O18a, O8) <sup>1</sup>	6	3,33
IGKV1-39/1D-39 (O12, O12a, O2) <sup>1</sup>	22	12,22
IGKV2D-30 (A1) <sup>1</sup>	1	0,56
IGKV2D-29 (A2a, A2c) <sup>1</sup>	3	1,67
IGKV1D-16 (L15, L15a) <sup>1</sup>	1	0,56
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>180</b>	<b>100,00</b>

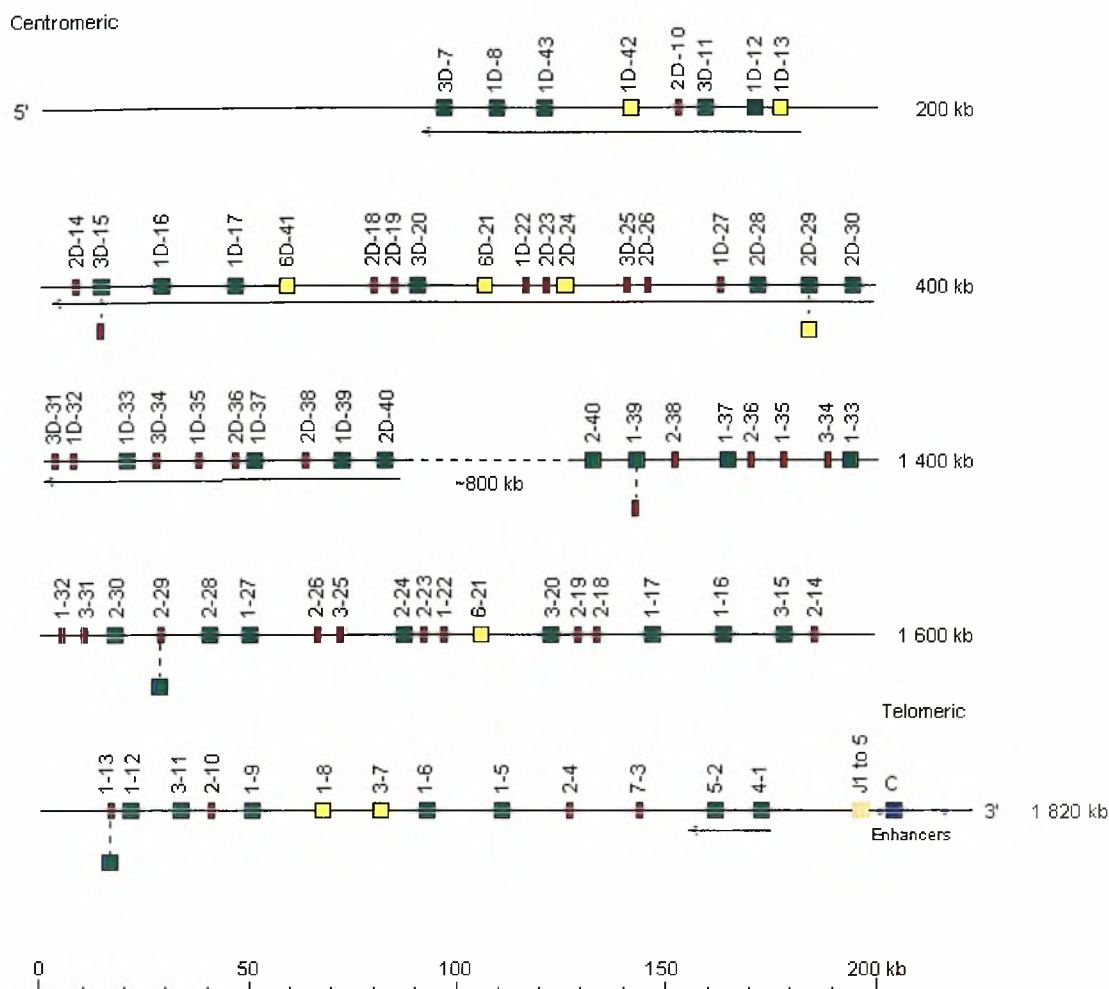
<sup>1</sup> Ονόματα γονιδίων σε παρενθέσεις: Ονοματολογία Zachau



Εικόνα 2. Συχνότητα γονιδίων IGKV στο ρεπερτόριο της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

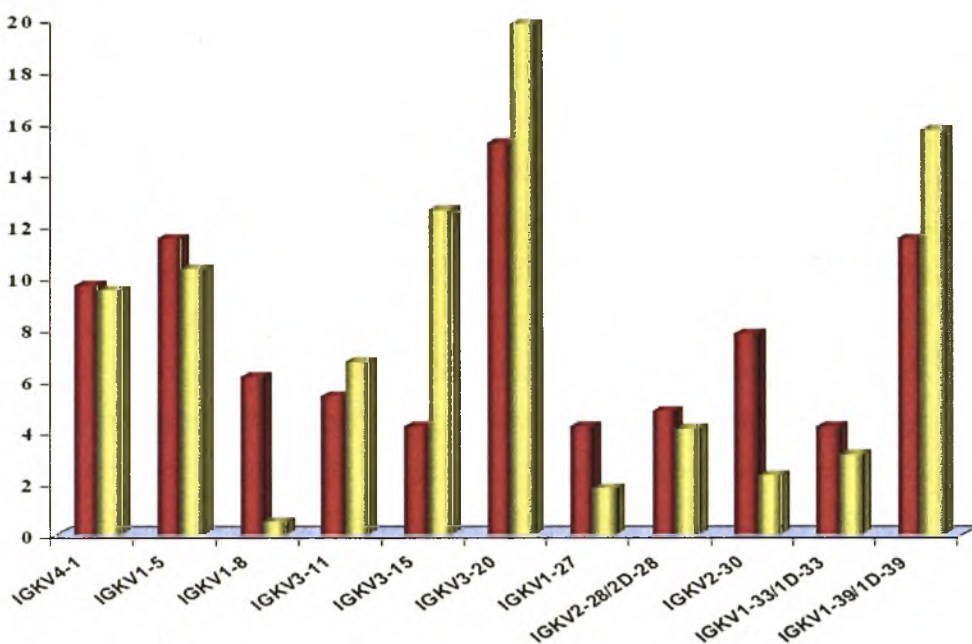
Συνολικά, στις εκφραζόμενες αναδιατάξεις ανιχνεύθηκαν 24 αλληλόμορφα. Το γονίδιο IGKV1-5 βρέθηκε σε τρία διαφορετικά αλληλόμορφα, με το αλληλόμορφο IGKV1-5\*03 σε συντριπτικά μεγαλύτερη συχνότητα (IGKV1-5\*01, IGKV1-5\*02 και IGKV1-5\*03 σε 3, 1 και 15 περιπτώσεις, αντιστοίχως), ενώ το γονίδιο IGKV2D-29 βρέθηκε σε δύο αλληλόμορφα (IGKV2D-29\*01 και IGKV2D-29\*02, από 2 περιπτώσεις το καθένα). Τα περισσότερα μετάγραφα χρησιμοποιούσαν IGKV γονίδια από το «εγγύς» σε σχέση με την περιοχή Jκ-Cκ άθροισμα γονιδίων (J-proximal cluster) (137/180 αναδιατάξεις), ενώ μόνο σε 5/180 αναδιατάξεις βρέθηκαν τρία γονίδια από το «άπω» σε σχέση με την περιοχή Jκ-Cκ άθροισμα γονιδίων (J-distal cluster), τα οποία ήταν τα IGKV2D-30, IGKV2D-29 και IGKV1D-16. Στις υπόλοιπες αναδιατάξεις (38/180) βρέθηκαν γονίδια που έχουν ίδια αλληλουχία τόσο στο «εγγύς» όσο και στο «άπω» σύμπλεγμα και δεν είναι δυνατό να διακριθούν στις

αναδιατάξεις. Τα γονίδια αυτά ήταν τα IGKV1-39 και IGKV1D-39 (22/180), IGKV1-33 και IGKV1D-33 (6/180), IGKV2-28 και IGKV2D-28 (8/180).

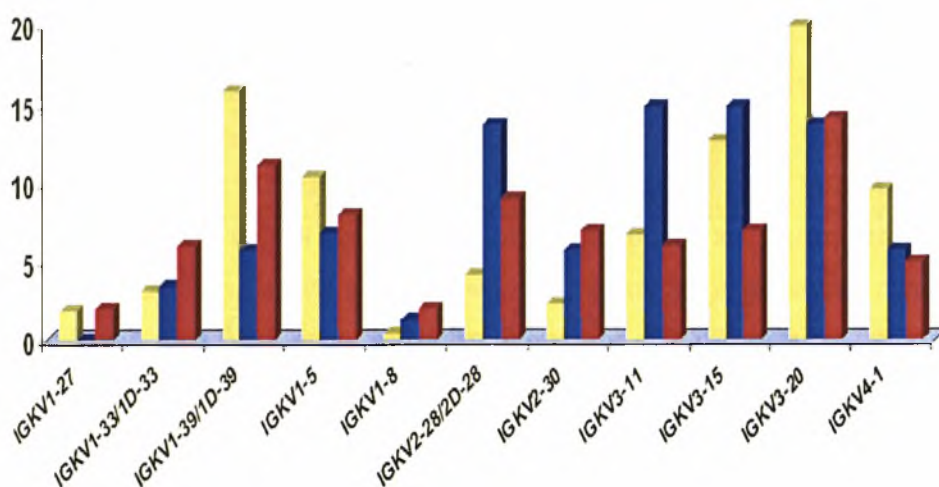


Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του γενετικού τόπου IGK.

Το πιο συχνό γονίδιο στο ρεπερτόριο της κ-Χ/Λ ήταν το IGKV3-20 (27 περιπτώσεις, 15%), και ακολούθησε το γονίδιο IGKV1-39/1D-39 (22 περιπτώσεις, 12,2%), τα γονίδια IGKV1-5 και IGKV4-1 (19 περιπτώσεις, 10,5%), IGKV2-30 και IGKV1-8 (13 περιπτώσεις, 7,2%). Η προτίμηση των συγκεκριμένων γονιδιακών τμημάτων στις εκφραζόμενες αναδιατάξεις δεν διαφέρει σημαντικά από τις συχνότητες των γονιδίων αυτών στις παραγωγικές αναδιατάξεις του φυσιολογικού ρεπερτορίου. Ωστόσο, ενώ για τα περισσότερα γονίδια οι συχνότητες ήταν συγκρίσιμες, κάποια γονίδια παρουσίασαν διαφορές (Εικόνες 4-5).



Εικόνα 4. Σύγκριση ρεπερτορίου γονιδίων IGKV στην κ-ΧΛΛ (κόκκινες στήλες/ παρούσα μελέτη) και σε φυσιολογικά Β-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (de Wildt, 168).



Εικόνα 5. Σύγκριση ρεπερτορίου γονιδίων IGKV σε τρεις μελέτες φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Κίτρινες στήλες, de Wildt et al. (168): μελέτη cDNA/ μπλε στήλες, Juul et al (169)Q: μελέτη cDNA/ κόκκινες στήλες, Foster et al. (170), μελέτη DNA.



## 2. Ανάλυση της περιοχής KCDR3

Το μήκος της περιοχής KCDR3 κυμαινόταν από 6 έως 11 αμινοξέα (διάμεση τιμή: 9). Σε 90/175 αναδιατάξεις (51,4%) βρέθηκαν N νουκλεοτίδια, που προστέθηκαν στις συμβολές από την TdT (τελική τρανσφεράση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων). Ο αριθμός των N νουκλεοτιδίων κυμαινόταν μεταξύ 1-12 (διάμεση τιμή: 3). Η δράση της TdT διέφερε σημαντικά σε αναδιατάξεις διαφορετικών γονιδίων IGKV (Εικόνα 6). Παρόμοια πρότυπα ενεργότητας της TdT παρατηρήθηκαν επίσης σε αλληλουχίες IGKV-J από φυσιολογικά ή αυτοαντιδραστικά κύτταρα (GenBank).

Σε 18/175 αναδιατάξεις (10,3%) βρέθηκαν από 1 έως 3 παλίνδρομα (P) νουκλεοτίδια. Σε αρκετές περιπτώσεις προέκυψαν ενδείξεις για δράση εξωνουκλεάσης στα άκρα των γονιδίων που ανασυνδυάστηκαν. Δράση 3' εξωνουκλεάσης στα άκρα των γονιδίων IGKV αφαίρεσε από ένα έως 16 νουκλεοτίδια (διάμεση τιμή: 3) σε 132/175 περιπτώσεις (75,4%). Στα άκρα των γονιδίων IGKJ ανιχνεύθηκε δράση 5' εξωνουκλεάσης σε 116/175 περιπτώσεις (66,3%), όπου αφαιρέθηκαν από 1 έως 8 νουκλεοτίδια (διάμεση τιμή: 2) από το εκάστοτε γονίδιο IGKJ. Στους πίνακες III-V και στις Εικόνες 6-8 παρουσιάζονται τα παραπάνω στοιχεία.

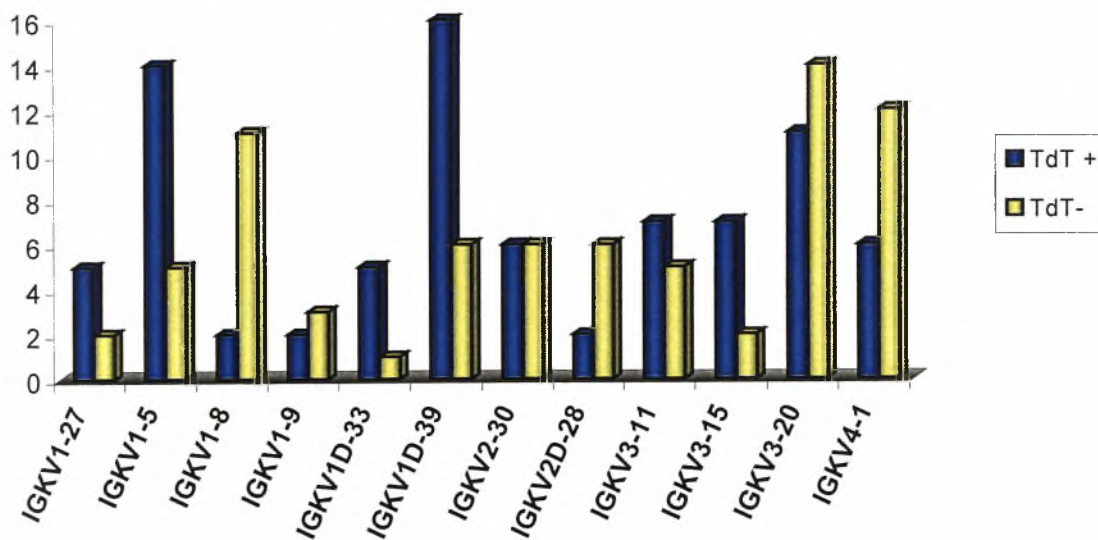
Στις αναδιατάξεις του εκφραζόμενου ρεπερτορίου παρατηρήθηκε προτίμηση των γονιδίων IGKJ1 και IGKJ2 [αλληλόμορφα: \*01 (κυρίως), \*02, \*04] τα οποία βρέθηκαν συνολικά στο 68,8% των περιπτώσεων (Πίνακας VI/ Εικόνα 9). Ακολούθησαν τα γονίδια IGKJ4 (17,6%) και IGKJ3 (11,9%) και τέλος με τη μικρότερη συχνότητα το γονίδιο IGKJ5 (1,7%).

Χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ3-5 παρατηρήθηκε σε 55/176 αναδιατάξεις (31,24%). Διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονιδίων IGKV ως προς τη συχνότητα αναδιάταξης με τα γονίδια IGKJ3-5. Συγκεκριμένα, τα γονίδια IGKV1-9 (L8) και IGKV3-11 βρέθηκαν αναδιαταγμένα με γονίδια IGKJ3-5 σε ποσοστό  $\geq 80\%$  των περιπτώσεων, σε αντίθεση προς τα γονίδια IGKV1-5 και IGKV3-15 (L2) (συχνότητα αναδιάταξης με γονίδια IGKJ3-5  $\leq 20\%$ ) (Πίνακας VII/ Εικόνα 10). Για τα περισσότερα γονίδια IGKV, παρόμοια πρότυπα αναδιάταξης με γονίδια IGKJ3-5 διαπιστώθηκαν επίσης σε αλληλουχίες IGKV-J από φυσιολογικά ή αυτοαντιδραστικά κύτταρα (GenBank). Ωστόσο, στην περίπτωση μερικών γονιδίων IGKV παρατηρήθηκαν «ειδικά για την ΧΛΛ» πρότυπα αναδιατάξεων με γονίδια IGKJ1-2 ή IGKJ3-5: συγκεκριμένα, τα γονίδια IGKV3-20 και IGKV3-15 σπανιότατα αναδιατάσσονταν με γονίδια IGKJ3-5 στη ΧΛΛ, ενώ το αντίθετο συνέβαινε με το γονίδιο IGKV3-11.



Πίνακας III. Δράση TdT σε αναδιατάξεις IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

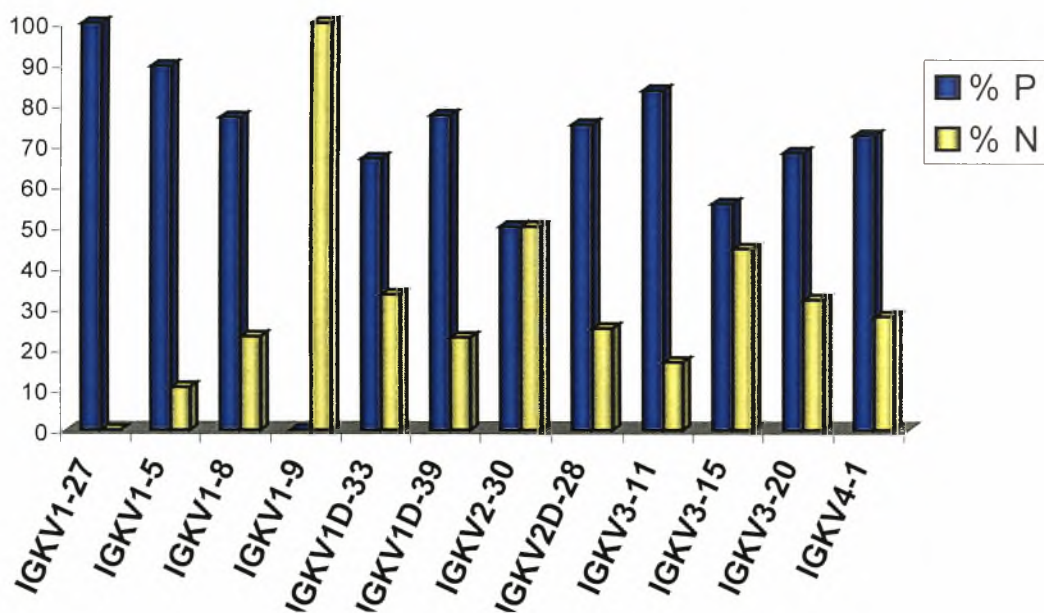
	TdT +	TdT-	TDT
IGKV1-27	5	2	5/7
IGKV1-5	14	5	14/19
IGKV1-8	2	11	2/13
IGKV1-9	2	3	2/5
IGKV1D-33	5	1	5/6
IGKV1D-39	16	6	16/22
IGKV2-30	6	6	6/12
IGKV2D-28	2	6	2/8
IGKV3-11	7	5	7/12
IGKV3-15	7	2	7/9
IGKV3-20	11	14	11/25
IGKV4-1	6	12	6/18



Εικόνα 6. Δράση TdT σε αναδιατάξεις IGKV-J ανά γονίδιο IGKV.

Πίνακας IV. Δράση IGKV εξωνουκλεάσης (VK exon) σε αναδιατάξεις IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

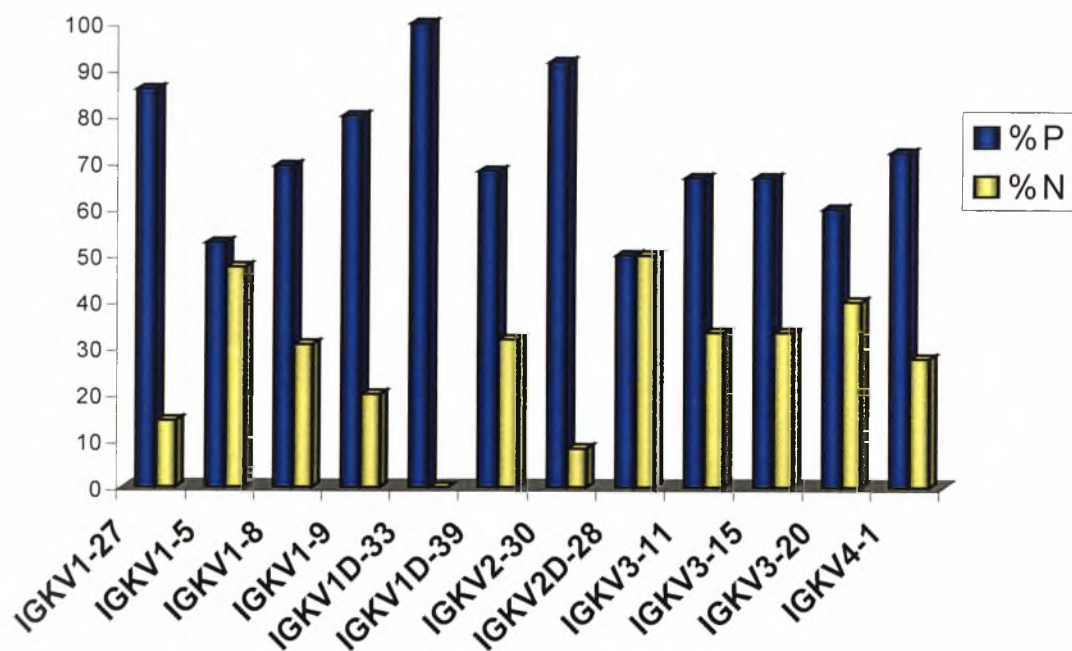
	VK exon +	VK exon -	% VK exon (+)	% VK exon (-)
IGKV1-27	7	0	100,00	0,00
IGKV1-5	17	2	89,47	10,53
IGKV1-8	10	3	76,92	23,08
IGKV1-9	0	5	0,00	100,00
IGKV1D-33	4	2	66,67	33,33
IGKV1D-39	17	5	77,27	22,73
IGKV2-30	6	6	50,00	50,00
IGKV2D-28	6	2	75,00	25,00
IGKV3-11	10	2	83,33	16,67
IGKV3-15	5	4	55,56	44,44
IGKV3-20	17	8	68,00	32,00
IGKV4-1	13	5	72,22	27,78



Εικόνα 7. Δράση IGKV εξωνουκλεάσης σε αναδιατάξεις IGKV-J ανά γονίδιο IGKV. P: (+)/ N: (-)

Πίνακας V. Δράση IGKJ εξωνουκλεάσης (JK exon) σε αναδιατάξεις IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

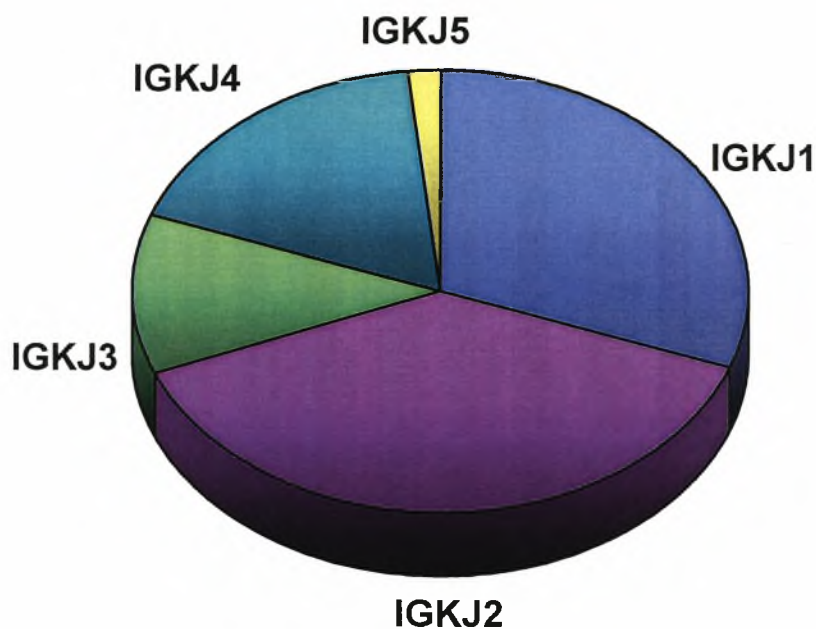
	JK exon+	Jkexon -	% JK exon (+)	% JK exon (-)
IGKV1-27	6	1	85,71	14,29
IGKV1-5	10	9	52,63	47,37
IGKV1-8	9	4	69,23	30,77
IGKV1-9	4	1	80,00	20,00
IGKV1D-33	6	0	100,00	0,00
IGKV1D-39	15	7	68,18	31,82
IGKV2-30	11	1	91,67	8,33
IGKV2D-28	4	4	50,00	50,00
IGKV3-11	8	4	66,67	33,33
IGKV3-15	6	3	66,67	33,33
IGKV3-20	15	10	60,00	40,00
IGKV4-1	13	5	72,22	27,78



Εικόνα 8. Δράση IGKJ εξωνουκλεάσης σε αναδιατάξεις IGKV-J ανά γονίδιο IGKV. P: (+)/ N: (-)

Πίνακας VI. Χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ στη ΧΑΛ

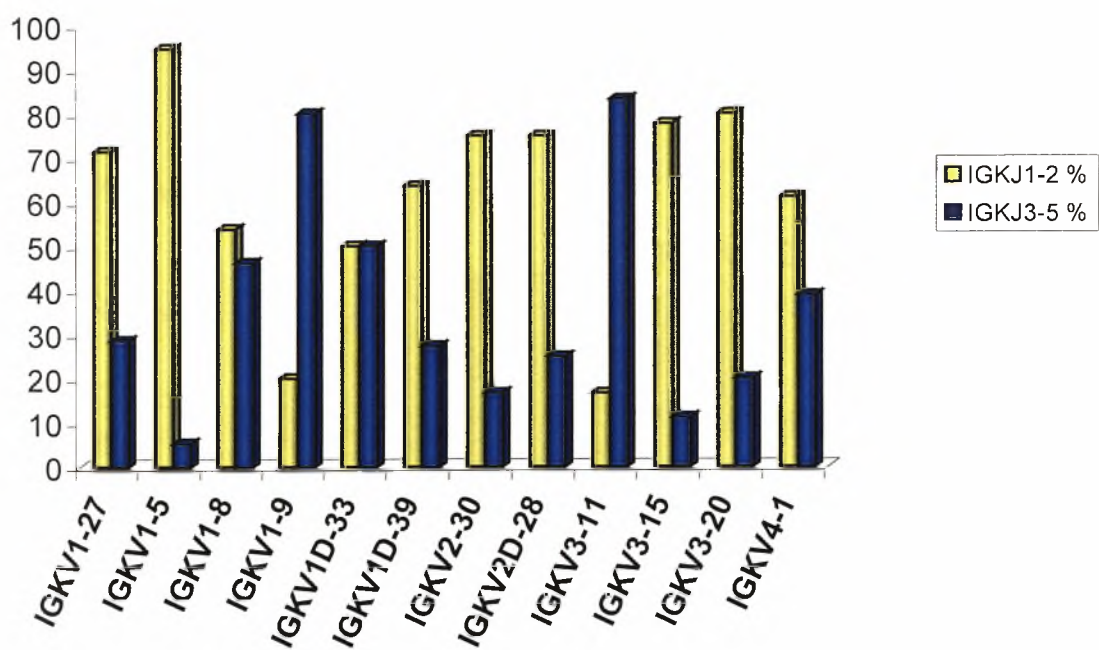
ΓΟΝΙΔΙΟ IGKJ	n	%
IGKJ1	54	30,68
IGKJ2	67	38,07
IGKJ3	21	11,93
IGKJ4	31	17,61
IGKJ5	3	1,70
ΣΥΝΟΛΟ	176	100,00



Εικόνα 9. Ρεπερτόριο γονιδίων IGKJ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Πίνακας VII. Χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ1-2 ή IGKJ3-5 ανά γονίδιο IGKV.

	IGKJ1-2	IGKJ3-5	IGKJ1-2 %	IGKJ3-5 %
IGKV1-27	5	2	71	29
IGKV1-5	18	1	95	5
IGKV1-8	7	6	54	46
IGKV1-9	1	4	20	80
IGKV1D-33	3	3	50	50
IGKV1D-39	14	6	64	27
IGKV2-30	9	2	75	17
IGKV2D-28	6	2	75	25
IGKV3-11*01	2	10	17	83
IGKV3-15*01	7	1	78	11
IGKV3-20*01	20	5	80	20
IGKV4-1*01	11	7	61	39



Εικόνα 10. Χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ1-2 ή IGKJ3-5 ανά γονίδιο IGKV.

### 3. Ανάλυση κατανομής σωματικών μεταλλάξεων - Επιλογή από αντιγόνο

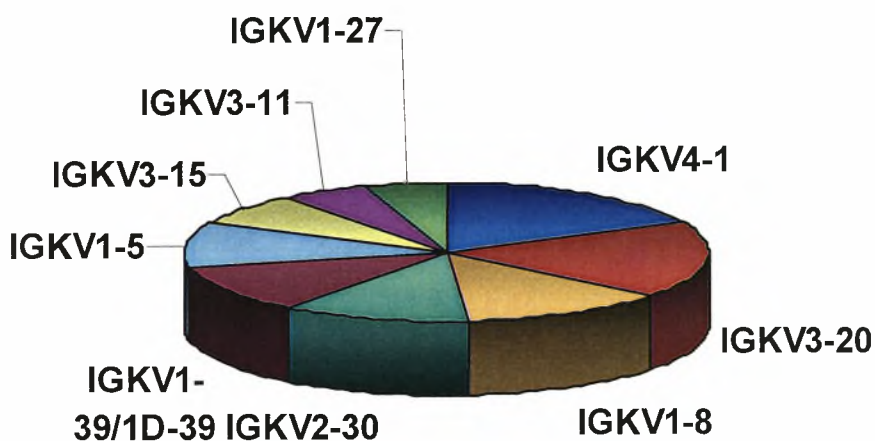
Ενεήντα από τις 180 αναδιατάξεις IGKV-J (50%) ήταν αμετάλλακτες (είχαν ποσοστό ομολογίας  $\geq 98\%$  με την αντίστοιχη αλληλουχία του μη αναδιαταγμένου γονιδίου). Από αυτές, οι 60 αλληλουχίες IGKV-J είχαν ομολογία 100%. Στην ομάδα των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων, 27/90 αλληλουχίες IGKV είχαν ομολογία μικρότερη από 95%. Τα πιο συχνά γονίδια IGKV στις ομάδες των αμετάλλακτων και μεταλλαγμένων αλληλουχιών φαίνονται στον Πίνακα VIII και στην Εικόνα 11.

Πίνακας VIII. Συχνότερα γονίδια IGKV στην μεταλλαγμένη και την αμετάλλακτη ομάδα.

%	Μεταλλαγμένη ομάδα	Σειρά	Αμετάλλακτη ομάδα	%
15,56	IGKV4-1	1	IGKV3-20	14,44
15,56	IGKV3-20	2	IGKV1-39/1D-39	14,44
11,11	IGKV1-8	3	IGKV1-5	12,22
10,00	IGKV2-30	4	IGKV3-11	8,89
10,00	IGKV1-39/1D-39	5	IGKV2-28/2D-28	6,67
8,89	IGKV1-5	6	IGKV4-1	5,56
6,67	IGKV3-15	7	IGKV1-33/1D-33	5,56
4,44	IGKV3-11	8	IGKV1-17	4,44
4,44	IGKV1-27	9	IGKV2-30	4,44

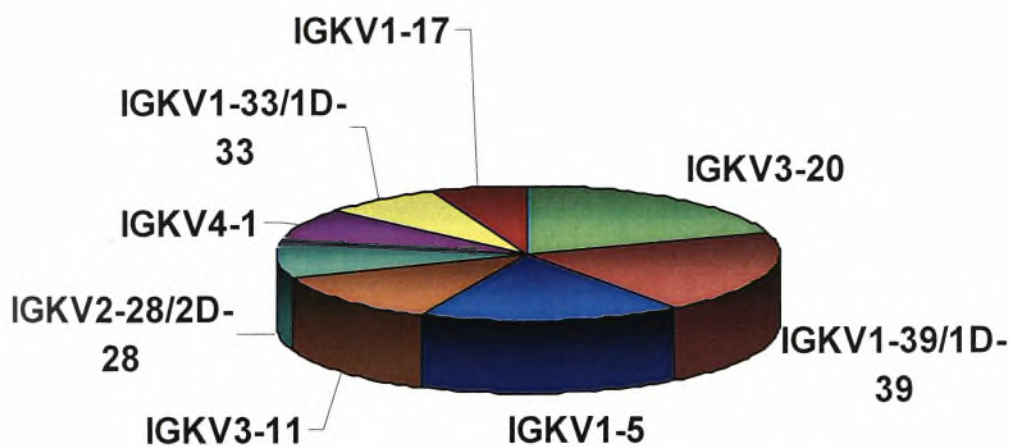


### Μεταλλαγμένη ομάδα



Εικόνα 11. Συχνότερα γονίδια IGKV σε μεταλλαγμένες αναδιατάξεις IGKV-J.

### Αμετάλλακτη ομάδα

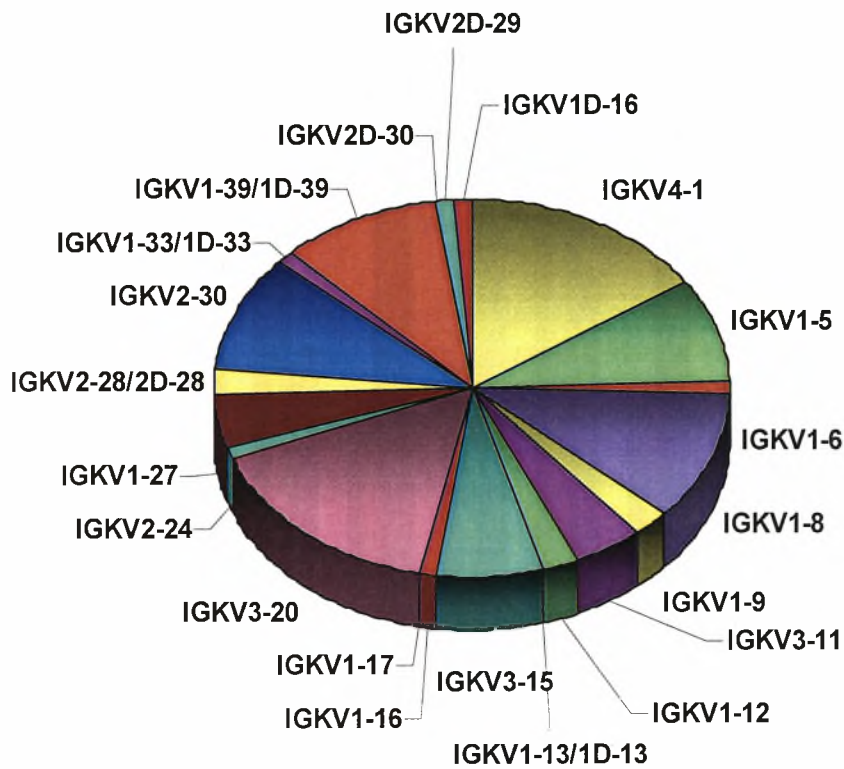


Εικόνα 12. Συχνότερα γονίδια IGKV σε αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV-J.

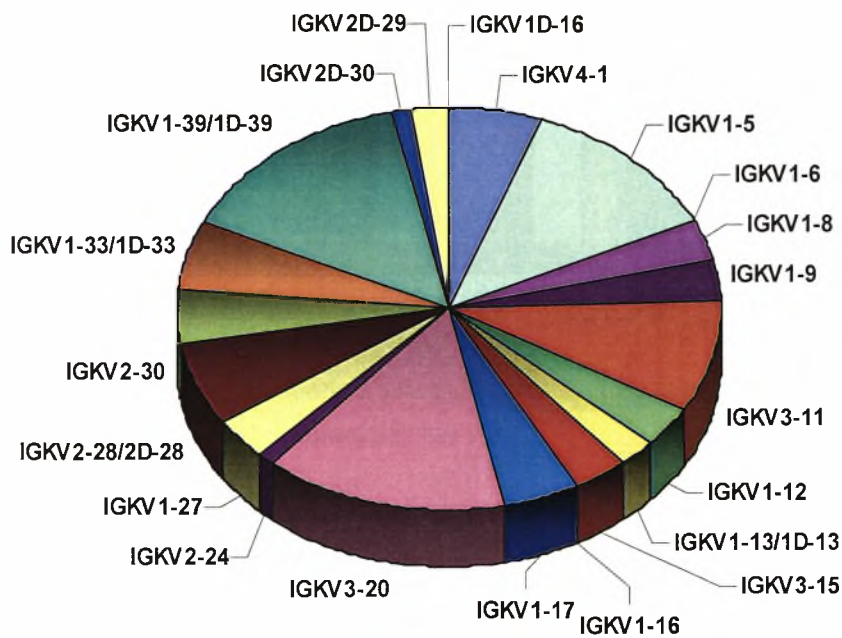
Η κατανομή των γονιδίων IGKV σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αναδιατάξεις εμφανίζει σημαντικές διαφορές (Πίνακας ΙΧ / Εικόνες 13-15).

Πίνακας ΙΧ. Χρησιμοποίηση γονιδίων IGKV σε αμετάλλακτες και μεταλλαγμένες αναδιατάξεις.

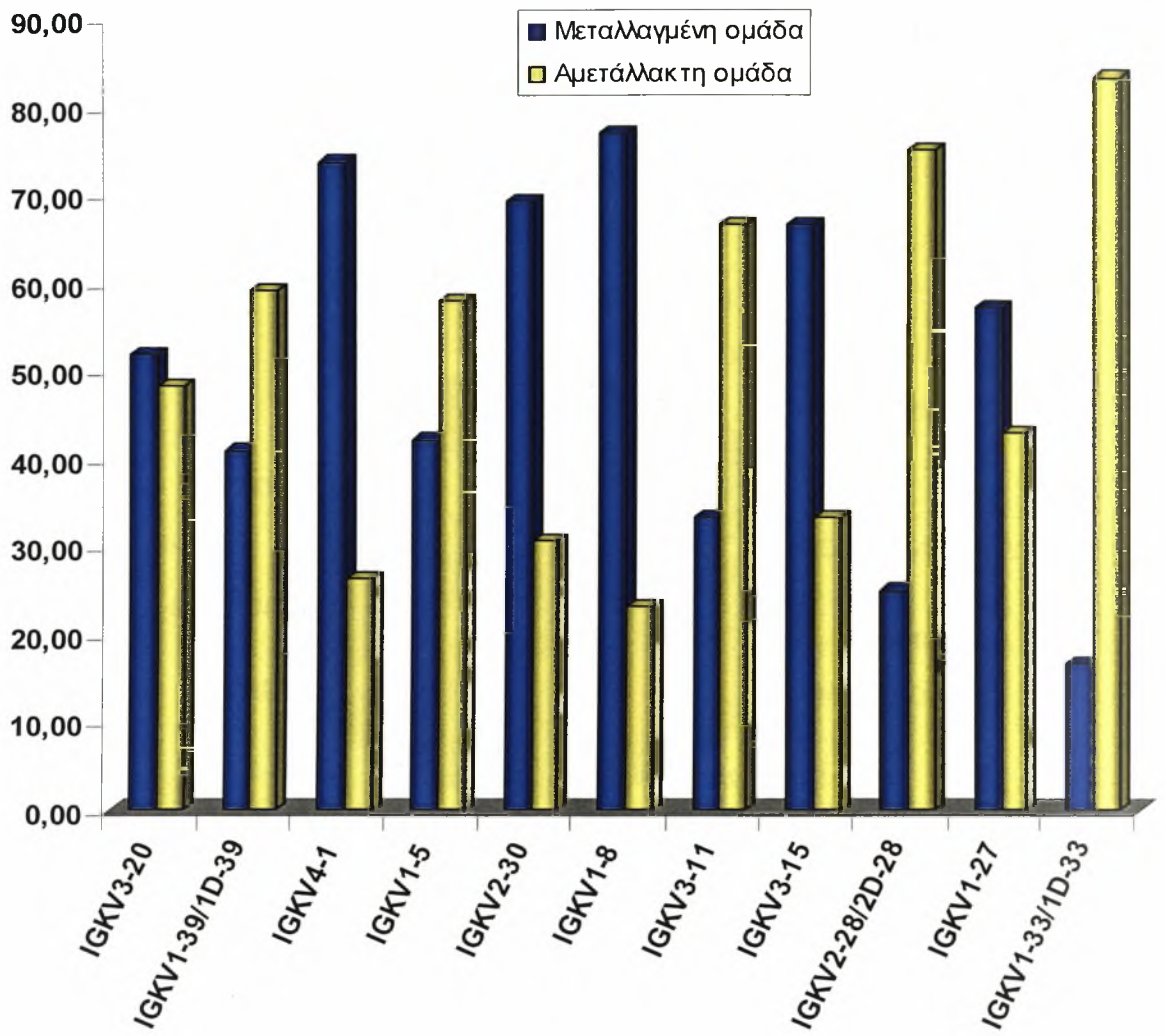
<b>Γονίδιο IGKV</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>&lt;98</b>	<b>&gt;98</b>	<b>&lt;98 %</b>	<b>&gt;98 %</b>
IGKV3-20	27	14	13	51,85	48,15
IGKV1-39/1D-39	22	9	13	40,91	59,09
IGKV4-1	19	14	5	73,68	26,32
IGKV1-5	19	8	11	42,11	57,89
IGKV2-30	13	9	4	69,23	30,77
IGKV1-8	13	10	3	76,92	23,08
IGKV3-11	12	4	8	33,33	66,67
IGKV3-15	9	6	3	66,67	33,33
IGKV2-28/2D-28	8	2	6	25,00	75,00
IGKV1-27	7	4	3	57,14	42,86
IGKV1-33/1D-33	6	1	5	16,67	83,33
IGKV1-9	5	2	3	40,00	60,00
IGKV1-12	5	2	3	40,00	60,00
IGKV1-17	4	0	4	0,00	100,00
IGKV2D-29	3	1	2	33,33	66,67
IGKV1-13/1D-13	2	0	2	0,00	100,00
IGKV2-24	2	1	1	50,00	50,00
IGKV1-6	1	1	0	100,00	0,00
IGKV1-16	1	1	0	100,00	0,00
IGKV2D-30	1	0	1	0,00	100,00
IGKV1D-16	1	1	0	100,00	0,00
	180	90	90	50,00	50,00



Εικόνα 13. Κατανομή γονιδίων IGKV: μεταλλαγμένες αναδιατάξεις IGKV-J.



Εικόνα 14. Κατανομή γονιδίων IGKV: αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV-J.



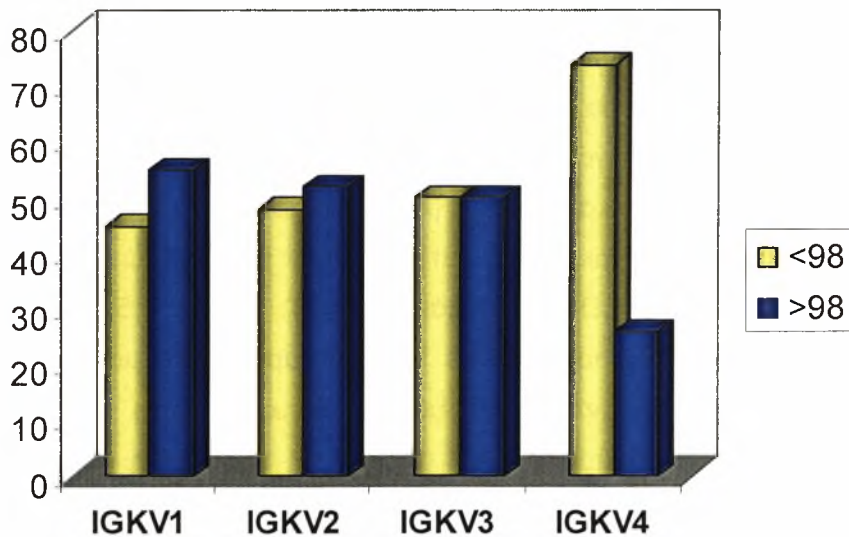
Εικόνα 15. Κατανομή γονιδίων IGKV σε μεταλλαγμένες ή αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV-J.

Σε περιπτώσεις ορισμένων γονιδίων IGKV (IGKV1-33/1D-33, IGKV2-30), η σύγκριση με τις φυσιολογικές και τις αυτοαντιδραστικές αλληλουχίες αποκάλυψε ότι το πρότυπο μεταλλάξεων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν ειδικό για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Η κατανομή των μεταλλάξεων σε κάθε υποομάδα γονιδίων φαίνεται στον Πίνακα Χ και στις Εικόνες 16-17.

Πίνακας Χ. Κατανομή υποομάδων γονιδίων IGKV σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αναδιατάξεις.

Ομολογία	IGKV1	IGKV2	IGKV3	IGKV4
<98	45%	48%	50%	74%
>98	55%	52%	50%	26%
ΣΥΝΟΛΟ	100%	100%	100%	100%



Εικόνα 16. Χρησιμοποίηση υποομάδων γονιδίων IGKV σε μεταλλαγμένες (ομολογία <98%) ή αμετάλλακτες (ομολογία  $\geq$  98%) αναδιατάξεις IGKV-J.

Οι αλληλουχίες των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων εξετάστηκαν για την πιθανότητα επιλογής από κλασικό T-εξαρτώμενο αντιγόνο. Ο υπολογισμός της πιθανότητας μια αναδιάταξη να έχει επιλεγεί από αντιγόνο έγινε μετά από ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων στις περιοχές CDRs και FRs –με βάση την οριοθέτηση τους από το IMGT- σύμφωνα με το πολυπαραμετρικό μοντέλο που προτάθηκε από τους Lossos et al. Ενδείξεις για θετική επιλογή από αντιγόνο υπάρχει όταν ο λόγος των μεταλλάξεων αντικατάστασης προς τις «σιωπηρές» μεταλλάξεις (R:S) είναι μεγαλύτερος στις περιοχές CDRs και μικρότερος στις περιοχές FRs από το θεωρητικά αναμενόμενο με βάση το συντελεστή Rf (replacement factor) του κάθε γονιδίου. Σε κάθε αναδιάταξη, θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επιλογή από αντιγόνο μόνο όταν οι στατιστικές πιθανότητες (P-values),  $P_{FRs}$  και  $P_{CDRs}$  για τις περιοχές CDRs και FRs αντίστοιχα ήταν μικρότερες του 0,05.

Δεδομένα για το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV και τις μεταλλάξεις τους σε αναδιατάξεις IGHV-D-J υπήρχαν σε 175/180 περιπτώσεις της παρούσας μελέτης. Παράλληλη ανάλυση του προτύπου μεταλλάξεων σε αναδιατάξεις IGH και IGK ήταν δυνατή σε 175/179 περιπτώσεις κ-CLL. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μεταλλαγμένες αναδιατάξεις IGHV συνδυάστηκαν με μεταλλαγμένες αναδιατάξεις IGKV και αντιστρόφως (Πίνακας XI). Σε ποσοστό περίπου 4% των περιπτώσεων ΧΛΛ, τα αμετάλλακτα γονίδια IGH συνδυάστηκαν με μεταλλαγμένα γονίδια IGK, τα οποία όμως είχαν μικρό φορτίο μεταλλάξεων (ομολογία 97.0-97.8%).

Σε όλες τις περιπτώσεις, η μεγάλη πλειονότητα των μεταλλάξεων στις περιοχές CDR-IMGT ήταν μεταλλάξεις αντικατάστασης (R), αντίθετα από τις περιοχές FR-IMGT, όπου παρατηρήθηκε πιο ομοιομορφή κατανομή των μεταλλάξεων R και S (μέσος όρος των λόγων R/S στα CDR-IMGT και FR-IMGT: 2.6 και 1.5, αντιστοίχως). Η ανάλυση των μεταλλάξεων σύμφωνα με το πολυπαραμετρικό μοντέλο κατανομής αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές ενδείξεις για θετική επιλογή από αντιγόνο σε 25/90 μεταλλαγμένες αναδιατάξεις IGKV (27.8%). Η παράλληλη ανάλυση IGH και IGK σύμφωνα με το πολυπαραμετρικό μοντέλο αποκάλυψε ότι σε ποσοστό 58.8% των περιπτώσεων κ-ΧΛΛ που έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV+IGKV δεν υπήρχαν ενδείξεις για θετική επιλογή από T-εξαρτώμενο αντιγόνο ούτε από την βαριά ούτε από την ελαφριά αλυσίδα.



Πίνακας XI. Παράλληλη ανάλυση του προτύπου μεταλλάξεων των IGH και IGK.

<b>κ-ΧΛΛ</b>	
Είδη αναδιατάξεων	%
IGKV-M + IGHV-M	46.9
IGKV-M + IGHV-A	3.4
IGKV-A + IGHV-A	37.7
IGKV-A + IGHV-M	12.0
IGKV-E + IGHV-E	6.3
IGKV-E + IGHV-AN	20.0
IGKV-AN + IGHV-E	15.0
IGKV-AN + IGHV-AN	58.7

M: μεταλλαγμένη αναδιάταξη/ A: αμετάλλακτη αναδιάταξη/ E: επιλεγμένη αλληλουχία/ AN: ανεπίλεκτη αλληλουχία. Κριτήριο για επιλογή από κλασικό T-εξαρτώμενο αντιγόνο: αποτέλεσμα ανάλυσης σύμφωνα με το πολυπαραμετρικό μοντέλο των Lossos et al.

#### 4. Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα τρανσφερίνης -1, -2 (TfR-1, -2) στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

##### *Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση*

Η ανάλυση των επιφανειακών δεικτών που σχετίζονται με ενεργοποίηση/ διαφοροποίηση του κακοήθους κλώνου πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής σε δείγματα περιφερικού αίματος 118 ασθενών με Β-ΧΛΛ.

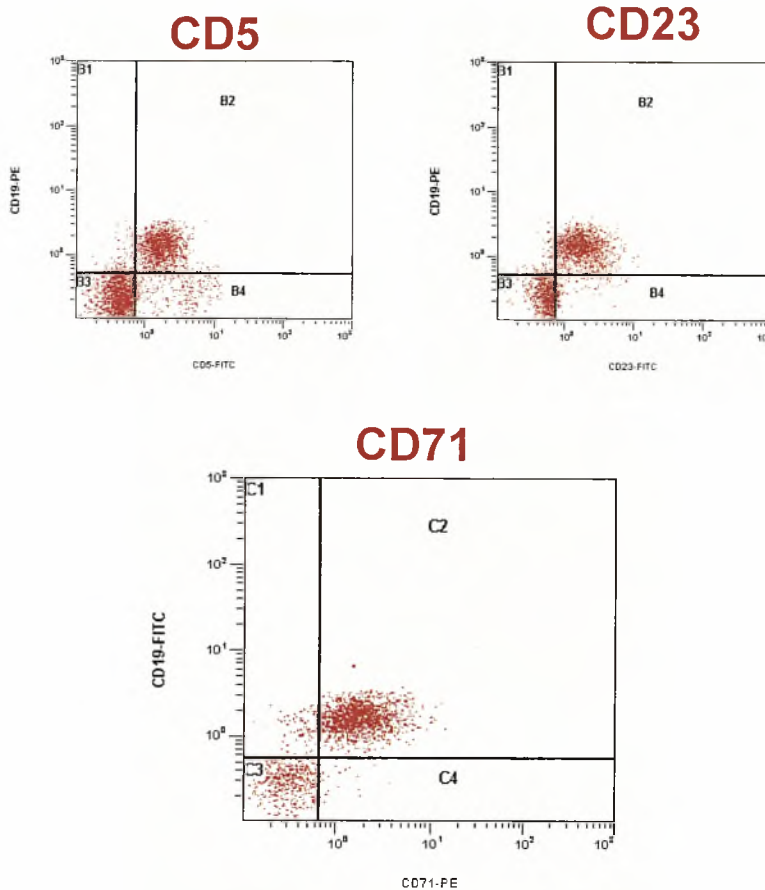
Ενενήντα από τις 109 περιπτώσεις που αναλύθηκαν εξέφραζαν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη Μ (sIgM<sup>+</sup>) ενώ 19 εξέφραζαν ανοσοσφαιρίνη G (sIgG<sup>+</sup>). Ενενήντα πέντε από τις 109 περιπτώσεις που αναλύθηκαν (87.2%) εξέφραζαν την πρωτεΐνη CD71/TfR-1 (Εικόνα 17), ενώ οι υπόλοιπες (14/109, 12.8%) ήταν αρνητικές για CD71 (Πίνακας XII). Το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που εξέφραζαν τον δείκτη CD71 ήταν γενικά υψηλό (μέση τιμή 91%, εύρος: 23.3-100.0%). Με κριτήριο την ένταση του φθορισμού, 87/95 CD71 (+) περιπτώσεις (91.5%) είχαν έντονη έκφραση του CD71 (bright), ενώ οι υπόλοιπες (8/95, 8.4%) είχαν ασθενή έκφραση (dim).

Έκφραση του αντιγόνου πρώιμης ενεργοποίησης CD69 ανιχνεύθηκε σε 68/109 δείγματα που αναλύθηκαν (62.3%), ενώ 41/109 δείγματα (37.6%) ήταν αρνητικά για τον δείκτη CD69 (Πίνακας XII). Τα ποσοστά των νεοπλαστικών κυττάρων που εξέφραζαν CD69 κυμαινόταν από 20.3-94.2% (μέση τιμή 43.4). Η ένταση φθορισμού ήταν υψηλή (bright) σε 62/68 CD69 (+) δείγματα (91.2%) και ασθενής (dim) σε 6/68 CD69 (+) περιπτώσεις (8.8%).

Η έκφραση του CD38 μελετήθηκε σε 110 περιπτώσεις: με ουδό θετικότητας το 20%, 29/110 δείγματα που ελέγχθηκαν ήταν CD38 (+), ενώ τα υπόλοιπα (81/110; 73.6%) ήταν CD38 (-) (Πίνακας XII). Εβδομήντα περιπτώσεις της παρούσας μελέτης εξετάστηκαν επίσης για έκφραση του CD27. Το CD27 ανιχνεύθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ομοιόμορφα και με υψηλή ένταση φθορισμού.

Πίνακας XII. Έκφραση των δεικτών CD38, CD71 και CD69 σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες περιπτώσεις ΧΛΛ.

	CD38 (+)	CD69 (+)	CD71 (+)
<b>Μεταλλαγμένα IGHV</b>	10/64 (15.6%)	34/64 (53.1%)	56/64 (87.5%)
<b>Αμετάλλακτα IGHV</b>	19/46 (41.3%)	34/45 (75.5%)	39/45 (86.6%)



Εικόνα 17. Ανάλυση της έκφρασης του CD71 με κυτταρομετρία ροής. Κλασική CD5+CD23+ ΧΛΛ.

Έκφραση των μορίων CD 71/CD69/CD38 και φορτίο μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV  
 Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη ταξινομήθηκαν ως αμετάλλακτες εάν η αλληλουχία IGHV είχε ομολογία μεγαλύτερη από 98% με την αντίστοιχη αλληλουχία του μη αναδιαταγμένου γονιδίου ή μεταλλαγμένη εάν η αλληλουχία IGHV είχε ομολογία μικρότερη από 98%. Με βάση αυτόν τον ορισμό, 71/118 ασθενείς της παρούσας ομάδας (60.2%) έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, ενώ 47/118 (39.8%) ασθενείς έφεραν αμετάλλακτα IGHV γονίδια.

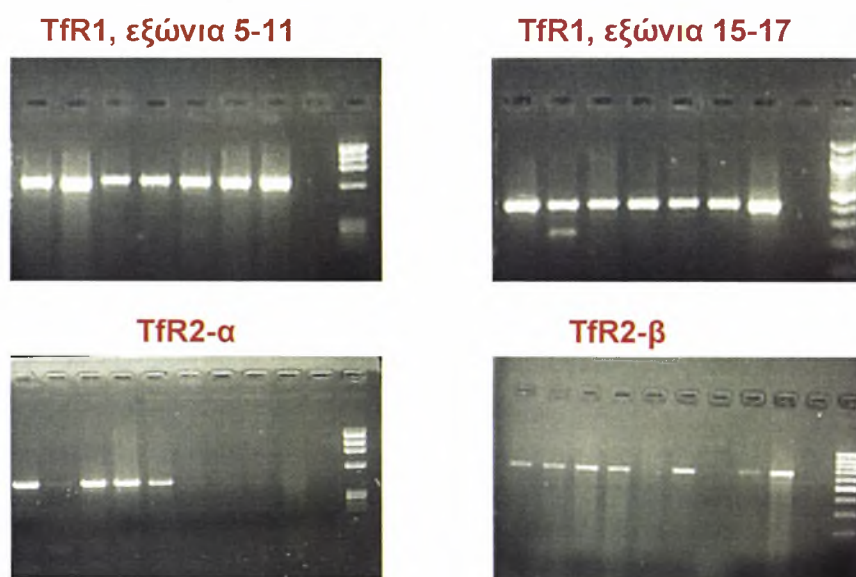
Η στατιστική ανάλυση δεν τεκμηρίωσε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD71 και του φορτίου των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Το CD71 εκφραζόταν ομοιόμορφα τόσο στην μεταλλαγμένη όσο και στην αμετάλλακτη υποομάδα (Πίνακας XII) και σε παρομοίως υψηλά ποσοστά των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις με το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV ανιχνεύθηκαν στην περίπτωση του CD38 και του CD69 σε επίπεδο

σημαντικότητας  $\alpha=0,05$ . Ειδικότερα, 10/64 (15,6%) μεταλλαγμένες περιπτώσεις βρέθηκαν θετικές για CD38, σε αντίθεση προς 19/46 (41,3%) αμετάλλακτες περιπτώσεις ( $p<0,01$ ). Επιπλέον, 34/64 (53,1%) μεταλλαγμένες περιπτώσεις ήταν θετικές για το CD69 σε αντίθεση προς 34/45 (75,6%) αμετάλλακτες περιπτώσεις ( $p=0,03$ ). (Πίνακας XII).

#### Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του mRNA TfR-1, -2

Αλληλουχίες cDNA του TfR που αντιστοιχούν σε μετάγραφα TfR1 και στις άλφα και βήτα μορφές των μεταγράφων mRNA του TfR2 ενισχύθηκαν με εκκινητές ειδικούς για τα εξόνια 15-17 (TfR1), 3-5 (TfR2- $\alpha$ ) και 4-5 (TfR2- $\beta$ ) του αντίστοιχου γονιδίου.

Οι αλληλουχίες mRNA του TfR1 ενισχύθηκαν σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν (115/115) (Πίνακας XIII/ Εικόνα 18). Αντίθετα, mRNA του TfR2- $\alpha$  ανιχνεύτηκε σε 50/102 (49%) περιπτώσεις (Εικόνα 18): στην ομάδα των TfR2- $\alpha$  mRNA (-) περιπτώσεων, 33/50 περιπτώσεις (66%) ήταν IGHV μεταλλαγμένες ενώ 17/50 (34%) ήταν IGHV αμετάλλακτες (Πίνακας XIII). Αλληλουχίες cDNA του TfR2- $\beta$  ενισχύθηκαν σε 100/109 περιπτώσεις (91,7%, Εικόνα 18), από τις οποίες 63/100 έφεραν μεταλλάγματα γονίδια IGHV και 37/100 ήταν αμετάλλακτες (Πίνακας XIII).



Εικόνα 18. Ποιοτική ανάλυση mRNA μεταγράφων του TfR1 και TfR2 (άλφα και βήτα).

Πίνακας XIII. Έκφραση των mRNA του TfR1 και του TfR2 σε σχέση με το φορτίο των μεταλλάξεων IGHV και την έκφραση των μορίων CD38/CD69/CD71.

TfR mRNA	Μεταλλαγμένα IGHV	CD38 (+)	CD69 (+)	CD71 (+)
TfR1 (+)	70/115	28/108	66/107	93/107
TfR2α (+)	29/52	16/51	31/50	44/49
TfR2α (-)	33/50	10/46	27/47	41/48
TfR2β (+)	63/100	26/95	55/92	82/92
TfR2β (-)	5/9	2/8	5/9	7/9

Τα επίπεδα mRNA του TfR1 προσδιορίσθηκαν σε 111/118 περιπτώσεις με οπτική ανάλυση προϊόντων συναγωνιστικής RT-PCR (competitive RT-PCR) που αντιστοιχούν στα εξόνια 15-17 του TfR1. Κάθε δείγμα ελέχθηκε τουλάχιστον σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες (Α-Γ, το καθένα αντιπροσωπεύει διαφορά ενός λογαρίθμου στη συγκέντρωση: ομάδα Α (υψηλή έκφραση), 27 περιπτώσεις/ ομάδα Β (ενδιάμεση έκφραση): 57 περιπτώσεις/ ομάδα Γ (χαμηλή έκφραση): 27 περιπτώσεις.

Η έκφραση του mRNA του TfR2, τα δεδομένα των IGHV μεταλλάξεων και η έκφραση των CD38/CD69/CD71 για κάθε ομάδα mRNA του TfR1 φαίνονται στους Πίνακες XIV και XV. Στην ομάδα Α (υψηλή έκφραση του TfR1 mRNA), 17/27 περιπτώσεις έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (63%). Σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων της ομάδας Α (14/25) ήταν αρνητικές για το mRNA του TfR2-α, ενώ όλες εκτός από μια ήταν θετικές για το mRNA του TfR2-β (Πίνακας XV).

Η ομάδα Β περιλάμβανε 36/57 περιπτώσεις με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (63%, ίδιο ποσοστό με αυτό της ομάδας Α): όπως και στην ομάδα Α, περίπου οι μισές περιπτώσεις της ομάδας Β ήταν αρνητικές για το mRNA του TfR2-α, ενώ όλες οι περιπτώσεις εκτός από δύο εξέφραζαν mRNA TfR2-βήτα (Πίνακας XV).

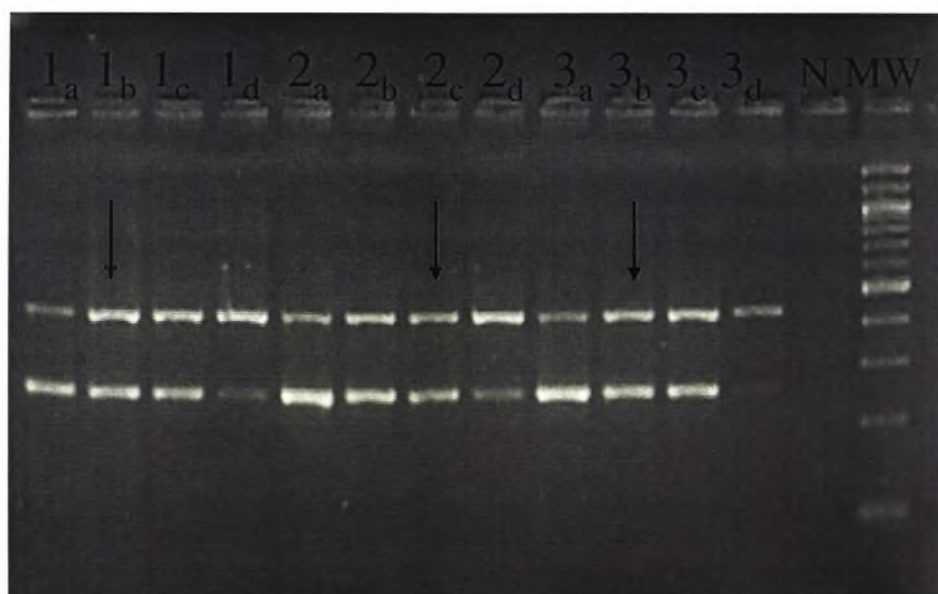
Σε σύγκριση με τις ομάδες Α και Β, η ομάδα Γ (χαμηλή έκφραση του TfR1 mRNA) περιλάμβανε λιγότερες μεταλλαγμένες περιπτώσεις IGHV (13/27; 48%) (Πίνακας XIV). Οι μισοί από τους ασθενείς της ομάδας Γ ήταν TfR2-α mRNA (-), ενώ στη μεγάλη πλειονότητα εξέφραζαν mRNA του TfR2-β (Πίνακας XV).

Πίνακας XIV. Φορτίο μεταλλάξεων IGHV και έκφραση των CD38/CD69/CD71 στις υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ με διαφορετικά επίπεδα mRNA του TfR1.

Επίπεδα mRNA TfR1	Μεταλλαγμένα IGHV	CD38 (+)	CD69 (+)	CD71 (+)
<b>A</b>	17/27	6/25	17/25	20/25
<b>B</b>	36/57	16/56	30/53	50/53
<b>C</b>	13/27	5/23	18/25	20/24

Πίνακας XV. Έκφραση TfR2 mRNA μεταγράφων σε υποομάδες ασθενών με διαφορετικά επίπεδα mRNA του TfR1.

Επίπεδα TfR1 mRNA	TfR2-α mRNA(+)	TfR2-β mRNA(+)
<b>A</b>	11/25	24/25
<b>B</b>	26/49	53/55
<b>C</b>	11/23	20/24



Εικόνα 19. Συναγωνιστική RT-PCR για mRNA μετάγραφα του TfR1 σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις ΧΛΛ. Το βέλος υποδεικνύει το σημείο ισοδυναμίας συγκέντρωσης μεταξύ συναγωνιστή και στόχου.

Η στατιστική ανάλυση δεν τεκμηρίωσε καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του mRNA του TfR, των επιπέδων των μεταγράφων TfR1 και της θετικότητας για CD71 (πρωτεΐνη TfR1). Επίσης, τα επίπεδα mRNA του TfR1 δεν συσχετίστηκαν με την ένταση φθορισμού του CD71 (Πίνακας XVI). Παρομοίως δεν παρατηρήθηκαν



συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του TfR1/TfR2 mRNA με το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Τέλος, η έκφραση του mRNA του TfR1/2 δεν συσχετίστηκε με καμία από τις άλλες φαινοτυπικές μεταβλητές (έκφραση του CD38 και CD69) που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας XVI. Πρότυπα έκφρασης του CD71 (θετικότητα και ένταση φθορισμού) σε υποομάδες ασθενών με διαφορετικά επίπεδα TfR1 mRNA levels.

Επίπεδα TfR1 mRNA	CD71 <sup>bright</sup>	CD71 <sup>dim</sup>	CD71 (-)	CD71 ΔΠ <sup>1</sup>	Σύνολο
<b>A</b>	19	1	5	2	27
<b>B</b>	45	5	3	4	57
<b>C</b>	19	2	4	2	27

<sup>1</sup>ΔΚ: δεν προσδιορίστηκε

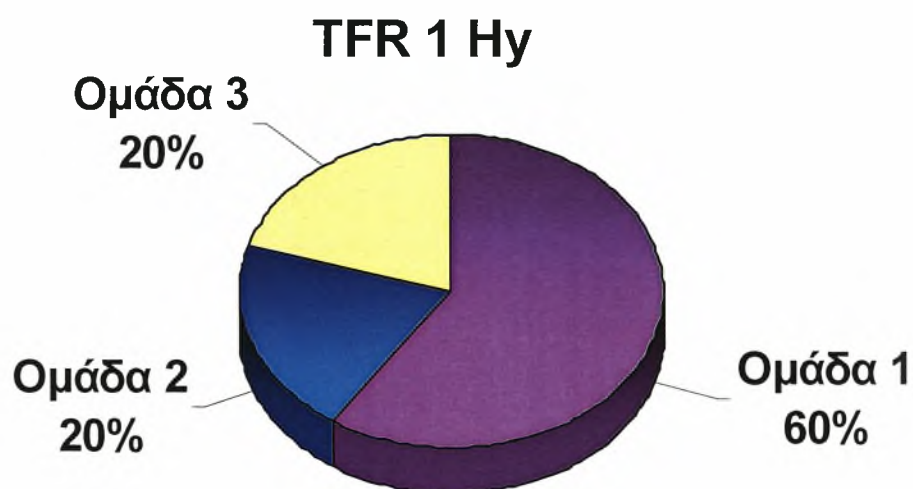
*Αποτελέσματα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση TfR1 και TfR2 mRNA μεταγράφων*

Αλληλουχίες cDNA που αντιστοιχούν σε TfR1 mRNA μετάγραφα και στη μορφή άλφα των TfR2 mRNA μεταγράφων ενισχύθηκαν με εκκινητές ειδικούς για τα εξόνια 15-17 (TfR1) και 3-5 (TfR2-άλφα) του αντίστοιχου γονιδίου και ειδικούς ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 74 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ με φορτίο λευχαιμικών κυττάρων τουλάχιστον 70%.

Κατά την ποσοτική ανάλυση αναγνωρίστηκαν 3 ομάδες με βάση τις καταμετρημένες τιμές και τη σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (Πίνακας XVII/ Εικόνα 18). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει 44 περιπτώσεις (59,5%) με τιμές από 0,38 ως 2 (χαμηλή έκφραση), η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει 15 περιπτώσεις (20,3%) με τιμές έκφρασης από 2 ως 5 (ενδιάμεσο επίπεδο έκφρασης), ενώ η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει 15 (20,3%) περιπτώσεις με τιμές από 5 ως 16 (υψηλή έκφραση).

Πίνακας XVII. Ομάδες ασθενών ΧΛΛ με διαφορετικά επίπεδα mRNA μεταγράφων του TfR1 σε ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.

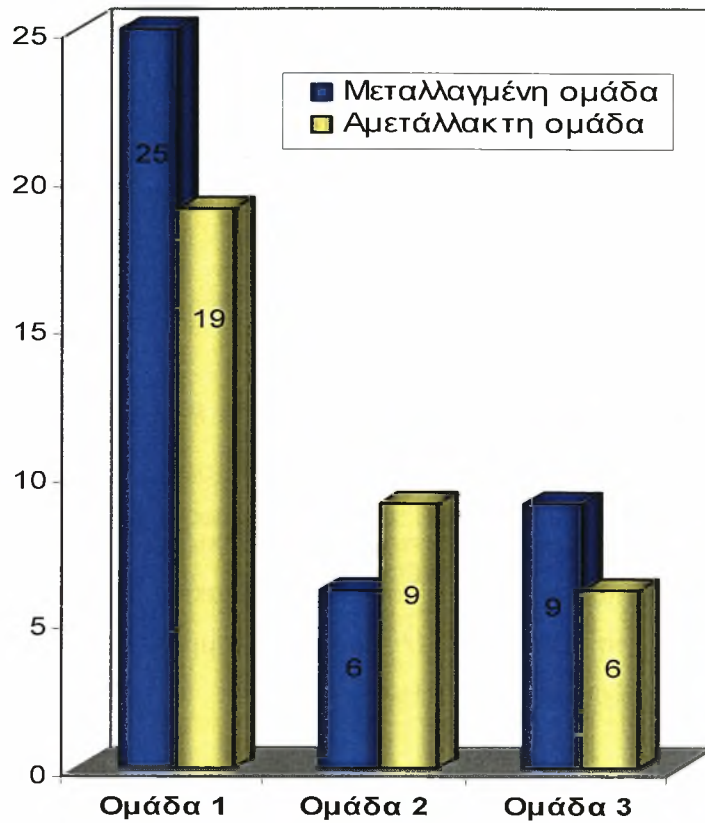
TfR 1 Hy		
Ομάδα 1	44	60
Ομάδα 2	15	20
Ομάδα 3	15	20
Σύνολο	74	100



Εικόνα 20. Κατανομή ασθενών με ΧΛΛ σε τρεις ομάδες με βάση τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του TfR1.

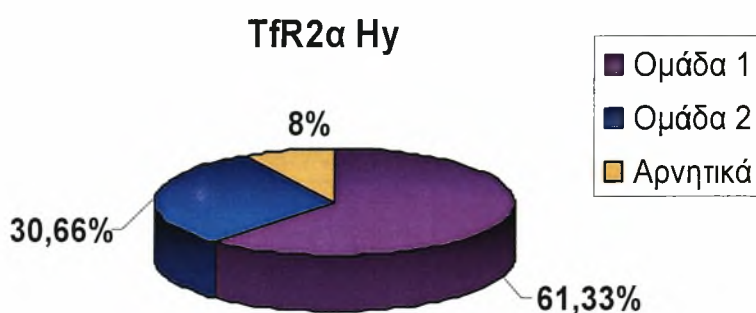
Η ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων έδειξε ότι στην πρώτη ομάδα συμπεριλαμβάνονταν 25 μεταλλαγμένες (56,8%) και 19 αμετάλλακτες περιπτώσεις (43,2%), στην δεύτερη ομάδα συμπεριλαμβάνονταν 6 μεταλλαγμένες (40%) και 9 αμετάλλακτες περιπτώσεις (60%), ενώ στην τρίτη ομάδα συμπεριλαμβάνονταν 9 μεταλλαγμένες (60%) και 6 αμετάλλακτες περιπτώσεις (40%) (Εικόνα 19).

## TFR1 ΗΥ



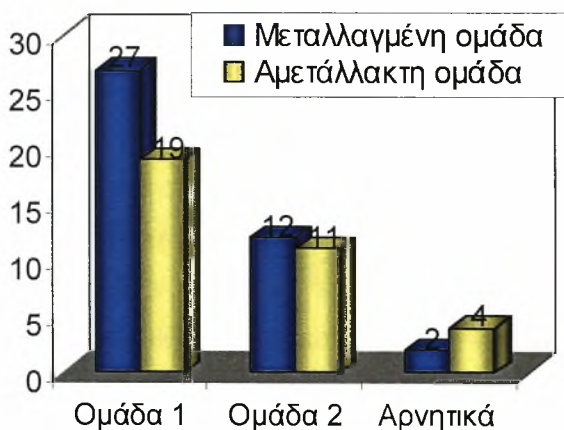
Εικόνα 21. Επίπεδα έκφρασης Tfr1 και «προφίλ» μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV.

Αλληλουχίες mRNA του Tfr2a ενισχύθηκαν σε 69/74 δείγματα. Σύμφωνα με τις καταμετρημένες τιμές που υπολογίστηκαν σε σύγκριση με το γονίδιο αναφοράς, τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα με το μικρότερο επίπεδο έκφρασης (0,02-0,10) περιλαμβάνονταν 46 περιπτώσεις (61,3%), ενώ στην δεύτερη ομάδα με τη μεγαλύτερη έκφραση (0,10-0,75) 23 περιπτώσεις (30,6%) (Εικόνα 20).



Εικόνα 22. Κατανομή ασθενών με ΧΛΛ σε δύο ομάδες με βάση τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του TfR2.

Η πρώτη ομάδα με το μικρότερο επίπεδο έκφρασης του TfR2α περιλάμβανε 27 μεταλλαγμένες περιπτώσεις (58,7%) και 19 αμετάλλακτες περιπτώσεις (41,3%), ενώ η δεύτερη ομάδα με τη μεγαλύτερη έκφραση περιλάμβανε 12 μεταλλαγμένες και 11 αμετάλλακτες περιπτώσεις (Εικόνα 21).



Εικόνα 8. Επίπεδα έκφρασης TfR2α και «προφίλ» μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV.

Τα δεδομένα για την έκφραση των CD38/CD69/CD71 για κάθε ομάδα Tfr1 mRNA και Tfr2a mRNA φαίνονται στους Πίνακες XVIII-XIX.

Πίνακας XVIII. Έκφραση των δεικτών CD38, CD69 και CD71 ανάλογα με τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του Tfr1 (προσδιορίστηκαν με RQ-PCR).

<b>TFR 1Hy</b>	<b>CD38+/-</b>	<b>CD69+/-</b>	<b>CD71+/-</b>
<b>Ομάδα 1</b>	8/30	21/11	29/3
<b>Ομάδα 2</b>	2/11	8/5	11/2
<b>Ομάδα 3</b>	3/10	5/3	5/3

Πίνακας XIX. Έκφραση των δεικτών CD38, CD69 και CD71 ανάλογα με τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του Tfr2 (προσδιορίστηκαν με RQ-PCR).

<b>TFR2aHy</b>	<b>CD38+/-</b>	<b>CD69+/-</b>	<b>CD71+/-</b>
<b>Ομάδα 1</b>	9/31	22/13	30/5
<b>Ομάδα 2</b>	4/15	9/4	11/2
<b>Αρνητικά</b>	0/6	3/3	5/1

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## A. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ IGKV-J ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

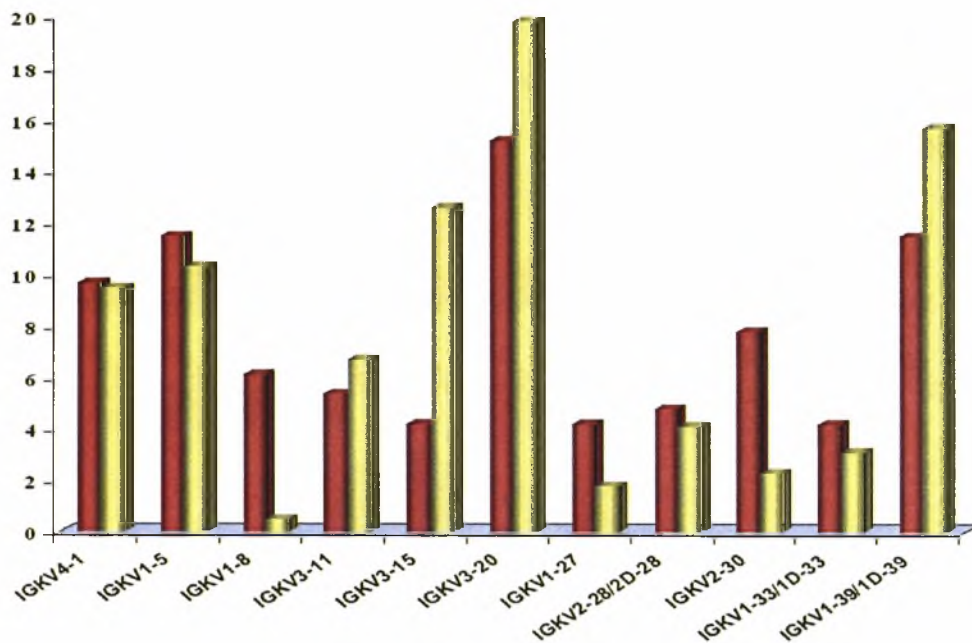
### 1. Ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGKV

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV σε 180 εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGKV-J σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία με κλωνοτυπική κ-ελαφριά αλυσίδα (κ-ΧΛΛ). Παρατηρήθηκε προτίμηση για συγκεκριμένα γονιδιακά τμήματα στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο. Στην κ-ΧΛΛ παρατηρήθηκε επιλεκτική χρησιμοποίηση γονιδίων IGKV σε αντιστοιχία προς τις αναδιατάξεις των φυσιολογικών IgM<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (170). Στην κ-ΧΛΛ, έξι γονίδια (IGKV3-20, 1-39/1D-39, 1-5, 4-1, 2-30, 3-11, 1-8) βρέθηκαν στο 69,3% των περιπτώσεων. Τα γονίδια IGKV1-39/1D-39, IGKV4-1 και IGKV2-30 ήταν επίσης συχνά τόσο στις παραγωγικές όσο και στις μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-J σε φυσιολογικά IgM<sup>+</sup> B κύτταρα περιφερικού αίματος (μελέτη με DNA-PCR μεμονωμένου κυττάρου), που οδήγησε τους συγγραφείς στην υπόθεση ότι η συχνή τους εμφάνιση στο παραγωγικό ρεπερτόριο πιθανόν σχετίζεται με αυξημένη χρησιμοποίηση κατά την αναδιάταξη και όχι με επιλογή που εξαρτάται από την έκφραση της κ πρωτεϊνικής αλυσίδας.

Ο λόγος της προτίμησης κάποιων γονιδίων ίσως είναι η μεγάλη αποτελεσματικότητα με την οποία ανασυνδυάζονται. Σε αυτό μπορεί να συμβάλλει η προσβασιμότητα των αλληλουχιών RSS από τα ένζυμα του ανασυνδυασμού ή και το γεγονός ότι οι αλληλουχίες RSS των γονιδίων αυτών μπορεί να είναι καταλληλότερα υποστρώματα για τα ένζυμα του ανασυνδυασμού. Κάτι αντίστοιχο έχει διατυπωθεί για τα γονίδια IGHV της βαριάς αλυσίδας (26). Τα γονίδια IGHV4-34, 4-39, 4-59, 3-23 και 3-30 χρησιμοποιούνται πολύ συχνά σε εκτός πλαισίου αναδιατάξεις IGHV-D-J σε προ-B λεμφοκύτταρα του ανθρώπου. Η υπερεκπροσώπηση τους σε κάποιο συγκεκριμένο σύνολο ώριμων B λεμφοκυττάρων ίσως οφείλεται κυρίως σε μοριακούς μηχανισμούς (δηλαδή, στο γεγονός ότι αναδιατάσσονται ευκολότερα) παρά σε μηχανισμούς επιλογής. Πρόσφατα, οι Lieber και συν. ανέφεραν ότι μόνο 5 από τα 39 λειτουργικά γονίδια IGHV (IGHV3-9, 3-43, 4-34, 4-39, 4-59) διαθέτουν RSS με αλληλουχία ταυτόσημη με τη συναινετική (consensus) αλληλουχία, που αντιστοιχεί σε σήματα RSS με άριστη αποτελεσματικότητα. Επίσης, τα γονίδια αυτά κόβονται πολύ αποτελεσματικότερα από τις πρωτεΐνες RAG. Στη μελέτη των Lieber και συν., παρατηρήθηκε εντυπωσιακή αντιστοιχία μεταξύ των αποτελεσμάτων κοπής από τις πρωτεΐνες RAG και των συχνοτήτων των διαφόρων γονιδίων IGHV στο μη

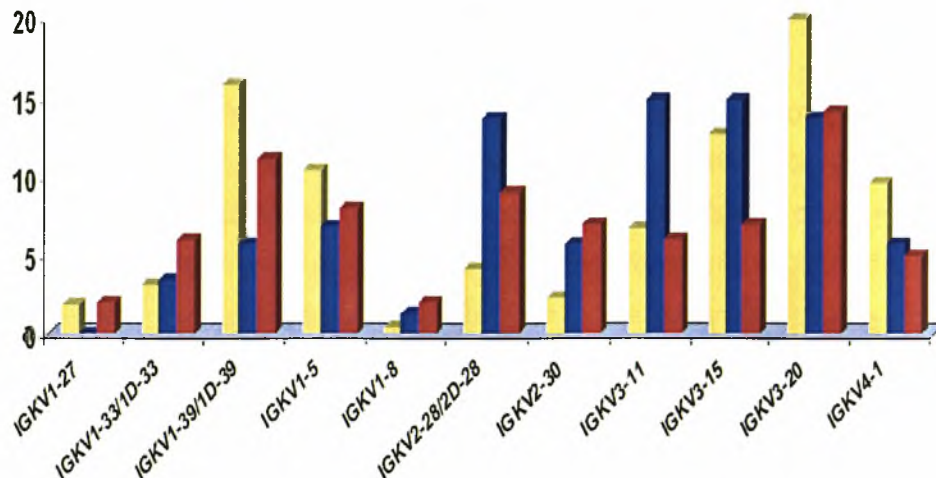
εκφραζόμενο (μη επιλεγμένο) ρεπερτόριο των Β λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Σχετικά δεδομένα για τα γονίδια IGKV δεν υπάρχουν (Max Lieber, προσωπική επικοινωνία).

Η ανάλυση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου στην κ-ΧΛΛ έδειξε ότι συχνότερο γονίδιο ήταν το IGKV3-20 (15,1%). Ακολούθησαν τα γονίδια IGKV1-39/1D-39 (12,3%), IGKV1-5 και το γονίδιο IGKV4-1 (10,6%) και το IGKV2-30 (7,3%). Γενικά, η κατανομή των γονιδιακών τμημάτων στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ δεν διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη κατανομή στις παραγωγικές αναδιατάξεις του ρεπερτορίου των φυσιολογικών IgM<sup>+</sup> Β λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος(170) (Εικόνα 1). Ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση μερικών γονιδίων: έτσι, στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ το γονίδιο IGKV4-1 χρησιμοποιείται με σχεδόν διπλάσια συχνότητα (10,6%) σε σχέση με τις παραγωγικές αναδιατάξεις του φυσιολογικού ρεπερτορίου (5,3%). Παρομοίως, βρέθηκαν με αυξημένη συχνότητα τα γονίδια IGKV1-8 (6,7% έναντι 2,2%), IGKV1-5 (10,6% έναντι 8,1%) και IGKV1-27 (3,9% έναντι 2,2%). Όπως και στο μη εκφραζόμενο ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ, κάποια γονίδια (IGKV1-5, IGKV3-20 και IGKV1-39/1D-39) βρέθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με το αναμενόμενο αν οι αναδιατάξεις είχαν συμβεί κατά τύχη.



Εικόνα 1. Σύγκριση ρεπερτορίου γονιδίων IGKV στην κ-ΧΛΛ (κόκκινες στήλες/ παρούσα μελέτη) και σε φυσιολογικά Β-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (de Wildt, 168).

Αντιθέτως, κάποια γονίδια βρέθηκαν με σχετικά μειωμένη συχνότητα, π.χ., IGKV2-28/2D-28 (4,9% έναντι 9%), IGKV3-15 (4,3% έναντι 7,2%) και IGKV1-33/1D-33 (4,3% έναντι 6,2%). Μολαταύτα, αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, με δεδομένη την έλλειψη μιας πραγματικά αντιπροσωπευτικής «φυσιολογικής» βάσης δεδομένων που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βάση αναφοράς. Έτσι, σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των γονιδίων IGKV παρατηρήθηκαν μεταξύ μελετών φυσιολογικών κυττάρων (168-176) (Εικόνα 2): οι διαφορές αυτές πιθανόν σχετίζονται με τη διαφορετική προέλευση των αλληλουχιών.



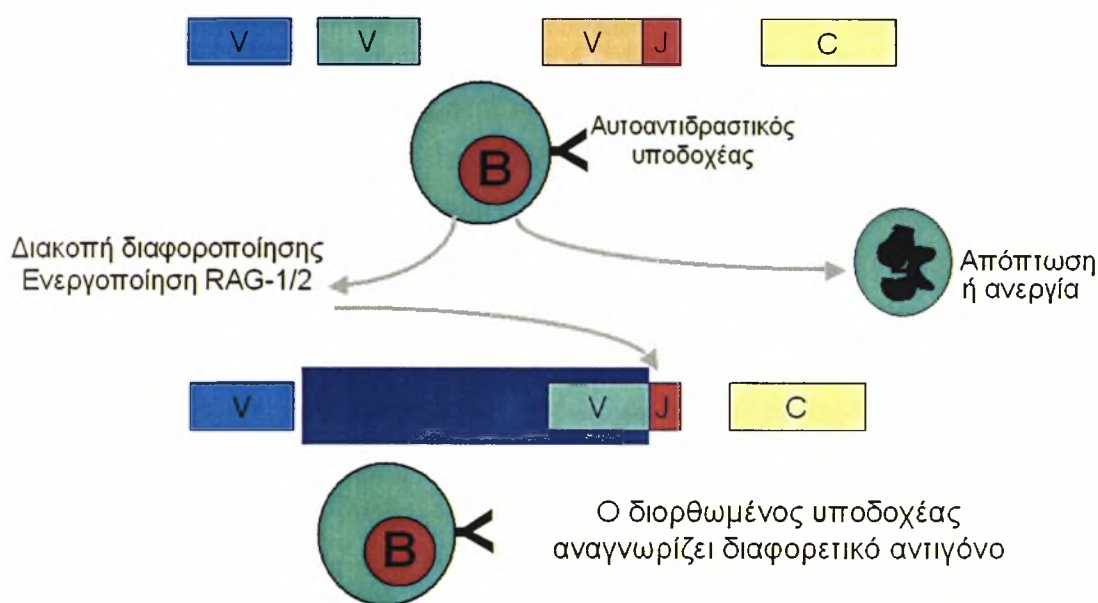
Εικόνα 2. Σύγκριση ρεπερτορίου γονιδίων IGKV σε τρεις μελέτες φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Κίτρινες στήλες, de Wildt et al. (168): μελέτη cDNA/ μπλε στήλες, Juul et al (169): μελέτη cDNA/ κόκκινες στήλες, Foster et al. (170), μελέτη DNA.

Ρεπερτόρια που προκύπτουν με μελέτες cDNA ίσως εμφανίζουν προτίμηση προς ενεργοποιημένα κύτταρα, που περιέχουν μεγαλύτερα ποσά mRNA απ' ό,τι τα λεμφοκύτταρα σε ηρεμία (169). Από την άλλη πλευρά, μελέτες που βασίστηκαν σε DNA και απλώς διέκριναν μεταξύ παραγωγικών (δηλαδή, εντός πλαισίου) και μη παραγωγικών (δηλαδή, εκτός πλαισίου) αναδιατάξεων (170,173) δεν επιτρέπουν ακριβή εκτίμηση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου. Σε αυτό το πλαίσιο, σημαντικό ποσοστό (~30-40%) των μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J τόσο στα φυσιολογικά Β κύτταρα (13) που εκφράζουν λ αλυσίδα όσο και στη λ-ΧΛΛ είναι παραγωγικές (εντός πλαισίου). Όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί από την ομάδα μας, ορισμένα γονίδια IGKV χρησιμοποιούνται σε μη εκφραζόμενες, εντός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J στη ΧΛΛ σε αξιοσημείωτα διαφορετικές συχνότητες από τις συχνότητες που αναφέρονται εδώ(177). Επιπλέον, η μέθοδος της κλωνοποίησης που υιοθετήθηκε σε μερικές μελέτες εισήγαγε διαφορές. Τέλος, οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των μελετών ίσως οφείλονται επίσης στους διαφορετικούς δότες των κυττάρων που αναλύθηκαν.

Σε αντίθεση προς το μη εκφραζόμενο ρεπερτόριο, η κατανομή των γονιδίων IGKV στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο επηρεάζεται και από την έκφραση της κ ελαφριάς αλυσίδας στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου. Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω της θετικής επιλογής των Β λεμφοκυττάρων που εκφράζουν κ ελαφριά αλυσίδα η οποία

κωδικοποιείται από τα συγκεκριμένα γονίδια IGKV, (178) αλλά και λόγω πιθανής διόρθωσης υποδοχέα (receptor editing) μετά από αρνητική επιλογή (30,179). Επίσης, η υπερεκπροσώπηση αυτών των γονιδίων στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο ίσως επηρεάζεται και από τη λειτουργικότητα των ρυθμιστικών αλληλουχιών τους (υποκινητές και ενισχυτές)(180).

Αντικατάσταση αναδιάταξης που κωδικοποιεί αυτοαντιδραστικό υποδοχέα



Εικόνα 3. Η διόρθωση υποδοχέα (receptor editing) είναι ένας από τους τρόπους με τους οποίους εξασφαλίζεται η αυτοανοχή. Η αναγνώριση αυτοαντιγόνου από τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των γονιδίων RAG-1 και RAG-2. Αυτό επιτρέπει τη διάσωση του κυττάρου με περαιτέρω ανασυνδυασμό.

Στη μεγάλη πλειονότητα των αναδιατάξεων (76%) αναγνωρίστηκαν γονίδια από το «εγγύς» σε σχέση με την περιοχή IGKJ-IGKC άθροισμα γονιδίων (J-proximal cluster). Από τα γονίδια του «άπω» αθροίσματος (J-distal cluster), στις εκφραζόμενες αναδιατάξεις βρέθηκαν μόνο τα IGKV2D-30, IGKV2D-29 και IGKV1D-16. Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητα του ανασυνδυασμού ανάμεσα σε γονίδια που απέχουν πολύ από τα γονίδια IGKJ (όπως τα γονίδια του J-distal αθροίσματος: απόσταση από την περιοχή IGKJ > 1.500 Kb). Επίσης, η μειωμένη συχνότητα των γονιδίων αυτών ίσως σχετίζεται και με το γεγονός ότι ανασυνδυάζονται με αναστροφή. Αυτό δεν φαίνεται



πολύ πιθανό, με δεδομένη την υψηλή συχνότητα του γονιδίου IGKV4-1, το οποίο επίσης ανασυνδυάζεται με αναστροφή. Σε αντιστοιχία προς το φυσιολογικό ρεπερτόριο, γονίδια του «άπω» αθροίσματος (IGKV2-40/2D-40, IGKV2D-30, IGKV3D-20, IGKV3D-15, IGKV3D-11, IGKV3D-7, IGKV1D-8, IGKV1D-43, IGKV1D-12, και IGKV1D-17) βρέθηκαν σπάνια (ή καθόλου) στην κ-ΧΛΛ.

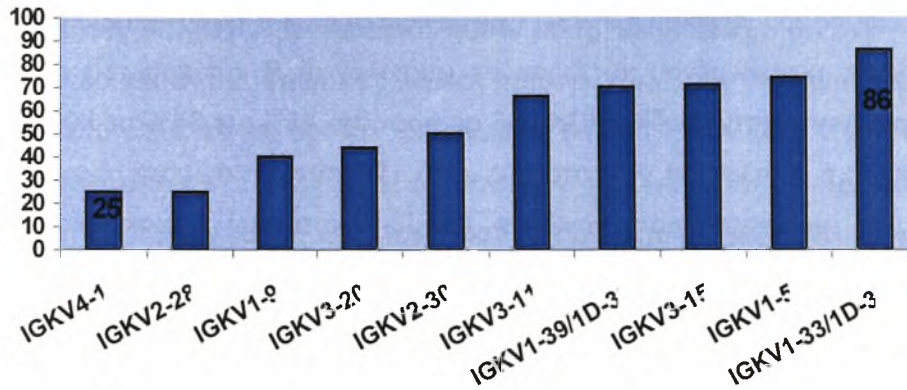
## **2. Δημιουργία ποικιλότητας στις συμβολές των εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J**

Τόσο στις βαριές όσο και στις ελαφριές αλυσίδες, το μήκος του CDR3 και η σύνθεση σε αμινοξέα συμβάλλουν σημαντικά στην ειδικότητα του αντισώματος για το αντιγόνο (182-185). Τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής έως τη γέννηση συμβαίνει συνεχής αύξηση στο μήκος του CDR3, κυρίως εξαιτίας της σχετικής απουσίας των περιοχών N στα εμβρυϊκά γονίδια (185-187). Τα μεταλλαγμένα αντισώματα φέρουν μικρότερα CDR3 σε σχέση με τα αμετάλλακτα τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο (187). Από μόνη της η αλληλουχία των αμινοξέων δεν μπορεί να ορίσει αν ένα αντίσωμα θα είναι αυτό-αντιδραστικό. Ωστόσο, οι μακριές περιοχές KCDR3 ή LCDR3 έχουν συσχετιστεί με αυτοαντιδραστικά ή πολυαντιδραστικά αντισώματα (47, 188, 189).

Το μήκος της περιοχής CDR3 τόσο σε παραγωγικές όσο και σε μη παραγωγικές αναδιατάξεις της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα καθορίζεται αυστηρά από μοριακούς μηχανισμούς που το περιορίζουν συνήθως σε 9 αμινοξέα (178, 181). Στην παρούσα μελέτη, τάση προς πιο μακριές περιοχές CDR3 παρατηρήθηκε σε αναδιατάξεις IGKV-J όπου συμμετείχε η υποομάδα γονιδίων IGKV3 (48% των αναδιατάξεων IGKV3 είχε KCDR3 >9 αμινοξέα). Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με προηγούμενες αναφορές σε φυσιολογικά Β κύτταρα (εμβρύων και ενηλίκων) (169-170, 175-176). Το γεγονός ότι στην ΧΛΛ, όπως και στο φυσιολογικό ρεπερτόριο, η υποομάδα IGKV3 αντιπροσωπεύεται πιο συχνά απ' ότι αναμενόταν, αν η χρησιμοποίηση των γονιδίων ήταν τυχαία ίσως σημαίνει κυτταρική επιλογή των μακρύτερων CDR3 στα IGKV3 αντισώματα (sIGs) (151).

Η δράση των ενζύμων TdT, 3' εξωνουκλεάση και 5' εξωνουκλεάση στις συμβολές των εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J γενικά δεν εμφάνισε διαφορές σε σχέση προς το φυσιολογικό ρεπερτόριο. Σε πολλές εκφραζόμενες αναδιατάξεις (51,5%) εντοπίστηκε προσθήκη νουκλεοτιδίων N στις συμβολές, με διάμεση τιμή τρία N νουκλεοτίδια. Αυτό δείχνει ότι η δράση της TdT δεν έχει κατασταλεί κατά την





Εικόνα 4. Συχνότητα (%) ανεύρεσης N νουκλεοτιδίων σε αναδιατάξεις IGKV-J ανάλογα με το γονίδιο IGKV.

αναδιάταξη του γενετικού τύπου IGK. Ωστόσο, ο αριθμός των νουκλεοτιδίων N στις αναδιατάξεις της κ ελαφριάς αλυσίδας είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο στις αναδιατάξεις των βαριών αλυσίδων. Παρολαυτά, η δράση της TdT διέφερε σημαντικά μεταξύ αναδιατάξεων διαφορετικών γονιδίων IGKV.

Παρόμοια πρότυπα δράσης της TdT παρατηρήθηκαν σε φυσιολογικές και αυτοαντιδραστικές αλληλουχίες cDNA από τις δημόσιες βάσεις δεδομένων (194,195). Η παρουσία ή απουσία έκφρασης της TdT διαμορφώνει το ρεπερτόριο του CDR3, και αυτές οι αλλαγές φαίνεται να είναι ειδικές για συγκεκριμένα γονίδια IGKV και ανεξάρτητες της επιλογής από αντιγόνο. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η TdT επίσης επηρεάζει τη χρησιμοποίηση των γονιδίων επηρεάζοντας την ικανότητα ανασυνδυασμού. Συνεπώς ο ρόλος της ίσως είναι σημαντικότερος από την απλή διαμόρφωση της περιοχής CDR3 (190).

### 3. Επιλεκτική χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο

Όπως στα γονίδια IGKV, έτσι και στα γονίδια IGKJ παρατηρήθηκε επιλεκτική χρησιμοποίηση. Το γονίδια IGKJ1 και IGKJ2 βρέθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο (69%). Σημαντικές διαφορές στη χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ παρατηρήθηκε σε αναδιατάξεις με διαφορετικά γονίδια IGKV. Όπως αποκάλυψε η σύγκριση με φυσιολογικές και αυτοαντιδραστικές cDNA αλληλουχίες IGKV-J, ακραία πρότυπα ανασυνδυασμού με γονίδια IGKJ1-2 σε σχέση με γονίδια IGKJ3-5 συχνά ήταν ειδικά για τη ΧΛΛ. Έτσι, τα γονίδια IGKV3-20 και IGKV3-15 ανασυνδυάζονταν πολύ συχνότερα με γονίδια IGKJ3-5 στη ΧΛΛ σε σύγκριση είτε με

τα φυσιολογικά είτε με τα αυτοαντιδραστικά κύτταρα, ενώ επιλεκτικός ανασυνδυασμός του γονιδίου IGKV3-11 με γονίδια IGKJ3-5 παρατηρήθηκε μόνο στη ΧΛΛ. Μελέτες μεμονωμένου κυττάρου σε φυσιολογικά Β κύτταρα του ανθρώπου έδειξαν χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ3-5 σε ποσοστό 45% και 64% σε κύτταρα που εκφράζουν κ ή λ αλυσίδα, αντιστοίχως (13). Σε αυτοαντισώματα διαγονιδιακών ποντικών, η χρησιμοποίηση γονιδίων IGKJ3-5 αποτελεί χαρακτηριστικό των αυτοαντιδραστικών κυττάρων που διαφεύγουν την απαλοιφή (deletion) με δευτερογενείς αναδιατάξεις που αλλάζουν την ειδικότητα του αντιγονικού υποδοχέα (49,191). Αυτό το εύρημα θεωρήθηκε ως ένδειξη παρατεταμένου γονιδιακού ανασυνδυασμού στην κ ελαφριά αλυσίδα. Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν γονίδια anti-DNA αποκάλυψε ότι τα Β κύτταρα που εκφράζουν αρχικά κ αλυσίδα με το γονίδιο IGKJ1 αναθεωρούν τον υποδοχέα τους πιο αποτελεσματικά από αυτά που φέρουν το γονίδιο IGKJ5 (200).

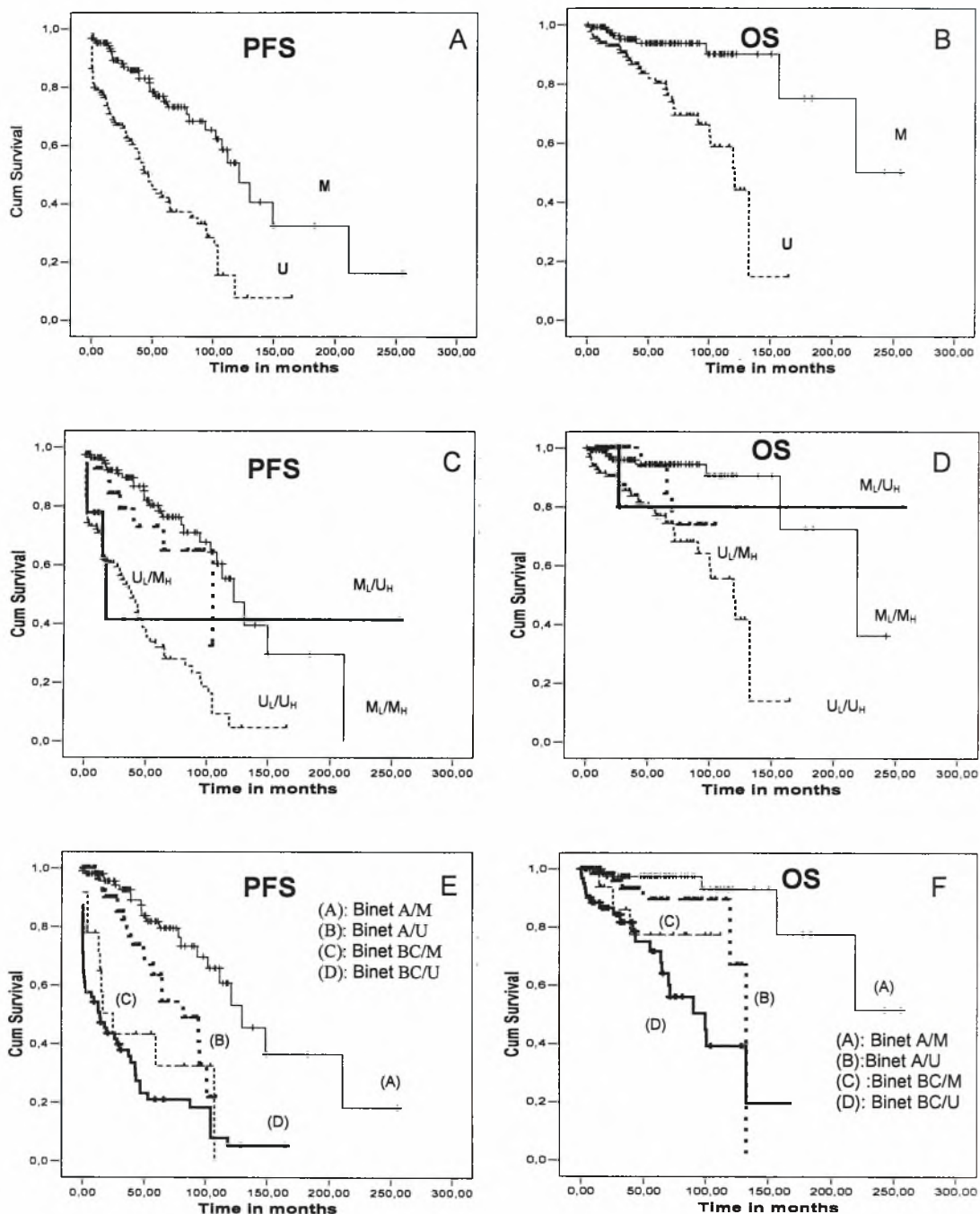
#### **4. Ανάλυση των σωματικών μεταλλάξεων**

Ενεήντα εννιά από τις 180 αναδιατάξεις IGKV-J (49.7%) ήταν αμετάλλακτες ( $\geq 98\%$  ομολογία με το πλησιέστερο μη ανασυνδυασμένο γονίδιο), 58/89 αμετάλλακτες αλληλουχίες IGKV-J είχαν 100% ομολογία. Η κατανομή των γονιδίων IGKV ανάμεσα σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αναδιατάξεις διέφερε σημαντικά. Στην περίπτωση ορισμένων γονιδίων IGKV/IGLV (IGKV1-33/1D-33, IGKV2-30), η σύγκριση με φυσιολογικές και αυτοαντιδραστικές αλληλουχίες αποκάλυψε πως τα πρότυπα των μεταλλάξεων στην παρούσα μελέτη ήταν ειδικά για τη ΧΛΛ.

Η παράλληλη ανάλυση των γονιδίων των βαριών και ελαφριών αλυσίδων στη ΧΛΛ έδειξε σημαντική ετερογένεια όσον αφορά στο φορτίο των μεταλλάξεων τόσο στα γονίδια IGHV όσο και στα IGKV, με πολύ λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις σε σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων. Παρολαυτά, έστω και λίγες μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάζουν αποφασιστικά τη λειτουργικότητα του αντισώματος: από παλαιότερες μελέτες γνωρίζουμε ότι ακόμα και αλλαγές μεμονωμένων βάσεων μπορεί να είναι σημαντικές για τη βελτίωση της αναγνώρισης του αντιγόνου (π.χ., μεγάλης συγγένειας anti-DNA αντισώματα στον ερυθρηματώδη λύκο με ελάχιστες σωματικές μεταλλάξεις) (191-192).

Η ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων παρείχε ενδείξεις για επιλογή από κλασικό T-εξαρτώμενο αντιγόνο σε μια μικρή υποομάδα των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι λογικό να υποθέσουμε το αντιγόνο ασκεί πιέσεις επιλογής είτε στα γονίδια IGHV είτε στα IGKV και αυτό πιθανόν αποτελεί σημαντικό γεγονός στην παθογένεση ενός –τουλάχιστον – ποσοστού περιπτώσεων ΧΛΛ (103, 193).

Οι μελέτες των Damle et al. και Hamblin et al. αποκάλυψαν ότι οι ασθενείς με ΧΛΛ που εκφράζουν γονίδια V με ομολογία >98% με το πλησιέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο ακολουθούν πιο επιθετική κλινική πορεία και έχουν σημαντικά μικρότερη επιβίωση από ασθενείς με αρκετές μεταλλάξεις στο γονίδιο V (86, 101, 111). Αυτό έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές ομάδες ασθενών με ΧΛΛ. Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε την προγνωστική αξία του φορτίου των μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV παράλληλα με το φορτίο των μεταλλάξεων στα γονίδια IGKV σε διαφορετικές υποομάδες των συστημάτων κλινικής ταξινόμησης (Rai/Binet) (Εικόνα 5). Σε μονοπαραμετρική ανάλυση, το κλινικό στάδιο κατά τη διάγνωση (Rai/Binet), το φορτίο των μεταλλάξεων στα γονίδια IGKV και το φορτίο των μεταλλάξεων στα γονίδια IGH σχετίστηκαν σημαντικά με την έκβαση της ασθένειας. Επιπλέον, σε διπαραμετρική ανάλυση το φορτίο των μεταλλάξεων στα γονίδια IGK σε συνδυασμό με το κλινικό στάδιο ή το φορτίο των μεταλλάξεων στα γονίδια IGH συσχετίστηκε σημαντικά με την έκβαση της ασθένειας. Παρολαυτά, σε πολυπαραμετρική ανάλυση, μόνο το φορτίο των μεταλλάξεων και το κλινικό στάδιο παρέμειναν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες, σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (196-197, 228-230). Η ανάλυση μας επιβεβαιώνει ότι η κλινική ταξινόμηση και τα γονίδια IGV είναι ανεξάρτητες προγνωστικές μεταβλητές και πιθανότατα παρέχουν συμπληρωματική πληροφορία.



Εικόνα 5. Καμπύλες Kaplan-Meier για επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (progression-free survival, PFS) και ολική επιβίωση (overall survival, OS). Συγκρίσεις: (A, B) μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV; (C, D) διπαραμετρική ανάλυση «προφίλ» μεταλλάξεων IGH και IGKV; (E, F) στάδιο κατά τη διάγνωση (Binet, A έναντι BC) και «προφίλ» μεταλλάξεων IGK.

M: μεταλλαγμένη, U: αμετάλλακτη, H: βαριά αλυσίδα, L: ελαφριά αλυσίδα

## 5. Ομόλογες υποομάδες

Στο ρεπερτόριο των ώριμων φυσιολογικών Β κυττάρων επικρατούν μερικά γονίδια IGHV χωρίς ενδείξεις για επιλεκτικό συνδυασμό συγκεκριμένων γονιδίων ή υποομάδων βαριών και ελαφριών αλυσίδων IG (168, 174, 208). Φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μήκους των περιοχών CDR3 και των αλληλουχιών της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας ούτε μεταξύ γονιδίων IGHV/IGHD/IGHJ. Αντίθετα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες από διάφορες γεωγραφικές περιοχές (198-199, 200-204), ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του ρεπερτορίου των αντισωμάτων στη ΧΛΛ είναι η ύπαρξη ομάδων περιπτώσεων με επαναλάμβανόμενα στερεότυπα BCRs (χρησιμοποίηση των ίδιων γονιδίων IGHV και IGKV/IGLV με μοναδικά, κοινά μοτίβα HCDR3 και CDR3 ελαφριών αλυσίδων).

Κάθε αλληλουχία IGKV-J της παρούσας μελέτης συγκρίθηκε με κάθε αλληλουχία B-ΧΛΛ και πολλαπλού μυελώματος δικών μας δειγμάτων καθώς επίσης με κάθε αλληλουχία IGKV-J από φυσιολογικά και αυτοαντιδραστικά κύτταρα δημόσιων βάσεων δεδομένων cDNA, χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ανάλυσης του IMGT. Αυτή η ανάλυση αναγνώρισε ομάδες με παρόμοιες αλληλουχίες με πολύ ομόλογες περιοχές CDR3 (“ομόλογες ομάδες”) που αποτελούνταν κυρίως ή αποκλειστικά από αλληλουχίες ΧΛΛ.

Ειδικότερα: (i) μεταξύ 53 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV2-30 στη ΧΛΛ (δική μας μελέτη) και σε διαφορετικά κύτταρα (μη ΧΛΛ), επτά αλληλουχίες IGKV2-30-IGKJ2 ΧΛΛ από τη δική μας μελέτη (6/7 μεταλλάγμένες) είχαν σχεδόν παρόμοια, όξινη, περιοχή KCDR3 (MQGT[H/Y]W[+/-P][P/G]YT) (Εικόνα 6). Έξι από τις επτά αλληλουχίες συνδυάζονταν με βαριές αλυσίδες IGHV4 (HCs), 5/6 συνδυάζονταν με IGHV4-34 HCs με ομόλογα, βασικά HCDR3 των 18-20 αμινοξέων. Ενδείξεις για επιλογή από κλασικό T-εξαρτώμενο αντιγόνο πήραμε σε μόνο 1/8 αλληλουχίες IGHV+IGKV της ίδιας ομάδας. Η ομάδα IGHV4-34/IGKV2-30 έχει αναφερθεί παλαιότερα (203).

## Σύνολο 1

	IGKV	IGKJ	HOM*	KCDR3
P1422	IGKV2-30	IGKJ2	95,7	MQGTHW PYT
P103	<b>IGKV2-30</b>	IGKJ2	97,3	-----P---
P907	IGKV2-30	IGKJ2	97	----Y- ---
P1626	IGKV2-30	IGKJ2	96,2	----- ---
P711	IGKV2-30	IGKJ2	99,3	----- ---
P860	IGKV2-30	IGKJ2	96,3	----- ---

	IGHV	IGHD	IGHJ	HOM*	HCDR3
	IGHV4-34	IGHD5-12	IGHJ6	91,9	ARGYADTPTFRRYYYYGMDV
	IGHV4-34	IGHD3-10	IGHJ6	95,9	----P---VV-----
	IGHV4-34	IGHD4-17	IGHJ6	93,2	----GTSA-TK-----
	IGHV4-34	IGHD4-17	IGHJ6	94,8	-S-S ---T-----
	IGHV4-34	IGHD6-19	IGHJ4	97,4	ARGQWLDNY
	IGHV4-30-4	IGHD4-23	IGHJ5	91	VRDGNSN

Εικόνα 6. Υποσύνολο IGKV2-30/IGHV4-34. HOM\*: ομολογία.

(ii) μεταξύ 172 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-39/1D-39 στη ΧΛΛ (δική μας μελέτη) και σε διαφορετικά κύτταρα (μη ΧΛΛ) αναγνωρίστηκαν δύο ομόλογες ομάδες. Η πρώτη περιλάμβανε 3 αμετάλλακτες αναδιατάξεις ΧΛΛ IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 από τη δική μας μελέτη με παρόμοια, όξινη περιοχή KCDR3 (QQSYSTPPYT μήκους 10 αμινοξέων), όλες συνδυασμένες με αμετάλλακτο γονίδιο IGHV1 (Εικόνα 7).

## Σύνολο 2α

	IGKV	IGKJ	HOM*	KCDR3
P1986	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	100	QQSYSTPPYT
N1457	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	100	-----
P439	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	100	-----

	IGHV	IGHD	IGHJ	HOM*	HCDR3
	IGHV1-8	IGHD6-13	IGHJ6	100	ARGLLSPYSSSWYWDFRHHYYGMDV
	IGHV1-18	IGHD6-19	IGHJ4	99,3	ARKQWLPQYYFDY
	IGHV1-3	IGHD6-19	IGHJ4	100	--W---VLG----

Εικόνα 7. Υποσύνολο IGKV1-39/1D-39/IGHV1. HOM\*: ομολογία.

Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε 4 αμετάλλακτες αναδιατάξεις ΧΛΛ IGKV1-39/1D-39-IGKJ1/4 με παρόμοια, όξινο KCDR3 [QQSYSTPL(P)T]. Δύο αναδιατάξεις



συνδυάζονταν με αμετάλλακτη περιοχή IGHV4-39 με ομόλογη, βασική περιοχή HCDR3 19 αμινοξέων. Η ομάδα IGHV4-34/IGKV2-30 έχει αναφερθεί παλαιότερα (201-204). Είναι σημαντικό ότι όπως και σε μια από τις παραπάνω μελέτες (201), και οι δύο ομόλογες περιπτώσεις IGKV1-39-1D-39/IGHV4-39 της δικής μας μελέτης ήταν sIgG+.

Σύνολο 2β				
	IGKV	IGKJ	HOM*	KCDR3
P1114	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	100	QQSYSTPLT
P1615	IGKV1-39/1D-39	IGKJ1	100	-----P-
P191	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	100	-----
N235	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	99,6	-----

IGHV	IGHD	IGHJ	HOM*	HCDR3
IGHV4-39	IGHD6-13	IGHJ5	100	ARRTGYSSSWYSTYNWFDP
IGHV4-39	IGHD6-13	IGHJ5	100	-S-R-----FNV-A----
IGHV3-49	IGHD3-3	IGHJ4	100	TRGPAEEYYDFWSGYYRLGGYY
IGHV3-74	IGHD3-9	IGHJ4	100	ARDLSGHYDILTGYyreIFDY

Εικόνα 8. Υποσύνολο IGKV1-39/1D-39/IGHV4-39. HOM\*: ομολογία.

Όμοια, όξινη περιοχή KCDR3 αναγνωρίστηκε σε 5 IGKV1-39/1D-39 αλληλουχίες της δημόσιας βάσης δεδομένων (AJ399870, AF306388, L12112, X98985, L12065), όλες προερχομενες από κύτταρα με δράση αντι-θυρεοδικής υπεροξειδάσης (195, 205-206).

(iii) Μετάξυ 95 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-5 στη ΧΛΛ (δική μας μελέτη) και σε διαφορετικά κύτταρα (μη ΧΛΛ), 4 αλληλουχίες IGKV1-5-IGKJ1/3 CLL από τη δική μας μελέτη (3 αμετάλλακτες) είχαν παρόμοια, όξινη περιοχή KCDR3 (QQYNSYP[W/F]T). Δύο από τις παραπάνω αλληλουχίες συνδυάζονταν με αμετάλλακτες βαριές αλυσίδες IGHV4-39 με όξινη, μη ομόλογη περιοχή HCDR3 (Εικόνα 9).

Σύνολο 3				
	IGKV	IGKJ	HOM*	KCDR3
N31	IGKV1-5	IGKJ1	100	QQYNSYPWT
N232	IGKV1-5	IGKJ1	100	-----
N1622	IGKV1-5	IGKJ1	100	-----
P1289	IGKV1-5	IGKJ3	96,4	-----F-

IGHV	IGHD	IGHJ	HOM*	HCDR3
IGHV4-39	IGHD3-16	IGHJ3	100	ARTLSYYDYVWANAFDI
IGHV3-30	IGHD2-15	IGHJ6	100	AKDSVSVVVVAATYLTPIYYYGMDV
IGHV4-39	IGHD2-8	IGHJ6	100	ARGCRCTNGVCYVYYYYGMDV
IGHV4-59	IGHD5-24	IGHJ3	87	GRGGNGYNYIQI

Εικόνα 9. Υποσύνολο IGKV1-5. HOM\*: ομολογία.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, η ανάπτυξη της Β-ΧΛΛ ίσως αφορά σε κλώνους Β κυττάρων με καθορισμένη δομή IgV και/ή BCR. Μια έντονη ενδογενής προτίμηση στο συνδυασμό των γονιδίων και της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στον πληθυσμό των Β κυττάρων που προάγει την ανάπτυξη της Β-ΧΛΛ δεν μπορεί ν' αποκλεισθεί, ιδίως επειδή η προέλευση του κυττάρου της ΧΛΛ είναι ακόμα αβέβαιη (207). Αυτός ο περιορισμός του BCR (BCR restriction) μπορεί να είναι συνέπεια: (i) τυχαίου μετασχηματισμού ενός υποπληθυσμού Β κυττάρων με πολύ περιορισμένη ετερογένεια αντιγονικού υποδοχέα που προσδιορίζεται γενετικά ή με επιλογή από αντιγόνο (ii) ειδικού μετασχηματισμού Β κυττάρων που επιλέχθηκαν από το αντιγόνο ανάμεσα σ'έναν υποπληθυσμό κυττάρων με ετερογενείς υποδοχείς (iii) και των δύο παραπάνω μηχανισμών. Όποια και αν είναι η αιτία, αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θεωρία ότι η Β-ΧΛΛ αναπτύσσεται από ένα περιορισμένο σύνολο Β λεμφοκυττάρων με καθορισμένη δομή BCR και υπαινίσσεται πως η επιλογή των Β κυττάρων με τέτοιες δομές αντιπροσωπεύει μια σημαντική παράμετρο για την εξέλιξη των λευχαιμικών κυττάρων. Αυτός ο περιορισμός του υποδοχέα μάλλον συμβαίνει νωρίς και βασίζεται στη σύνθεση του BCR, στην ειδικότητα και στην ικανότητα του να μεταδίδει σήματα (198-199, 200-204).

## 6. Αυτοαντιδραστικά αντισώματα και κύτταρική προέλευση της ΧΛΛ.

Τα κύτταρα της Β-ΧΛΛ συχνά παράγουν "φυσικά" ή πολυαντιδραστικά IgM αυτοαντισώματα με αντιδραστικότητα σε αυτόλογες πρωτεΐνες όπως IgG,

καρδιολιπίνη, ακτίνη και θυροσφαιρίνη (209). Αυτό σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι τα λευχαιμικά κύτταρα στερούνται αποκλεισμού αλληλομόρφου (allelic exclusion) πιο συχνά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά B κύτταρα (210, 212), πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν εξετάζεται το ζήτημα της προέλευσης των κυττάρων της Β-ΧΛΛ. Η έκφραση του CD5 σε συνδυασμό με την αυτοαντιδραστικότητα είναι κοινό χαρακτηριστικό των Β κυττάρων της ΧΛΛ αλλά και των φυσικών αυτοαντιδραστικών Β κυττάρων (211, 215, 218). Η ομοιότητα μεταξύ των Β κυττάρων που παράγουν φυσικά αυτοαντισώματα και των Β κυττάρων της ΧΛΛ θα μπορούσε να σημαίνει ότι η διεργασία της θετικής επιλογής των φυσικών αυτοαντιδραστικών Β κυττάρων πιθανόν εμπεριέχει τον κίνδυνο λευχαιμογένεσης (221). Μια πρόσφατη μελέτη με αντικείμενο την έκφραση σε ποντίκια ενός πολυαντιδραστικού αυτοαντισώματος από ασθενή με ΧΛΛ έδειξε ότι η έκφραση πολυαντιδραστικών αντισωμάτων μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη Β λεμφοκυττάρων μνήμης που ούτε καταστρέφονται ούτε καθίστανται ανεργικά (216). Έχει προταθεί ότι η χαμηλή συγγένεια των πολυαντιδραστικών Β κυττάρων ίσως συμβάλλει στην αποφυγή ανοχής (tolerance), μειώνοντας την ευαισθησία του BCR από την ενεργοποίηση του Ag και οδηγώντας προς διαφοροποίηση σε B-1 κύτταρα (222). Η έκφραση τέτοιων Ig από φυσιολογικά Β κύτταρα δεν επάγει ενδογενώς την ανάπτυξη ΧΛΛ, όμως η χαμηλής έντασης χρόνια διέγερση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παράταση της ζωής ενός αυτοαντιδραστικού Β κυττάρου και παρέχει έτσι ένα μεγάλο χρονικό περιθώριο στο οποίο μπορεί να συμβούν τα απαραίτητα γεγονότα για τη λευχαιμογένεση (216). Επιπλέον το γεγονός ότι τα αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα μπορούν ν' αποφύγουν την κλωνική απαλοιφή (clonal deletion) εκφράζοντας πολλαπλούς αντιγονικούς υποδοχείς πιθανόν σχετίζεται με την ανοσοπαθογένεια της ΧΛΛ, εφόσον και τα κύτταρα της Β-ΧΛΛ συχνά εμφανίζουν αποτυχία του αποκλεισμού αλληλομόρφου (220).

Τα Β κύτταρα της οριακής ζώνης έχουν προταθεί ως πρόδρομα κύτταρα των κυττάρων της ΧΛΛ. Στην οριακή ζώνη συγκεντρώνονται αυτοαντιδραστικοί κλώνοι μειωμένης αυτοαντιδραστικότητας που δε θα επιζούσαν αλλιώς σε άλλα ανατομικά διαμερίσματα (223). Β λεμφοκύτταρα που εκφράζουν διπλούς υποδοχείς από τους οποίους ο ένας είναι αυτοαντιδραστικός συγκεντρώνονται κατά προτίμηση στην οριακή ζώνη (217). Ο περιορισμός αυτών των εν μέρει αυτοαντιδραστικών Β κυττάρων σε αυτήν τη θέση αποτρέπει την διαφοροποίησή τους και την εξέλιξη τους σε πλήρως αυτοαντιδραστικά Β κύτταρα (224). Τα Β κύτταρα της οριακής ζώνης είναι υπεραντιδραστικά σε αντιγόνα και μιτογόνα και η οριακή ζώνη είναι πλούσια σε Β κύτταρα με ορισμένη ειδικότητα. Η μικρής συγγένειας χρόνια διέγερση των κυττάρων

της οριακής ζώνης που εκφράζουν πολυαντιδραστικά αυτοαντιγόνα μπορεί να οδηγεί σε λευχαιμικό μετασχηματισμό (217,232).

## **B. ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ – ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗΣ**

Ο CD71 έχει ανιχνευθεί στην κυτταρική επιφάνεια των διαιρούμενων κυττάρων σε όλες τις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές καθώς και σε παθολογικά μυελικά και λεμφικά κύτταρα. Γενικά, εκφράζεται ισχυρότερα στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, με πρότυπο έκφρασης που προφανώς σχετίζεται με τις διαφορετικές απαιτήσεις των κυττάρων για σίδηρο (124, 127, 130, 225). Ο υποδοχέας τρανσφερρίνης χρειάζεται τόσο για τη φυσιολογική ερυθροποίηση όσο και για τον πολλαπλασιασμό και/ή την ωρίμανση των υπολοίπων κυτταρικών τύπων του αιμοποιητικού συστήματος. Η ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων καθυστερεί σημαντικά απουσία του TfR. Ο TfR έχει διακριτό ρόλο στην ανάπτυξη των T- και B- λεμφοκυττάρων. Όταν απουσιάζει ο TfR, η ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων μπορεί να εξελίσσεται ομαλά, μολονότι φαίνεται να καθυστερεί ο πολλαπλασιασμός τους, ενώ αντίθετα, η διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων σταματά πολύ νωρίς κατά την ωρίμανση. Αυτό υποδηλώνει ότι ο TfR ίσως παίζει και κάποιον άλλο ρόλο στην ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων εκτός από την μεταφορά του σιδήρου, πιθανόν συμμετέχοντας σε διεργασίες μεταβίβασης σήματος (133). Ο TfR μόλις ανιχνεύεται σε ίχνη στην κυτταρική επιφάνεια των ήρεμων και ώριμων T- και B- λεμφοκυττάρων, αλλά επάγεται ισχυρά κατά την αντιγονική και μιτωτική διέγερση, ίσως για να υποστηρίξει τις ανάγκες σε σίδηρο των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (127, 225). Ανάλογη είναι και η δράση των αντισωμάτων εναντίον του TfR, τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων περιφερικών λεμφοκυττάρων (133, 142).

Πρόσφατα, οι Damle και συνεργάτες απέδειξαν ότι σε πολλές περιπτώσεις B-χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας τα λευχαιμικά κύτταρα διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στο φαινότυπο της κυτταρικής μεμβράνης τους από φυσιολογικά CD5 (+) B-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπων ανάλογης ηλικίας (100). Σε όλους τους ασθενείς με ΧΛΛ, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων, τα λευχαιμικά κύτταρα είχαν φαινότυπο ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων: συγκεκριμένα, εμφάνιζαν υπερέκφραση ποικίλων δεικτών ενεργοποίησης και

καθολική έκφραση του CD27, που θεωρείται από πολλούς ως δείκτης των Β-λεμφοκυττάρων μνήμης (100, 107, 238).

Στην παρούσα μελέτη, η ανεύρεση υψηλής και ομοιόμορφης έκφρασης του CD71 (μαζί με άλλους δείκτες ενεργοποίησης, π.χ. CD23, CD27 και συχνά CD69) στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων με ΧΛΛ, τόσο στον μεταλλαγμένο όσο και στον αμετάλλακτο υποτύπο, πιθανόν ερμηνεύεται ως επιπλέον ένδειξη για την ενεργοποιημένη κατάσταση των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων. Αυτό δεν είναι παράδοξο, καθώς με βάση πρόσφατες πειραματικές ενδείξεις τα κύτταρα της ΧΛΛ (τόσο μεταλλαγμένα όσο και αμετάλλακτα) είναι κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνο(100,103,214). Κλασικά, η εισαγωγή σωματικών μεταλλάξεων στο βλαστικό κέντρο προκαλείται από τη διέγερση του υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων μετά την πρόσδεση του αντιγόνου (59, 214). Ενδείξεις για αναγνώριση αντιγόνου από το κλωνογενές Β-λεμφοκύτταρο της ΧΛΛ υπάρχουν και στις δύο υποκατηγορίες (μεταλλαγμένη/αμετάλλακτη): πρόκειται για την επιλεκτική έκφραση γονιδίων IGHV (συχνά με διακριτές αλληλουχίες CDR3) (103, 214, 226). Σε αυτά τα πλαίσια, η μελέτη μας προσφέρει επιπρόσθετες φαινοτυπικές ενδείξεις που στηρίζουν την άποψη ότι όλες οι περιπτώσεις ΧΛΛ προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνο (και συνεπώς δεν είναι παρθένα).

Στα ενεργοποιημένα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα, ο CD69 επάγεται γρηγορότερα από τον CD71, δηλαδή είναι δείκτης πρώιμης ενεργοποίησης. Συνεπώς, η στατιστικώς συχνότερη έκφραση του CD69 στον αμετάλλακτο υποτύπο υποστηρίζει την άποψη ότι σε αυτόν περιλαμβάνονται περιπτώσεις των οποίων το κλωνογενές κύτταρο αντιστοιχεί σε πρώιμο στάδιο ενεργοποίησης(100). Το πρότυπο έκφρασης του CD69 καθώς και ο πιθανός ρόλος του στη μεταβίβαση σήματος στα λεμφοκύτταρα καταδεικνύει τη σπουδαιότητα της δράσης του CD69 στη βιολογία των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων. Στο ίδιο πλαίσιο, οι D'Arcena και συνεργάτες πρόσφατα ανέφεραν ότι η έκφραση του CD69 στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία σχετίζεται με κακή πρόγνωση (227).

Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ο έλεγχος της έκφρασης του TfR ασκείται κυρίως σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου μέσω των αλληλουχιών απάντησης στο σίδηρο (IREs) που εντοπίζονται στην 3'αμετάφραστη περιοχή του mRNA του TfR (127, 130, 225, 231). Οι αλληλουχίες IREs αναγνωρίζονται από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του σιδήρου (IRPs), που προσδένονται στα IREs του mRNA του TfR, όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του σιδήρου είναι χαμηλή, ώστε να αποφευχθεί η διάσπαση του mRNA. Τα ερυθροκύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που υπερισχύουν του ελέγχου



IRE/IRP: έτσι κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης στην ερυθρά σειρά, η έκφραση του TfR ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (127, 130, 225). Τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν στον έλεγχο της έκφρασης του TfR1 στα λεμφοκύτταρα (τόσο φυσιολογικά όσο και κακοήθη) είναι περιορισμένα.

Στην παρούσα μελέτη, αλληλουχίες mRNA του TfR1 ενισχύθηκαν σε όλα τα δείγματα. Η ανάλυση με τη μέθοδο της συναγωνιστικής RT-PCR έδειξε ότι η έκφραση του mRNA του TfR1 παρουσίαζε μεγάλες αποκλίσεις. Αυτό το εύρημα, στα πλαίσια της σχεδόν οικουμηνικά υψηλής έκφρασης του CD71, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένδειξη για τη λειτουργία μετα-μεταγραφικών μηχανισμών στον έλεγχο της έκφρασης του TfR στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Αυτή η άποψη ενισχύεται επίσης από την ανεύρεση περιπτώσεων που εκφράζουν mRNA του TfR1 αλλά όχι και την αντίστοιχη πρωτεΐνη (CD71), καθώς και από την ύπαρξη περιπτώσεων που παρουσιάζουν χαμηλή ένταση φθορισμού του CD71 (Πίνακες III, IV και VI), υποδηλώνοντας ότι: (i) η παρουσία των mRNA μεταγράφων του TfR1 δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, (ii) ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων TfR1/CD71 στην επιφάνεια των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ δεν είναι πάντα ανάλογος προς τον αριθμό των mRNA μεταγράφων του TfR1. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται ότι η έκφραση του υποδοχέα TfR1 στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία ρυθμίζεται κυρίως σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Ο έλεγχος στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο παρέχει στο κύτταρο τη δυνατότητα να αυξάνει πολύ γρήγορα τη συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης και συνεπώς φαίνεται να είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για τη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην αποφυγή καταστροφής του κυττάρου (139). Ωστόσο, δεν αποκλείεται η πιθανότητα λειτουργίας άλλων μηχανισμών υπό ειδικές συνθήκες. Είναι αξιοσημείωτο ότι μια κυτταρική σειρά Β λεμφώματος χρησιμοποιεί ένα ειδικό σύστημα πρόσληψης του σιδήρου που δε στηρίζεται στην τρανσφερρίνη και επιτρέπει τη λήψη σιδήρου από άλατα σιδήρου, χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις ότι συντίθεται τρανσφερρίνη. Τα παραπάνω δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι τα κακοήθη λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα ν' ανταποκρίνονται στην έλλειψη σιδήρου με ποικίλους μηχανισμούς και ότι αυτοί οι μηχανισμοί πιθανόν σχετίζονται με την προέλευση των κυττάρων (235).

Ο TfR2 είναι ένας δεύτερος υποδοχέας ανθρώπινης τρανσφερρίνης με σημαντική ομολογία στην αλληλουχία του ως προς τον TfR1 στην εξωκυττάρια περιοχή (136). Μολονότι η έκφραση του mRNA του TfR2 αρχικά θεωρήθηκε ως ειδική για την ερυθρά σειρά, mRNA μτάγραφα του TfR2 ανιχνεύθηκαν σε αιμοποιητικά κύτταρα και άλλων κυτταρικών σειρών (π.χ., μυελικά κύτταρα) (136, 143-144). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδηλώνουν ότι τα Β λεμφοκύτταρα μπορούν πράγματι να



εκφράσουν mRNA του TfR2. Επιπλέον, η ισομορφή TfR2-β φαίνεται να επικρατεί σε σχέση με την α ισομορφή στα Β-λεμφοκύτταρα.

Τα παραπάνω συμφωνούν με προηγούμενα ευρήματα από τους Kawabata και συνεργάτες, οι οποίοι εξέτασαν με την τεχνική RT-PCR διάφορους ιστούς και διαπίστωσαν ότι η έκφραση της α-ισομορφής περιοριζόταν στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους πνεύμονες, στους μυς, στον προστάτη και στα μονοκύτταρα κύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ η β-ισομορφή εκφραζόταν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς που εξετάστηκαν (137).

Η έκφραση του TfR2 ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο από την αντίστοιχη του TfR1. Επειδή το mRNA του TfR2 δεν περιέχει IREs, η έκφρασή του δεν ρυθμίζεται από τα κυτταρικά επίπεδα του σιδήρου αλλά από μηχανισμούς κυτταρικής διαφοροποίησης (139). Ο ρόλος του TfR2 στην ανάπτυξη, επιβίωση και λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Πιθανόν μεσολαβεί στην πρόσληψη του σιδήρου, αλλά η συγγένεια πρόσδεσης TfR2-τρανσφερρίνης είναι πολύ χαμηλότερη από τη συγγένεια πρόσδεσης του TfR1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η προσλήψη του σιδήρου δεν είναι ούτε η κύρια ούτε η μόνη λειτουργία του TfR2. Η κατανομή του TfR2 σε διαφορετικούς ιστούς καταδεικνύει έναν δυναμικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, καθώς φαίνεται ν' ανιχνεύει τις ανάγκες του σώματος για σίδηρο ή να συμμετέχει σε πιο πολύπλοκους μηχανισμούς ανίχνευσης. Πρόσφατα, οι Robb και συνεργάτες του έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης TfR2 αυξάνουν από την ολοτρανσφερρίνη κατά ένα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, χωρίς αντίστοιχη αύξηση στα επίπεδα των TfR2 mRNA μεταγράφων (236). Ετσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η έκφραση του TfR2 ανταποκρίνεται άμεσα στο επίπεδο κορεσμού της τρανσφερρίνης. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο του TfR2 πάσχουν από αιμοχρωμάτωση και σιδήρωση του ήπατος, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο TfR2 κατέχει ρόλο-κλειδί στην ομοιοστασία του σιδήρου .

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των TfR1 και TfR2 έχει αποδειχθεί με *in vitro* μελέτες και υποστηρίζεται από τη συνεντόπιση των TfR1 και TfR2 *in vivo* (235-236). Η πρωτεΐνη HFE και η τρανσφερρίνη δεν εμποδίζουν τη σύνδεση TfR1-TfR2, εύρημα που υποδηλώνει ότι ο TfR2 συνδέεται σε διαφορετική θέση στον TfR1 σε σχέση με τη θέση πρόσδεσης που κατέχουν η HFE και η τρανσφερρίνη. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο υποδοχέων. Επειδή ο TfR2 δεν αλληλεπιδρά με την HFE και δεν ρυθμίζεται με βάση τις αλλαγές των επιπέδων του ενδοκυττάρου σιδήρου, η αλληλεπίδραση μεταξύ TfR1-TfR2 θα μπορούσε να λειτουργεί ως δυναμικός μηχανισμός για να ρυθμίζει τη λήψη σιδήρου κατά μοναδικό τρόπο, ίσως μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών. Επίσης, η ισομορφή

TfR2-α βοηθά την αύξηση των κυττάρων με ανεπάρκεια TfR1, γεγονός που υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο της ισομορφής TfR2-α στην κυτταρική αύξηση.

Η παρούσα εργασία προσφέρει δεδομένα για το λειτουργικό ρόλο του TfR2 στα κύτταρα της CLL. Μετάγραφα του TfR2 ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλα τα δείγματα CLL που ήταν αρνητικά για τον CD71 (11/12 δείγματα). Αναλυτικά, ένα δείγμα εξέφραζε μόνο mRNA της TfR2-α ισομορφής και δεν εξέφραζε καθόλου CD71, 6 δείγματα εξέφραζαν mRNA μόνο της TfR2-β ισομορφής, ενώ 4 δείγματα ήταν αρνητικά τόσο για TfR1 όσο και για TfR2 μετάγραφα. Μολονότι δεν διαθέτουμε στοιχεία για την έκφραση του TfR2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, δε θα ήταν παράλογο να υποθέσουμε ότι οι πρωτεΐνες μεταφοράς του σιδήρου κατά κάποιο τρόπο αλληλοσυμπληρώνονται στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα δείγματα που δεν εξέφραζαν CD71 ήταν θετικά για την έκφραση του TfR2 mRNA.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

- Αναδιατάξεις γενετικού τόπου IGK στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Αναλύσαμε αναδιατάξεις του γενετικού τόπου της κ-ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών σε 180 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) με κλωνοτυπική κ-ελαφριά αλυσίδα. Αναγνωρίστηκαν 21 λειτουργικά γονίδια IGKV με συχνότερα τα: IGKV3-20, IGKV1-39/1D-39, IGKV4-1, IGKV1-5, IGKV2-30 και IGKV1-8. Συχνότερο γονίδιο IGKJ σε αναδιατάξεις IGKV-J ήταν το IGKJ2 και ακολουθούσαν τα IGKJ1, IGKJ4, IGKJ3 και IGKJ5. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα αναδιάταξης με τα γονίδια IGKJ3-5 ανά γονίδιο IGKV. Το μήκος της περιοχής KCDR3 κυμαινόταν από 6 έως 11 αμινοξέα (διάμεση τιμή, 9). Νουκλεοτίδια ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 51.1% των αναδιατάξεων IGKV-J.

Ενενήντα αναδιατάξεις IGKV-J (50%) ήταν "αμετάλλακτες" ( $\geq 98\%$  ομολογία); 60/90 "αμετάλλακτες" αναδιατάξεις IGKV-J είχαν ομολογία 100%. Η κατανομή των γονιδίων IGKV σε αμετάλλακτες και μεταλλαγμένες αναδιατάξεις διέφερε σημαντικά. Παράλληλη ανάλυση των μεταλλάξεων στα γονίδια IGH/IGK Πραγματοποιήθηκε σε 175/180 περιπτώσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV συνδυάζονταν με μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGK και το αντίστροφο.

Οι αλληλουχίες της παρούσας μελέτης συγκρίθηκαν με αλληλουχίες από φυσιολογικά και αυτοαντιδραστικά κύτταρα από δημόσιες βάσεις δεδομένων. Η σχετική ανάλυση αποκάλυψε υποσύνολα ασθενών με ΧΛΛ με πολύ ομόλογες περιοχές CDR3 ("ομόλογα υποσύνολα"). Ειδικότερα: (i) έξι αναδιατάξεις IGKV2-30-IGKJ2 της παρούσας μελέτης (5/6 μεταλλαγμένες) είχαν σχεδόν ταυτόσημη, όξινη, "ΧΛΛ-ειδική" περιοχή KCDR3 (MQGT[H/Y]W[+/-P]PYT). Όλες οι αλληλουχίες συνδυάζονταν με βαριές αλυσίδες που εξέφραζαν γονίδια IGHV4. Οι 4/6 αναδιατάξεις IGKV-J σχετίζονταν με IGHV4-34 βαριές αλυσίδες με ομόλογη, βασική περιοχή HCDR3s μήκους 18-20 αμινοξέων (ii) 3 αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 της παρούσας μελέτης είχαν ταυτόσημη, όξινη, "ΧΛΛ-ειδική" περιοχή KCDR3 (QQSYSTPPYT). Όλες συνδυάζονταν με αμετάλλακτες βαριές αλυσίδες που εξέφραζαν γονίδια IGHV1. Επίσης, 4 αμετάλλακτες αναδιατάξεις IGKV1-39/1D-39-IGKJ1/4 της παρούσας μελέτης είχαν σχεδόν ταυτόσημη, όξινη, "ΧΛΛ-ειδική" περιοχή KCDR3 [QQSYSTPL(P)T]. Οι 2/4 σχετίζονταν με αμετάλλακτες βαριές αλυσίδες που εξέφραζαν γονίδια IGHV4-39 (iii) 4 αναδιατάξεις IGKV1-5-IGKJ1/3 της παρούσας μελέτης (3/4 μεταλλαγμένες) είχαν σχεδόν ταυτόσημη, όξινη, "ΧΛΛ-ειδική" περιοχή KCDR3 KCDR3 (QQYNSYP[W/F]T).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τονίζουν τη στενή σχέση ΧΛΛ-αυτοανοσίας και παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις για το ρόλο του αντιγόνου στην παθογένεση της ΧΛΛ.

- Ανάλυση των υποδοχέων της τρανσφερρίνης στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Μελετήσαμε την έκφραση των TfR1/TfR2 mRNA με RT-PCR και την έκφραση του CD71 σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής σε 118 ασθενείς με ΧΛΛ. Ενενήντα πέντε από 109 δείγματα ήταν θετικά για το CD71: το ποσοστό των CD71 (+) νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων γενικά ήταν υψηλό (>90%, 23.3-100.0%). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD71 και της ανεύρεσης μεταλλαγμένων γονιδίων IgH. Μετάγραφα TfR1 ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς. Αντίθετα, mRNA μετάγραφα TfR2-α και 2-β δεν ανιχνεύθηκαν σε 50/102 ασθενείς και 9/109 ασθενείς, αντιστοίχως. Τα επίπεδα του TfR1 mRNA καθορίστηκαν σε 111/118 ασθενείς με ποσοτική RT-PCR (τουλάχιστον τρεις αντιδράσεις/δείγμα). Διακρίθηκαν τρεις ομάδες (A-C, διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ διαδοχικών ομάδων: 1 log): (1) ομάδα I (μέγιστη συγκέντρωση), 27 ασθενείς (2) ομάδα B, 57 ασθενείς (3) ομάδα C, 27 ασθενείς. Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του TfR mRNA, της συγκέντρωσης των μεταγράφων TfR1 και TfR2 mRNA και του status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Επίσης, η έκφραση των TfR1/2 mRNA δεν εμφάνισε συσχέτιση με καμία άλλη φαινοτυπική μεταβλητή (CD38, CD69). Η σχεδόν οικουμενική, υψηλή έκφραση CD71 με δεδομένη τη μεταβλητότητα των επιπέδων TfR1 mRNA πιθανόν οφείλεται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Η τάση για έκφραση TfR2-α σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα TfR1 mRNA πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Τέλος, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν λειτουργική συνεργασία μεταξύ TfR1 και TfR2 στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ.

## SUMMARY

- IGK locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia

Immunoglobulin kappa (IGK) locus rearrangements were analyzed in 180  $\kappa$ -light chain (LC) expressing chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases. Twenty-one functional IGKV genes were identified in IGKV-J rearrangements; IGKV3-20 was the most frequent IGKV gene, followed by IGKV1-39/1D-39, IGKV4-1, IGKV1-5, IGKV2-30 and IGKV1-8. In IGKV-J sequences, IGKJ2 was the most frequent gene. IGKJ3-5 gene usage was observed in 55/176 rearrangements (31.3%). Important differences were observed among IGKV genes as regards frequency of rearrangement to IGKJ3-5 genes. For most IGKV genes, similar patterns of recombination were observed in sequences from normal and autoreactive cells; nevertheless, "CLL-specific" patterns of recombination to IGKJ1-2 vs IGKJ3-5 were identified for some IGKV genes. The KCDR3 region ranged in length from 6-11 amino acids (median, 9). Evidence for TdT activity was identified in 51.1% of IGKV-J rearrangements.

Ninety out of 180 IGKV-J rearrangements (50%) (53.1%) were "unmutated" ( $\geq 98\%$  homology to the closest germline gene); 60/90 "unmutated" IGKV-J sequences had 100% homology. Among "mutated" rearrangements, 26/90 IGKV sequences had less than 95% homology. The distribution of individual IGKV genes among mutated and unmutated rearrangements varied significantly. Parallel assessment of IGH and IGK mutation status was possible for 175/180  $\kappa$ -CLL cases. In most cases, mutated IGHV rearrangements were associated with mutated IGK rearrangements and vice versa.

Each B-CLL-derived IGKV-J sequence in our database was compared with every B-CLL and MM sequence of our collection as well as with sequences from normal and autoreactive cells in public IGV cDNA gene databases. This analysis identified subsets of very similar sequences with closely homologous CDR3 regions ("homologous subsets") comprising of predominantly or exclusively CLL sequences.

Specifically: (i) six IGKV2-30-IGKJ2 CLL sequences from our series (5/6 mutated) had an almost identical, acidic, "CLL-specific" KCDR3 (MQGT[H/Y]W[+/-P]PYT); all six sequences were associated with IGHV4-heavy chains (HCs); 4/6 were associated with IGHV4-34 HCs with homologous, basic HCDR3s of 18-20 aminoacids; (ii) 3 unmutated IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 CLL rearrangements from our series had identical, "CLL-specific", acidic, 10 aminoacid-long KCDR3 (QQSYSTPPYT), all associated with unmutated IGHV1-HCs. Four unmutated IGKV1-39/1D-39-IGKJ1/4 CLL sequences with very similar, acidic KCDR3 [QQSYSTPL(P)T]; 2/4 were

associated with unmutated, IGHV4-39 HCs with homologous, basic HCDR3s of 19 aminoacids; (iii) 4 IGKV1-5-IGKJ1/3 CLL sequences from our series (3 unmutated) had an almost identical, "CLL-specific", acidic KCDR3 (QQYNSYP[W/F]T); 2/4 were associated with unmutated IGHV4-39 HCs with acidic, non-homologous HCDR3s.

The results of the present study emphasize the close relationship between autoreactivity and CLL with similarities both in IGV repertoire and CDR3 formation, alluding to a different pathway of B cell activation, not involving a classical GC reaction response to T-independent antigens.

- Transferrin receptor analysis in chronic lymphocytic leukemia

Transferrin receptor (TfR)-1 and -2 mRNA expression and TfR1 (CD71) protein expression was analyzed in peripheral blood samples of 118 CLL patients. Ninety-five out of 109 analyzed cases expressed CD71 (87.2%). The percentage of CD71-expressing neoplastic cells was generally high. Statistical analysis failed to identify any association between CD71 expression and IGHV mutation status. TfR1 mRNA sequences were amplified in all tested samples. In contrast, TfR2-alpha mRNA was not detected in 50/102 analyzed cases (49%); TfR2-beta cDNA sequences were amplified in 100/109 analyzed cases, of which 63/100 carried mutated IGHV genes and 37/100 unmutated IGHV genes. TfR1 mRNA levels were determined in 111/118 cases; samples were classified into three groups (A-C, each representing a one-log difference in concentration); group A (highest expression): 27 cases; group B: 57 cases; group C: 27 cases. Compared to groups A and B, group C (lowest TfR1 mRNA expression) included fewer IGHV mutated cases (13/27; 48%); a similar trend for TfR2 mRNA isoform expression was discerned. Statistically significant associations were not identified between TfR mRNA expression, TfR1 transcript levels and CD71 (TfR1 protein) positivity; a similar lack of association was discerned for both TfR1 and TfR2 mRNA expression and IGHV mutation status. Finally, TfR1/2 mRNA expression was not associated with any of the other phenotypic variables (CD38, CD69 expression) evaluated in the present study.

In conclusion, the almost ubiquitous CD71 expression regardless of IGH mutation status provides further evidence that the surface membrane phenotypes of CLL cells reflect their antigenic and activation experiences. High CD71 expression in the context of widely divergent TfR1 mRNA levels alludes to posttranscriptional control of TfR1 gene expression in CLL. CLL malignant cells were found to express TfR2 mRNA, indicating a possible functional complementation and cooperation between TfR1 and TfR2 proteins in CLL.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuby J, Immunology 4th edition, W.H. Freeman and Company, 2001.
2. Sheriff P, Sheriff S. Antibody-Antigen Complexes, Annu Rev Biochem 1990; 59: 493-517
3. Stites DP, Terr A. Medical immunology, 9th edition, Appleton and Lange, 1997
4. Kuznetsov G, Nigam SK. Folding of secretory and membrane proteins. N Engl J Med 1998; 339: 1688-1695.
5. Rolink A, Melchers F. Molecular and Cellular Origins of B Lymphocyte Diversity. Cell 1991; 66: 1081-94
6. Kabat E, Wu T, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest. Bethesda MD. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991
7. Grawunder U, West R, Lieber M: Antigen receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol 1998; 10: 172-180
8. Lefranc M-P and Lefranc G. The immunoglobulin FactsBook. Academic Press, London, 2001
9. Zachau H. Immunoglobulin  $\kappa$  Genes of Human and Mouse. Chapter 3 in: Molecular Biology of B cells (eds: Honjo T, Alt F, Neuberger M). Academic Press, 2004
10. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. Exp Clin Immunogenet. 2001;18:161-174
11. Scaviner D, Barbie V, Ruiz M, Lefranc MP. Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions. Exp Clin Immunogenet. 1999;16:234-240
12. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S et al. Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the V $\kappa$  genes. Eur J Immunol. 2001;31:1017-1028
13. Brauninger A, Goossens T, Rajewsky K, Kuppers R. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. Eur J Immunol. 2001;31:3631-3637
14. Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. Exp Clin Immunogenet. 1998;15:171-183
15. Klobeck H, Zachau H. The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. Nucleic Acids Res. 1986. 14: 4591-4603.

16. Hieter P, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P. Human immunoglobulin  $\kappa$  light-chain genes are deleted or rearranged in  $\lambda$ -producing B cells. *Nature* 1981. 290: 368–372.
17. Siminovitch K, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer S. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* 1985. 316: 260–262.
18. Retter MW, Nemazee D. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J. Exp. Med.* 1998; 188:1231–1238
19. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:890-899.
20. Daitch LE, Moore MW, Persiani DM, Durdik JM, Selsing E. Transcription and recombination of the murine RS element. *J. Immunol.* 1992; 149:832–840
21. Lewis SM. The Mechanism of V(D)J Joining: Lessons from Molecular, Immunological, and comparative Analyses. *Adv Immunol* 1994; 56: 27-150
22. Jones JM, Gellert M. Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination *EMBO J.* 2002; 21: 4162–4171
23. O'Brien DP, Oltz EM, Van Ness BG. Coordinate transcription and V(D)J recombination of the kappa immunoglobulin light-chain locus: NF-kappaB-dependent and -independent pathways of activation. *Mol Cell Biol.* 1998; 67: 315-382
24. Ramsden DA, Baetz K, Wu G. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res.* 1997; 22:1785–1796.
25. Okamura H, Rao A. Transcriptional regulation in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 239-243
26. Yu K, Taghva A, Lieber MR. The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain VH elements by the RAG complex: implications for the immune repertoire. *J Biol Chem.* 2002; 277: 5040-5046
27. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:495-527.
28. Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:17-50
29. Nadel B, Feeney AJ. Nucleotide Deletion and P Addition in V(D)J Recombination: a Determinant Role of the Coding-End Sequence. *Mol Cell Biol.* 1997;17: 3768–3778
30. Nemazee D, Hogquist KA. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:182-189

31. Dunda O, Corcos D. Recombining sequence recombination in normal kappa-chain-expressing B cells. *J. Immunol.* 1997;159: 4362–4366
32. Magari M, Sawatari T, Kawano Y, Cascalho M, Wabl M, Kanayama N et al. Contribution of light chain rearrangement in peripheral B cells to the generation of high affinity antibodies. *Eur J Immunol* 2002 ; 32:957-966.
33. Tuaille N, Capra JD. Evidence That Terminal Deoxynucleotidyltransferase Expression Plays a Role in Ig Heavy Chain Gene Segment Utilization, *J Immunol.* 2000; 164: 6387-97.
34. Zhang Z, Wu X, Limbaugh BH, Bridges SL Jr. Expression of recombination-activating genes and terminal deoxynucleotidyl transferase and secondary rearrangement of immunoglobulin  $\kappa$  light chains in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2275-2284.
35. Sadosky M. Rag proteins in VDJ recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 1399-1409
36. Carsetti R. The Development of B Cells in the Bone Marrow Is Controlled by the Balance Between Cell-autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment, *J Exp Med.* 2000;191: 5-8.
37. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev.* 2004; 97:206-218
38. Goldmit M, Schlissel M, Cedar H, Bergman Y. Differential accessibility at the kappa chain locus plays a role in allelic exclusion. *EMBO J.* 2002;21:5255-5261
39. Liang HE, Hsu LY, Cado D, Schlissel MS. Variegated transcriptional activation of the immunoglobulin kappa locus in pre-B cells contributes to the allelic exclusion of light-chain expression. *Cell.* 2004;118:19-29
40. Mostoslavsky R, Singh N, Tenzen T, Goldmit M, Gabay C, Elizur S et al. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature.* 2001;414:221-225
41. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways, *Annu Rev Immunol.* 2001;19:595-621.
42. Schebesta M, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:216-223
43. Burrows PD, Stephan RP, Wang YH, Lassoued K, Zhang Z, Cooper MD. The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin Immunol* 2002;14:343–349.
44. Defrance T, Casamayor-Palleja M, Krammer PH. The life and death of a B cell. *Adv Cancer Res.* 2002;86:195-225

45. Fang T, Smith BP, Roman CA. Conventional and surrogate light chains differentially regulate Ig mu and Dmu heavy chain maturation and surface expression. *J Immunol.* 2001;167(7):3846-57
46. Medina C.A., Teale J.M. 1993. Restricted  $\kappa$  Chain Expression in Early Ontogeny: Biased Utilization of Exons and Preferential V $\kappa$ J $\kappa$  Recombinations *J. Exp. Med.* 177:1317-1330
47. Meffre E, Chiorazzi M, Nussenzweig MC. Circulating human B cells that express surrogate light chains display a unique antibody repertoire. *J Immunol.* 2001;167:2151-2156
48. Meffre E, Davis E, Schiff C, Cunningham-Rundles C, Ivashkiv LB, Staudt LM et al. Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nat Immunol.* 2000;1:207-213
49. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993; 177:1009-1020
50. Ohmori H, Hikida M. Expression and function of recombination activating genes in mature B cells. *Crit Rev Immunol.* 1998;18:221-235
51. Nussenzweig MC. Immune receptor editing: revise and select. *Cell* 1998; 95:875-878
52. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;301: 1318-1322
53. McHeyzer-Williams L, Driver D, McHeyzer-Williams M. Germinal center reaction, *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 52–59
54. Belessi C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Zoi K, Papadaki T, Kosmas C. Somatic hypermutation targeting to intrinsic hotspots of immunoglobulin genes in follicular lymphoma and multiple myeloma. *Leukemia.* 2001;15:1772-1778
55. Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med.* 2003;197:1291-1296
56. French DL, Laskov R, Scharff M. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 1989; 244: 1152-1157.
57. Friedberg EC, Wagner R, Radman M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science.* 2002; 296:1627-1630
58. Bross L, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T, Jacobs H. DNA double-strand breaks: prior to but not sufficient in targeting hypermutation. *J Exp Med.* 2002;195:1187-1192

59. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. 2002;109 Suppl:S35-44
60. van Es J, Gmelig Meyling F, Logtenberg T. High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B-cell repertoire. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2761-2764.
61. Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS. Codon bias targets mutation. *Nature* 1995; 376: 732.
62. Jacobs H, Bross L. Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:208-218
63. Jacobs H, Rajewsky K, Fukita Y, Bross L. Indirect and direct evidence for DNA double-strand breaks in hypermutating immunoglobulin genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:119-125
64. Kosmas C, Stamatopoulos K, Papadaki T, Belessi C, Yataganas X, Anagnostou D et al. Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. *Immunol Rev*. 1998;162:281-292
65. Michael N, Martin TE, Nicolae D, Kim N, Padjen K, Zhan P et al. Effects of sequence and structure on the hypermutability of immunoglobulin genes. *Immunity*. 2002;16:123-134
66. Milstein C, Neuberger MS, Staden R. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 8791-8794
67. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH, Brissinck J, Schots R, Thielemans K. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol*. 1999;107:625-640
68. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11816-11821
69. Sale JE, Bemark M, Williams GT, Jolly CJ, Ehrenstein MR, Rada C et al. In vivo and in vitro studies of immunoglobulin gene somatic hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356:21-28
70. Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist FF, de Saint Basile GG et al. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1166-1170

71. Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgVH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 1994; 15: 367–373.
72. Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2385–2388.
73. Neuberger NS, Ehrenstein MR, Klis N, Jolly CJ, Ye'lamos J, Rada C et al. Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev* 1998; 162: 107–116.
74. Reynaud CA, Aoufouchi S, Faili A, Weill JC. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol.* 2003;4:631-638
75. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 2002;23:31-39
76. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular Mechanism of class switch recombination: Linkage with Somatic Hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 2002, 20:165-96.
77. Okazaki I, Yoshikawa K, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. Activation-induced cytidine deaminase links class switch recombination and somatic hypermutation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;987:1-8
78. Tian M, Alt FW. RNA editing meets DNA shuffling. *Nature.* 2000; 407:31: 33
79. Ramiro AR, Stavropoulos P, Jankovic M, Nussenzweig MC. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol.* 2003; 4: 452-456
80. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975; 46:2 19-234
81. Binet J-L, Leporier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1977; 40: 855-864.
82. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H. The serum  $\beta$ 2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1995;86 (suppl 1): 606a.
83. Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1997;27:523-532.
84. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: The importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol.* 1989;72:141-147.



85. Damle RN, Fais F, Wasil T. B-cell patients can be divided into two distinct clinical categories based on CD38 expression and IgV gene mutation status. *Blood*. 1998;92:431a.
86. 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
87. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK et al. expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99:1023-1029
88. Crespo M, Bosch F, Villamor N. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 48: 1764-1775.
89. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910-1916
90. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36:211-223
91. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002;100:1177-1184
92. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002;16:993-1007
93. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold A, Dohner H, Lichter P. 1999. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:748–53
94. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 24–27
95. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1404–1409
96. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;20:5580-5594

97. Dyer MJ, Oscier DG. The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:973-984
98. Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; 15: 288–294
99. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102:1515-1525
100. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002;99:4087-4093
101. Hamblin TJ, Davis Z, Oscier DG. In chronic lymphocytic leukemias germline configuration of immunoglobulin heavy chain genes is associated with a more aggressive form of the disease. *Blood*. 1998;92(suppl 1):515
102. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99:2262-2264
103. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: Lessons Learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:841-894
104. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003; 101: 1262-1269.
105. Chiorazzi N, Ferrarini M. Immunoglobulin variable region gene characteristics and surface membrane phenotype define B-CLL subgroups with distinct clinical courses. *Blood* 2002; 100: 726-769.
106. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27C B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 2073–79
107. Agematsu K, Nagumo H, Shinozaki K, Hokibara S, Yasui K. Absence of IgD-CD27(C) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Clin. Invest*. 1998; 102: 853–60
108. Ranheim EA, Cantwell MJ, Kipps TJ. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1995; 85:3556–3565

109. Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 301-304.
110. Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F. CD38 expression distinguishes two groups of Bcell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 1996; 88:1365–74
111. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847
112. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*. 2004;103:375-382
113. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-1638
114. Rosenwald A, Staudt LM. Clinical translation of gene expression profiling in lymphomas and leukemias. *Semin Oncol*. 2002;29:258-263
115. Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 2992; 296:1641–1642
116. Carey GB, Donjerkovic D, Mueller CM, Liu S, Hinshaw JA. B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. *Immunol. Rev* 2000; 176:105–115
117. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1410-1416
118. Norvell A, Monroe JG. Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J Immunol*. 1996; 156:1328–1332
119. Brink R, Goodnow CC, Crosbie J, Adams J, Eris J. Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J. Exp. Med*. 1992; 176: 991–1005
120. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational

- status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:1087-1093
121. Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;101:4029-4032.
  122. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992; 71: 649-653
  123. Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*. 1991; 266: 15790-15796.
  124. Brissot P, Troadec MB, Loreal O. The clinical relevance of new insights in iron transport and metabolism. *Curr Hematol Rep* 2004; 3: 107-115.
  125. Kuhn LC. Molecular regulation of iron proteins. *Baillieres Clin Haematol* 1994; 7: 763-785.
  126. Lash A, Saleem A. Iron metabolism and its regulation. A review. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25: 20-30.
  127. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 1-87.
  128. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1331: 1-40.
  129. Park N, Schaeffer E, Sidoli A, Baralle FE, Cohen GN, Zakin MM. Organization of the human transferrin receptor gene: direct evidence that it originated by gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 82: 3149-3153.
  130. Richardson DR. Mysteries of the transferrin-transferrin receptor 1 interaction uncovered. *Cell* 2004; 116: 483-485.
  131. Testa U, Pelosi E, Peschle C. The transferrin receptor. *Crit Rev Oncol* 2000; 4: 241-276.
  132. Theil EC. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 1990; 265: 4771-4774.
  133. Ned RM, Swat W, Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood* 2003; 102: 3711-3718.
  134. Das Gupta A, Shah VI. Correlation of transferrin receptor expression with histologic grade and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Pathol* 1990; 4: 37-41.
  135. Inoue T, Cavanaugh PG, Steck PA, Brunner N, Nicolson GL. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human

mammary carcinoma lines of different metastatic potential. *J Cell Physiol* 1992; 156: 212-217.

136. Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999; 274: 20826-20832.
137. Kawabata H, Nakamaki T, Ikonomi P, Smith RD, Germain RS, Koeffler HP. Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* 2001; 98: 2714-2719.
138. Kawabata H, Germain RS., Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 16618-16625.
139. Subramaniam VN, Summerville L, Wallace DF. Molecular and cellular characterization of Transferrin receptor 2. *Cell Biochem Biophys* 2002; 36: 235-239.
140. Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, Greaves MF. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1993; (8323): 498-501.
141. Trinder D, Morgan E. Inhibition of uptake of transferrin-bound iron by human hepatoma cells by nontransferrin-bound iron. *Hepatology* 1997; 26: 691-698.
142. Seligman PA, Kovar J, Schleicher RB, Gelfand EW. Transferrin-independent iron uptake supports B lymphocyte growth. *Blood* 1991; 78: 1526-1531.
143. Kollia P, Samara M, Stamatopoulos K, Belessi C, Stavroyianni N, Tsompanakou A et al. Molecular evidence for transferrin receptor 2 expression in all FAB subtypes of acute myeloid leukemia. *Leuk Research* 2003; 27:1101-1103.
144. Kollia P, Stavroyianni N, Stamatopoulos K, Zoi K, Viniou N, Mantzourani M et al. Molecular analysis of transferrin receptor mRNA expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 115: 19-24.
145. Chan RY, Seiser C, Schulman HM, Kuhn LC, Ponka P. Regulation of transferrin receptor mRNA expression. Distinct regulatory features in erythroid cells. *Eur J Biochem* 1993; 220: 683-692.
146. Chan RY, Ponka P, Schulman HM. Transferrin-receptor-independent but iron-dependent proliferation of variant Chinese hamster ovary cell. *Exper Cell Res*, 1992, 202: 326-336.
147. Vogt TM, Blackwell AD, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Enns CA. Heterotypic interactions between transferrin receptor and transferrin receptor 2. *Blood*.2003;101:2008-2014

148. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1988; 162: 156-159.
149. Stavroyianni N, Belessi C, Stamatopoulos K, Kosmas C, Paterakis G, Abazis D et al. Expression of recombination activating genes-1 and-2 immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in acute myeloid leukemia: evaluation of biological and clinical significance in a series of 76 uniformly treated patients and review of the literature. *Haematologica*. 2003;88:268-274
150. Sanger F, Micklem S, Culson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 1975; 74: 5463-5467.
151. Lefranc MP, Giudicelli V, Kaas Q, Duprat E, Jabado-Michaloud J, Scaviner D et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res*. 2005;33 Database Issue:D593-597
152. Lefranc M-P. IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia*. 2003; 17: 260-266
153. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:307-310
154. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18:161-174
155. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001; 18:100-116
156. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18:242-254
157. Pommie C, Levadoux S, Sabatier R, Lefranc G, Lefranc MP. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J Mol Recognit*. 2004; 17:17-32
158. Lossos IS, Tibshirani R, Narasimhan B, Levy R. The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol*. 2000; 165: 5122-5126
159. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002;48:1178-1185
160. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30:503-512
161. Cross N. Quantitative PCR techniques and applications. *Br J Haematol* 1995; 89: 693-697.
162. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002;8:257-260



163. Ong YL, Irvine A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology*. 2002;7:59-67
164. Gabert J, Beillard E . Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17: 2318-2357
165. Lossos IS. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies, *Leukemia* 2003; 17:789-795
166. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia* 2003;17,1013-1034
167. Beillard E. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' RQ-PCR-A Europe against cancer program, *Leukemia* 2003; 17:2474-2486
168. de Wildt RM, Hoet RM, van Venrooij WJ, Tomlinson IM, Winter G. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *J Mol Biol*. 1999; 285: 895-901
169. Juul L, Hougs L, Andersen V, Svejgaard A, Barington T. The normally expressed kappa immunoglobulin light chain gene repertoire and somatic mutations studied by single-sided specific polymerase chain reaction (PCR); frequent occurrence of features often assigned to autoimmunity. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:194-203
170. Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest*. 1997;99:1614-1627
171. Ignatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The creation of diversity in the human immunoglobulin V(lambda) repertoire. *J Mol Biol*. 1997;268:69-77
172. Ignatovich O, Tomlinson IM, Popov AV, Bruggemann M, Winter G. Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin Vlambda repertoire. *J Mol Biol*. 1999;294:457-465
173. Farner NL, Dorner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J Immunol*. 1999;162:2137-2145
174. Brezinschek HP, Foster SJ, Dorner T, Brezinschek RI, Lipsky PE. Pairing of variable heavy and variable kappa chains in individual naive and memory B cells. *J Immunol*. 1998;160:4762-4767

175. Feeney AJ, Lugo G, Escuro G. Human cord blood kappa repertoire. *J Immunol.* 1997;158:3761-3768
176. Girschick HJ, Lipsky PE. The kappa gene repertoire of human neonatal B cells. *Mol Immunol.* 2002;38:1113-1127
177. Belessi C, Stamatopoulos K, Hatzi K, Hadzidimitriou A, Marantidou F, Smilevska T et al. Analysis of Non-Expressed IGK locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia Indicates a role for secondary rearrangements in shaping the expressed immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004; 104 (suppl.1): 178a.
178. Tomlinson IM, Cox E, Gherardi AM, Lesk J, Chothia C. The structural repertoire of the human Vk domain. *EMBO J.* 1995; 14:4628–4638.
179. Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science.* 2001;291:1541-1544
180. Martin D, Huang RQ, LeBien T, Van Ness B. Induced rearrangement of kappa genes in the BLIN-1 human pre-B cell line correlates with germline J-C kappa and V kappa transcription. *J Exp Med.* 1991;173:639-645
181. Bridges SL, Lee S, Johnson M. Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin k light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals. *J Clin Invest.* 1995; 96: 831–841
182. Barrios Y, Jirholt P, Ohlin M. Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. *J Mol Recognit.* 2004;17:332-338
183. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 2000;13:37-45
184. Morea V, Tramontano A, Rustici M, Chothia C, Lesk AM. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1998;275:269-294
185. Shiokawa S, Mortari F, Lima JO, Nunez C, Bertrand FE, 3rd, Kirkham PM et al. IgM heavy chain complementarity-determining region 3 diversity is constrained by genetic and somatic mechanisms until two months after birth. *J Immunol.* 1999;162:6060-6070
186. Zemlin M, Bauer K, Hummel M, Pfeiffer S, Devers S, Zemlin C et al. The diversity of rearranged immunoglobulin heavy chain variable region genes in peripheral blood B cells of preterm infants is restricted by short third complementarity-determining regions but not by limited gene segment usage. *Blood.* 2001;97:1511-1513

187. Rosner K, Winter DB, Tarone RE, Skovgaard GL, Bohr VA, Gearhart PJ. Third complementarity-determining region of mutated VH immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P, and N components than non-mutated genes. *Immunology* 2001; 103:179-187
188. Lee SK, Song CH, Kim JB, Chwae YJ, Choi IH, Bridges SL, Jr., Koopman WJ, Schroeder HW, Jr. Enhanced expression of immunoglobulin kappa light chains with unusually long CDR3 regions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1998;25:1067-1071
189. Bridges SL, Jr. Frequent N addition and clonal relatedness among immunoglobulin lambda light chains expressed in rheumatoid arthritis synovia and PBL, and the influence of V lambda gene segment utilization on CDR3 length. *Mol Med.* 1998;4:525-553
190. Capra DJ, Tuaille N. Evidence that terminal deoxynucleotidyltransferase expression plays a role in Ig heavy chain gene segment utilization, *J. Immunol.* 2000, 164:6387-6397
191. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 1993, 177:1165-1173.
192. Barbas SM, Ditzel HJ, Salonen EM, Yang WP, Silverman GJ, Burton DR. Human autoantibody recognition of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2529-2533
193. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia.* 2003;17:2385-2391
194. Moyes SP, Maini RN, Mageed RA. Differential use of immunoglobulin light chain genes and B lymphocyte expansion at sites of disease in rheumatoid arthritis (RA) compared with circulating B lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1998;113:276-288
195. Moyes SP, Brown CM, Scott BB, Maini RN, Mageed RA. Analysis of V kappa genes in rheumatoid arthritis (RA) synovial B lymphocytes provides evidence for both polyclonal activation and antigen-driven selection. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:89-98
196. Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol.* 2002;81:299-303
197. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezso P, Magnac C, Michel A et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21:3928-3932
198. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly

- restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101:4952-4957
199. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105:1678-1685
200. Widhopf GF, 2nd, Kipps TJ. Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. 2001;166:95-102
201. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113:1008-1016
202. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 2004;104:2499-2504
203. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200:519-525
204. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;104:2879-2885
205. Pichurin P, Guo J, Yan X, Rapoport B, McLachlan SM. Human monoclonal autoantibodies to B-cell epitopes outside the thyroid peroxidase autoantibody immunodominant region. *Thyroid*. 2001;11:301-313
206. Portolano S, McLachlan SM, Rapoport B. High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies. *J Immunol*. 1993;151:2839-2851
207. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell: a tentative model. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18:849-862
208. de Wildt RM, Tomlinson IM, van Venrooij WJ, Winter G, Hoet RM. Comparable heavy and light chain pairings in normal and systemic lupus erythematosus IgG(+) B cells. *Eur J Immunol*. 2000;30:254-261
209. Borche L, Lim A, Binet JL, Dighiero G. Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood*. 1990;76:562-569

210. Chazenbalk GD, Portolano S, Russo D, Hutchison JS, Rapoport B, McLachlan S. Human organ-specific autoimmune disease. Molecular cloning and expression of an autoantibody gene repertoire for a major autoantigen reveals an antigenic immunodominant region and restricted immunoglobulin gene usage in the target organ. *J Clin Invest.* 1993;92:62-74
211. Kipps TJ, Tomhave E, Chen PP, Carson DA. Autoantibody-associated kappa light chain variable region gene expressed in chronic lymphocytic leukemia with little or no somatic mutation. Implications for etiology and immunotherapy. *J Exp Med.* 1988;167:840-852
212. Rassenti LZ, Kipps TJ. Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1997;185:1435-1445
213. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR, Lichtman SM, Schulman P, Weiselberg LR, Chiorazzi N. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1989;169:255-268
214. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood.* 2004;103:4389-4395
215. Silberstein LE, George A, Durdik JM, Kipps TJ. The V4-34 encoded anti-i autoantibodies recognize a large subset of human and mouse B-cells. *Blood Cells Mol Dis.* 1996;22:126-138
216. Widhopf GF, 2nd, Brinson DC, Kipps TJ, Tighe H. Transgenic expression of a human polyreactive Ig expressed in chronic lymphocytic leukemia generates memory-type B cells that respond to nonspecific immune activation. *J Immunol.* 2004;172:2092-2099
217. Li, Y., H. Li, and M. Weigert, Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med*, 2002. 195(2): p. 181-8.
218. Rassenti LZ, Pratt LF, Chen PP, Carson DA, Kipps TJ. Autoantibody-encoding kappa L chain genes frequently rearranged in lambda L chain-expressing chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 1991;147:1060-1066
219. Song H, Cerny J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med.* 2003; 198:1923-1935
220. Mockridge CI, Chapman CJ, Spellerberg MB, Sheth B, Fleming TP, Isenberg DA, Stevenson FK. Sequence analysis of V(4-34)-encoded antibodies from single B cells of two patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 1998;114:129-136



221. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002 ; 2:323-335
222. Martin T, Blaison G, Levallois H, Pasquali JL. Molecular analysis of the V kappa III-J kappa junctional diversity of polyclonal rheumatoid factors during rheumatoid arthritis frequently reveals N addition. *Eur J Immunol.* 1992;22:1773-1779
223. Mateo MS, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Piris MA. Molecular heterogeneity of splenic marginal zone lymphomas: analysis of mutations in the 5' non-coding region of the bcl-6 gene. *Leukemia.* 2001; 15:628-634
224. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1331: 1-40.
225. Gurrieri C, McGuire P, Zan H, Yan XJ, Cerutti A, Albesiano E et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells can undergo somatic hypermutation and intraclonal immunoglobulin V(H)DJ(H) gene diversification. *J Exp Med.* 2002;196:629-639
226. D'Arena G, Musto P, Nunziata G, Cascavilla N, Savino L, Pistolese G. CD69 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic marker? *Haematologica* 2001; 86: 995-996.
227. Dighiero G. Perspectives in chronic lymphocytic leukemia biology and management. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004; 18: 927-943.
228. Dono M, Zupo S, Colombo M, Massara R, Gaidano G, Taborelli G, Ceppa P et al. The human marginal zone B cell. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 987:117-124
229. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:1515–25
230. Kuhn LC Molecular regulation of iron proteins. *Bailliere's Clinical Haematology* 1998; 7: 763-785.
231. Lopes-Carvalho T, Kearney JF. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev.* 2004; 197:192-205
232. Medeiros LJ, Picker LJ, Horning SJ., Warnke RA. Transferrin receptor expression in non-Hodgkin's lymphomas. Correlations with morphologic grade and survival. *Cancer* 1988; 61: 1844-1851.
233. Qian ZM, Tang PL. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Biochim Biophys Acta,* 1995; 1269: 205-214.



234. Seligman PA, Kovar J, Schleicher RB, Gelfand EW. Transferrin-independent iron uptake supports B lymphocyte growth. *Blood* 1991; 78: 1526-1531.
235. Trinder D, Baker E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 292-296.
236. Robb A, Wessling-Resnik M. regulation of transferrin receptor protein levels by transferrin. *Blood* 2004;104:4294-4299
237. van Oers MH, PalsST, Evers LM, van der Schoot CE, Koopman G. Expression and release of CD27 in human B-cell malignancies. *Blood* 1993; 82:3430–3436
238. Nakamaki T, Kawabata H, Saito B, Matsunawa M, Suzuki J, Adachi D et al. Elevated levels of transferrin receptor 2 mRNA, not transferrin receptor 1 mRNA, are associated with increased survival in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2004; 125(1):42-9