

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΟΣΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ
ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ**

ANNA ΒΑΡΔΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Βασικά στοιχεία ανοσολογίας.....	5
Δομή ανοσοσφαιρινών	6
Δομή T-κυτταρικών υποδοχέων.....	7
Πρωτεΐνες συμπλέγματος μείζονας ιστοσυμβατότητας.....	7
Γενετικοί τόποι ανοσοσφαιρινών	8
Γενετικός τόπος βαριάς αλυσίδας (IGH)	8
Γενετικοί τόποι ελαφριών αλυσίδων.....	9
Γενετικός τόπος κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK).....	9
Γενετικός τόπος λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL)	Error! Bookmark not defined.
Γενετικοί τόποι T-κυτταρικών υποδοχέων	Error! Bookmark not defined.
Γενετικός τόπος β αλυσίδας (TRB).....	Error! Bookmark not defined.
Μηχανισμοί διαφοροποίησης των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας.....	Error! Bookmark not defined.
Μηχανισμοί διαφοροποίησης των ανοσοσφαιρινών	Error! Bookmark not defined.
1) Ανασυνδυασμός V(D)J	Error! Bookmark not defined.
2) Ποικιλομορφία στα σημεία ένωσης των ανασυνδυασμένων γονιδίων.....	Error! Bookmark not defined.
3) Συνδυασμοί βαριών και ελαφριών αλυσίδων	14
4) Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση	14
Μηχανισμοί διαφοροποίησης των T-κυτταρικών υποδοχέων.....	Error! Bookmark not defined.
Οντογένεση των B λεμφοκυττάρων.....	16
1. Φάση διαφοροποίησης ανεξάρτητη από το αντιγόνο.....	17
2. Φάση διαφοροποίησης εξαρτώμενη από το αντιγόνο	18
i. Το βλαστικό κέντρο	18
Υποκατηγορίες B λεμφοκυττάρων.....	Error! Bookmark not defined.
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL).....	21
Γενικά	21
Στερεοτυπία του B-κυτταρικού υποδοχέα στη CLL	23
Στερεότυπα υποσύνολα στη CLL	25
Οντογένεση της CLL	29
WORKPACKAGE 1 - Ανοσογενετική μελέτη της μονοκλωνικής B λεμφοκυττάρωσης	30
Εισαγωγή.....	30
Υλικά και Μέθοδοι	31
Αποτελέσματα	33
Συζήτηση.....	38
WORKPACKAGE 2 - Ανοσογενετική μελέτη της ΧΛΛ με εναλλαγή ισotyπού.....	Error! Bookmark not defined.
Εισαγωγή.....	Error! Bookmark not defined.

Υλικά και Μέθοδοι	Error! Bookmark not defined.
Αποτελέσματα	Error! Bookmark not defined.
Συζήτηση	48
WORKPACKAGE 3 - Μοριακή ανάλυση των T λεμφοκυττάρων στη ΧΛΛ	50
Εισαγωγή	50
A. Ανοσογενετική μελέτη του ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων στη ΧΛΛ με μεθόδους κλασικής υποκλωνοποίησης και αλληλούχησης κατά Sanger	52
Υλικά και Μέθοδοι	52
Αποτελέσματα	53
Συζήτηση	59
B. Μαζικής κλίμακας ανοσογενετική μελέτη του ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων στη ΧΛΛ με μεθόδους αλληλούχησης νέας γενιάς	62
Υλικά και Μέθοδοι	62
Αποτελέσματα	Error! Bookmark not defined.
Συζήτηση	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)	Error! Bookmark not defined.
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Error! Bookmark not defined.
ΑΝΑΤΥΠΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ	Error! Bookmark not defined.

Ανατρέχοντας 8 χρόνια πριν, θυμάμαι ότι επέλεξα να ασχοληθώ με τη Μοριακή Βιολογία στα πλαίσια μεταπτυχιακών σπουδών επειδή πίστευα πως θα με βοηθήσει να γίνω καλύτερος κλινικός Αιματολόγος. Εκ των υστέρων, νομίζω ότι ήταν σωστή επιλογή.

Ευχαριστώ το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διαγνωστική και Θεραπευτική των Ανθρώπινων Νοσημάτων" του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την αποκαλυπτική και καταλυτική εισαγωγή στη βασική και μεταφραστική έρευνα για τα ανθρώπινα νοσήματα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ελένη Παπαδάκη για τη συνεχή στήριξη που μου παρείχε από την πρώτη στιγμή που με γνώρισε ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια. Δε θα την ξεχάσω να μου παραδίδει ιδιαίτερα μαθήματα κυτταρομετρίας αργά το απόγευμα, λίγες μέρες πριν φύγω οριστικά για Θεσσαλονίκη.

Όλα τα σκέλη της μελέτης πραγματοποιήθηκαν υπό την επίβλεψη του κ. Κώστα Σταματοπούλου, αρχικά ως Υπεύθυνου του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του Γ.Ν.Θ "Γ.Παπανικολάου" και εδώ και τρία χρόνια Διευθυντή του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ) στη Θεσσαλονίκη. Μου αφιέρωσε άπειρο προσωπικό χρόνο (που δεν είχε), μου έμαθε ό,τι ξέρω για τα λεμφουπερπλαστικά νοσήματα, μου ξαναέμαθε από την αρχή να σκέφτομαι και να γράφω, και επιμένει πεισματικά να συνεχίσω να μαθαίνω. Τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Το εργαστηριακό μέρος της διδακτορικής διατριβής εκπονήθηκε εν μέρει στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή της Κλινικής κ. Αχιλλέα Αναγνωστόπουλο για το ενδιαφέρον του και την πολύπλευρη στήριξή του. Είναι πάντα πρόθυμος να δημιουργήσει τις συνθήκες για παραγωγική ερευνητική δουλειά σ' ένα αντίξοο περιβάλλον. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα πρώην και νυν στελέχη του Εργαστηρίου, τις κυρίες Αποστολία Παπαλεξανδρή (Αιματολόγο), Τασούλα Τουλουμενίδου (Βιολόγο), Ευαγγελία Σταλικά, Μαρία Καρυπίδου, Γιώτα Ζέρβα, Εύα Κοράβου, Αγγελική Παλέτα, Μαρία Κούτρα (Τεχνολόγους) για τη συνεργασία και την αμέριστη συμπαράσταση, παρά τον επιπλέον φόρτο εργασίας που κατά καιρούς δημιούργησα και δημιουργώ.

Το τελευταίο σκέλος της διδακτορικής διατριβής εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ). Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ερευνήτρια κα. Αναστασία Χατζηδημητρίου για την στήριξή της σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, τις συζητήσεις και την άψογη συνεργασία μας, καθώς και τους υπόλοιπους συνεργάτες της ομάδας και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές για την πολύτιμη βοήθειά τους. Επίσης αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω την ομάδα Πληροφορικής της Ιατρικής

Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τη συνεργασία μας στην ανάπτυξη νέων εργαλείων βιοπληροφορικής για ανοσογενετικές αναλύσεις.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου: το Γιώργο, που ελπίζει (σωστά) ότι θα βρίσκουμε χρόνο για να περνάμε όμορφα μαζί, τη Φρόσω, που αν και μόλις 2 ετών καταφέρνει να μου υποδεικνύει τι είναι σημαντικό, την αγέννητή μου κόρη, που υπομένει αγόγγυστα (;) το βάρος του laptop, και τον πατέρα μου, που κάποτε μου μάθαινε να διαβάζω και τώρα προσπαθεί να με πείσει να σταματήσω.

Θεσσαλονίκη,
Νοέμβρης 2016

Βασικά στοιχεία ανοσολογίας

Η ανοσολογία ξεκίνησε ως επιστήμη που μελετούσε την άμυνα του οργανισμού εναντίον των λοιμώξεων. Πράγματι, το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, όπως άλλωστε και κάθε είδους με μακρά φυσική ιστορία, εξελίχθηκε ανά τους αιώνες ώστε να μπορεί να αναγνωρίζει και να εξουδετερώνει αποτελεσματικά την πληθώρα των παθογόνων παραγόντων που κατακλύζουν το περιβάλλον μας. Ωστόσο, στην πορεία η ανοσολογία αναδείχθηκε ως επιστήμη που μελετά την αλληλεπίδραση του οργανισμού όχι μόνο με το εξωτερικό περιβάλλον και τους πιθανούς εισβολείς, αλλά και με τα ίδια τα οργανικά συστατικά του. Σε αυτά τα πλαίσια, η ανοσολογία μελετά εκδηλώσεις αυτοανοσίας, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται κατά στοιχείων του ίδιου του οργανισμού, εκδηλώσεις αλλεργίας, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα απαντά υπέρμετρα σε ουσίες που δεν είναι παθογόνες, καθώς και μηχανισμούς ανοσοεπιτήρησης, δηλαδή μηχανισμούς αναγνώρισης και καταστροφής εξαλλαγμένων (προκαρκινικών ή καρκινικών) κυττάρων.

Γενικά, οι άνοσες απαντήσεις διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: έμφυτες (innate) και προσαρμοστικές (adaptive). Η έμφυτη ανοσία αναγνωρίζει συντηρημένα πρωτεϊνικά μοτίβα στην επιφάνεια παθογόνων (μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα, Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) και δρα άμεσα, αποτελώντας έτσι μια πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Αντίθετα, η προσαρμοστική ανοσία αναγνωρίζει τεράστια ποικιλία παθογόνων παραγόντων με εξαιρετική ειδικότητα, ωστόσο χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να εκδηλωθεί αποτελεσματικά. Κάθε ουσία που μπορεί να προκαλέσει προσαρμοστική άνοση απάντηση καλείται αντιγόνο, κάθε δε αντιγόνο μπορεί να περιέχει πολλές επιμέρους δομές (επιτόπους), καθεμιά από τις οποίες πυροδοτεί ειδική άνοση απάντηση. Η προσαρμοστική ανοσία, εκτός από μεγάλη ειδικότητα στην αναγνώριση πληθώρας αντιγονικών επιτόπων (*εξειδίκευση* και *ποικιλομορφία*), χαρακτηρίζεται από: (i) την ικανότητα διατήρησης ανοσολογικής *μνήμης*, ώστε η επόμενη άνοση απάντηση εναντίον του ίδιου επιτόπου να εξελιχθεί πιο γρήγορα, (ii) *αυτορρύθμισης*, ώστε να σταματά όταν εξαλειφθεί η απειλή και να μην παραβλάπτει τον οργανισμό, και (iii) *ανοχής*, ιδιότητα που επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ξένων αντιγόνων και αυτοαντιγόνων και αποτρέπει την αντίδραση εναντίον συστατικών του ίδιου του οργανισμού επιτυχώς.

Οι τελεστές της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα λεμφοκύτταρα, κατηγορία λευκών αιμοσφαιρίων που παράγονται στο μυελό των οστών, αποικίζουν τους λεμφαδένες και τους υπόλοιπους λεμφικούς ιστούς/όργανα του σώματος, και κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα, "περιπολώντας" για αντιγόνα. Η αναγνώριση των αντιγόνων επιτυγχάνεται μέσω ειδικών υποδοχέων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα ώριμα λεμφοκύτταρα. Γενικά, τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, Β και Τ λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μέσω των Β-

κυτταρικών υποδοχέων (B-cell receptors, BcR), ενώ τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μέσω των T-κυτταρικών υποδοχέων (T-cell receptors, TR). Η σύνδεση ενός αντιγονικού επιτόπου στον ειδικό B-κυτταρικό υποδοχέα ενός B λεμφοκυττάρου προκαλεί πολλαπλασιασμό του κυττάρου, που ταυτόχρονα διαφοροποιείται έτσι ώστε να παράγει αντισώματα κατά του αντιγόνου. Τα αντισώματα, ή αλλιώς ανοσοσφαιρίνες (IG), που αποτελούν την εκκρινόμενη μορφή του ίδιου του B-κυτταρικού υποδοχέα, συνδέονται με το αντιγόνο το οποίο προκάλεσε την παραγωγή τους και προσελκύουν άλλα κύτταρα ή μόρια με σκοπό την καταστροφή του. Η παραγωγή αντισωμάτων συνιστά τη *χυμική ανοσία*. Ενώ τα B λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν απευθείας το αντιγόνο μέσω των BcR, τα T λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν το αντιγόνο μέσω των TR μόνο όταν αυτό παρουσιάζεται πλαισιωμένο από ειδικές πρωτεΐνες, τα αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC, ή αλλιώς Histocompatibility Locus Antigens, HLA). Αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται στην επιφάνεια των "αντιγονοπαρουσιαστικών" κυττάρων, δηλαδή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να επεξεργάζονται το αντιγόνο έτσι ώστε να το παρουσιάσουν (συνήθως τμήματά του) συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες HLA στην επιφάνειά τους. Τα T λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δύο αδρές υποκατηγορίες, CD4+ ή βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (T_{helper} cells), που αναγνωρίζουν αντιγόνα πλαισιωμένα από πρωτεΐνες HLA τάξης II, και CD8+ ή κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (T_{cytotoxic} cells), που αναγνωρίζουν αντιγόνα πλαισιωμένα από πρωτεΐνες HLA τάξης I. Τα μεν CD4+ T λεμφοκύτταρα ενορχηστρώνουν την προσαρμοστική άνοση απάντηση, δίνοντας σήματα ενεργοποίησης στα B λεμφοκύτταρα που έχουν αναγνωρίσει το αντιγόνο, τα δε CD8+T λεμφοκύτταρα εμπλέκονται σε κυτταροτοξικές απαντήσεις, δηλαδή καταστρέφουν κύτταρα του οργανισμού που έχουν "μολυνθεί" με το αντιγόνο¹.

Δομή ανοσοσφαιρινών

Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο πανομοιότυπες βαριές (*heavy, H*) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (*light, L*) αλυσίδες. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφυδρικούς δεσμούς και κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά αλυσίδα επίσης μ' έναν δισουλφυδρικό δεσμό. Επειδή τα ζεύγη βαριάς-ελαφριάς αλυσίδας είναι όμοια μεταξύ τους, το μόριο της ανοσοσφαιρίνης εμφανίζει δίπτυχο άξονα συμμετρίας².

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων, κάππα (*kappa, κ*) και λάμβδα (*lambda, λ*), χωρίς γνωστές λειτουργικές διαφορές μεταξύ τους. Σε κάθε ανοσοσφαιρίνη εκφράζεται ένας μόνο τύπος ελαφριών αλυσίδων, είτε κ είτε λ. Όσον αφορά στις βαριές αλυσίδες, υπάρχουν 5 τύποι (*μ, γ, δ, ε, α*), και με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε τάξεις ή ισότυπους (*isotypes*) (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA).

Οι αμινοτελικές περιοχές των βαριών κι ελαφριών αλυσίδων παρουσιάζουν ποικιλομορφία και συνιστούν τη μεταβλητή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης (*variable*), ενώ οι καρβοξυτελικές περιοχές απαρτίζουν τη σταθερή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης (*constant*). Αυτός ο δομικός διαχωρισμός έχει λειτουργική βάση, καθώς η μεταβλητή και η σταθερή περιοχή επιτελούν διακριτές λειτουργίες: Η μεν μεταβλητή περιοχή εμπλέκεται στην αναγνώριση και πρόσδεση του αντιγόνου, η δε σταθερή περιοχή

καθορίζει τον ισότυπο της ανοσοσφαιρίνης, που έχει λειτουργικό αντίκτυπο στο είδος των εκτελεστικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται για την αντιμετώπιση του παθογόνου που αναγνωρίστηκε.

Η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών και βαριών αλυσίδων αποτελείται από ξεχωριστές περιοχές με διαφορετικό βαθμό μεταβλητότητας. Τρεις περιοχές παρουσιάζουν εξαιρετικό βαθμό μεταβλητότητας (υπερμεταβλητές, *hypervariable*) και σχηματίζουν μια θέση σύνδεσης συμπληρωματική με το αντιγόνο, καθορίζοντας ουσιαστικά την αντιγονική ειδικότητα της ανοσοσφαιρίνης: γι' αυτό ονομάζονται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (*complementarity determining regions, CDRs*): CDR₁, CDR₂ και CDR₃. Τα τμήματα μεταξύ των CDR είναι πιο συντηρημένα και ονομάζονται περιοχές πλαισίου (*framework regions, FRs*): FR₁, FR₂, FR₃ και FR₄. Οι περιοχές πλαισίου αποτελούν το δομικό πλαίσιο των υπερμεταβλητών περιοχών.³

Δομή T-κυτταρικών υποδοχέων

Οι T-κυτταρικοί υποδοχείς (*T-cell receptors, TRs*) είναι ετεροδιμερή μόρια, αποτελούμενα από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους μ' έναν δισουλφυδρυλικό δεσμό. Τα περισσότερα ώριμα T λεμφοκύτταρα έχουν στην επιφάνειά τους TRs που αποτελούνται από μια άλφα (TR α) και μια βήτα (TR β) αλυσίδα, ωστόσο υπάρχει κι ένας μικρός υποπληθυσμός T κυττάρων που εκφράζουν TRs αποτελούμενους από μία γάμμα (TR γ) και μια δέλτα (TR δ) αλυσίδα. Οι άνοσες απαντήσεις κατεξοχήν επιτελούνται από $\alpha:\beta$ T κύτταρα, ενώ ο ρόλος των $\gamma:\delta$ T κυττάρων δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Όπως και στις ανοσοσφαιρίνες, οι αμινοτελικές περιοχές των αλυσίδων των T-κυτταρικών υποδοχέων παρουσιάζουν ποικιλομορφία και συνιστούν τη μεταβλητή περιοχή (*variable*) που εμπλέκεται στην αναγνώριση του αντιγόνου, ενώ οι καρβοξυτελικές περιοχές συνθέτουν τη σταθερή περιοχή (*constant*). Τόσο η μεταβλητή όσο και η σταθερή περιοχή των αλυσίδων των TRs παρουσιάζουν ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Έτσι, κι εδώ η μεταβλητή περιοχή αποτελείται από τρεις περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (CDR₁, CDR₂, CDR₃), που πλαισιώνονται από τέσσερις περιοχές πλαισίου (FR₁, FR₂, FR₃, FR₄).

Σε σχέση με τις ανοσοσφαιρίνες, οι TRs διαφέρουν επειδή αφενός διαθέτουν μια θέση σύνδεσης με το αντιγόνο, αφετέρου δεν εκκρίνονται αλλά παραμένουν σταθερά εμπεδωμένοι στην κυτταρική επιφάνεια των T κυττάρων. Επίσης, η αναγνώριση του αντιγόνου προϋποθέτει ότι αυτό θα παρουσιαστεί στον εκάστοτε TR $\alpha\beta$ συνδεδεμένο με πρωτεΐνες-αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC ή HLA)¹.

Πρωτεΐνες συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας

Υπάρχουν δύο τάξεις αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (HLA τάξης I και τάξης II) που, παρότι συγγενείς πρωτεΐνες, διαφέρουν τόσο ως προς τη συνολική δομή τους όσο και ως προς το προφίλ έκφρασης στους διάφορους ιστούς του σώματος. Τα αντιγόνα HLA τάξης I είναι ετεροδιμερή μόρια αποτελούμενα από μια άλφα αλυσίδα (α), η οποία κωδικοποιείται από μια πολυμορφική γονιδιακή θέση του συμπλέγματος MHC στο χρωμόσωμα 6, και μια μικρότερη πρωτεΐνη, τη β 2-μικροσφαιρίνη, που κωδικοποιείται από ένα μη πολυμορφικό γονίδιο στο χρωμόσωμα 15. Τα αντιγόνα HLA τάξης II είναι επίσης ετεροδιμερή, αποτελούμενα από μια άλφα (α) και μια βήτα (β) αλυσίδα, που

κωδικοποιούνται από πολυμορφικά γονίδια του συμπλέγματος MHC. Η άλφα αλυσίδα των HLA τάξης I και II κωδικοποιείται από διαφορετικά γονίδια του συμπλέγματος.

Τα αντιγόνα HLA έχουν την ικανότητα να προσδέονται τεράστια ποικιλία πεπτιδίων, μάλιστα είναι η πρόσδεση των πεπτιδίων καθωτική που σταθεροποιεί τη δομή τους. Τα αντιγόνα HLA τάξης I προσδέονται συνήθως μικρά πεπτίδια μήκους 8-10 αμινοξέων, ενώ τα αντιγόνα HLA τάξης II προσδέονται πεπτίδια ποικίλου μήκους. Και στις δυο περιπτώσεις, οι TR αναγνωρίζουν ειδικά και συνδέονται τόσο με το πεπτίδιο, όσο και με το αντιγόνο HLA που το παρουσιάζει. Τα μεν αντιγόνα HLA τάξης I παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, ενώ τα δε αντιγόνα HLA τάξης II παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα CD4⁺ ή βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Τα αντιγόνα HLA τάξης I και II έχουν διαφορετική κατανομή έκφρασης στους ιστούς, που αντανακλά τις διαφορετικές εκτελεστικές λειτουργίες που επιτελούν τα CD8⁺ και τα CD4⁺ T κύτταρα, αντιστοίχως. Τα CD8⁺ T κύτταρα είναι επιφορτισμένα να εκδηλώνουν κυτταροτοξικές απαντήσεις έναντι κυττάρων που έχουν μολυνθεί με παθογόνα, π.χ. ιούς, ή έχουν υποστεί κάποιου είδους εξαλλαγή ή παθολογική τροποποίηση. Έτσι, τα αντιγόνα HLA τάξης I εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Αντίθετα, τα CD4⁺ T κύτταρα έχουν ρόλο συντονισμού των άνοσων απαντήσεων. Έτσι, τα αντιγόνα HLA τάξης II εκφράζονται κατεξοχήν στην επιφάνεια κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (B λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) που εξαρτώνται από ενεργοποιητικά σήματα των CD4⁺ T κυττάρων για να εκδηλώσουν τις εκτελεστικές λειτουργίες τους¹.

Γενετικοί τόποι ανοσοσφαιρινών

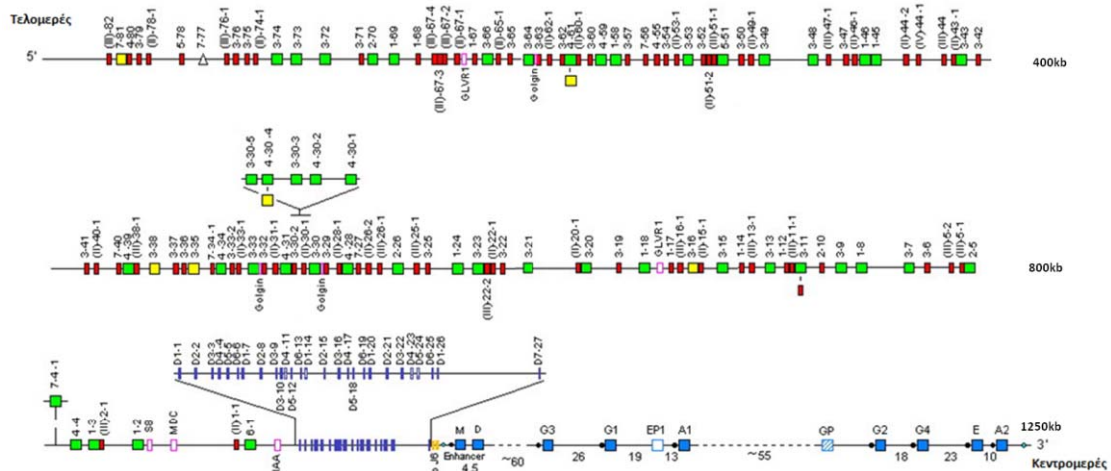
Στον άνθρωπο, οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν ομάδες γονιδίων. Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες γονιδίων: V (Variable), D (Diversity), J (Junctional) και C (Constant). Οι γενετικοί τόποι των ελαφριών αλυσίδων (IGK για την κ και IGL για τη λ ελαφριά αλυσίδα) βρίσκονται στα χρωμοσώματα 2 και 22, αντιστοίχως, και περιλαμβάνουν τρεις ομάδες γονιδίων: V, J και C. Επιπλέον, οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν πληθώρα ρυθμιστικών γονιδίων, όπως οι αλληλουχίες-οδηγοί (leader sequences, L) πριν από κάθε γονίδιο V².

Η πλήρης αλληλουχία που κωδικοποιεί μια βαριά ή ελαφριά αλυσίδα προκύπτει από ανασυνδυασμό ενός γονιδίου από κάθε ομάδα του αντίστοιχου γενετικού τόπου. Η μεταβλητή περιοχή των βαριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη γονιδίων V, D και J, ενώ η σταθερή περιοχή κωδικοποιείται από τα γονίδια C. Αντίστοιχα, η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη των γονιδίων V και J. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού πραγματοποιείται ιεραρχικά με τη βοήθεια του συμπλόκου ενζύμων RAG1/RAG2: αρχικά ένα γονίδιο D ανασυνδυάζεται μ' ένα γονίδιο J και στη συνέχεια το σύμπλοκο D-J αναδιατάσσεται μ' ένα γονίδιο V.

Γενετικός τόπος βαριάς αλυσίδας (IGH)

Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας εντοπίζεται στη ζώνη 14q32.33 του χρωμοσώματος 14, έχει μήκος 1250 kb και περιλαμβάνει 170-176 γονίδια ανά απλότυπο με προσανατολισμό 5' τελομερίδιο →IGHV →IGHD →IGHJ →IGHC → κεντρομερίδιο 3'. Από αυτά, λειτουργικά είναι τα 77-84 γονίδια (**Εικόνα**). Η ομάδα των γονιδίων IGHV

περιλαμβάνει 123-129 γονίδια ανάλογα με τον απλότυπο, που κατατάσσονται σε τέσσερις φυλογενετικές ομάδες (clans). Από αυτά, 82-88 γονίδια κατατάσσονται σε 7 υποομάδες γονιδίων (subgroups IGHV1-IGHV7), και 41 ψευδογονίδια δεν κατατάσσονται σε καμία υποομάδα. Η ομάδα των γονιδίων IGHD περιλαμβάνει 27 γονίδια, τα οποία κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (subgroups IGHD1-IGHD7). Η ομάδα των γονιδίων IGHJ περιλαμβάνει 9 γονίδια. Τέλος, η ομάδα των γονιδίων IGHC αποτελείται από 11 γονίδια (στον πιο συχνό απλότυπο)⁴. Ωστόσο, στην πράξη, το ρεπερτόριο των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας είναι πιο περιορισμένο, αποτελούμενο από 38-46 λειτουργικά γονίδια IGHV, 23 λειτουργικά γονίδια IGHD, 6 λειτουργικά γονίδια IGHJ και, στον πιο συχνό απλότυπο, 9 γονίδια IGHC.

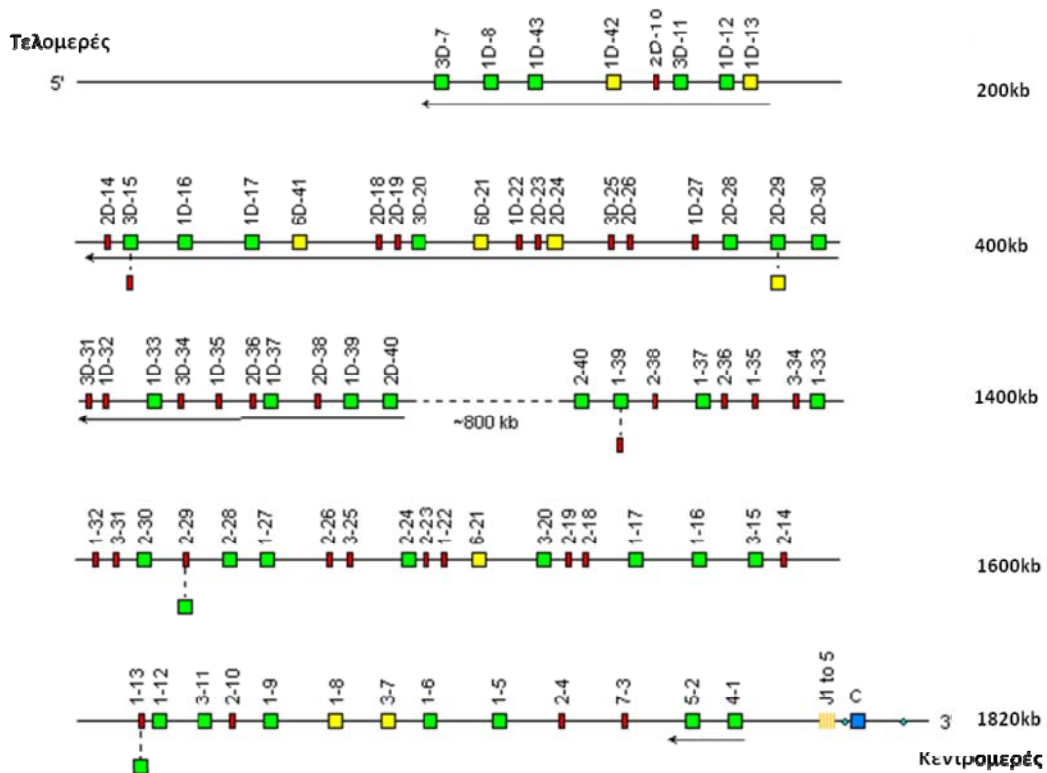


Εικόνα 1: Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο. (IMGT Web resources; <http://www.imgt.org>).

Γενετικοί τόποι ελαφριών αλυσίδων

Γενετικός τόπος κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK)

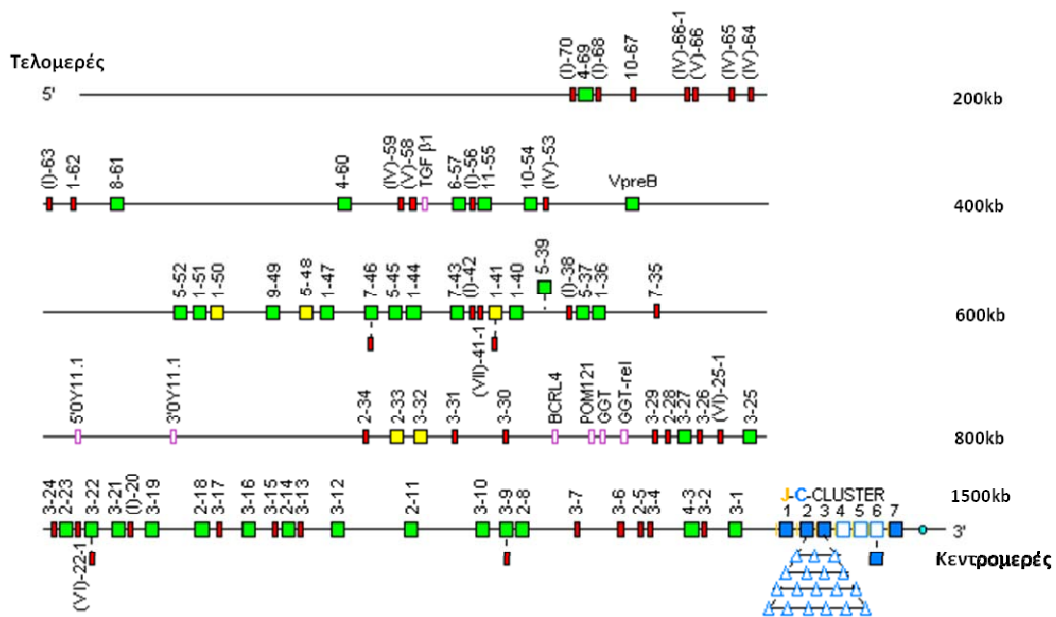
Εντοπίζεται στη ζώνη 2p11.2 του μικρού βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 2 και έχει μήκος 1.820 kb (**Error! Reference source not found.2**). Περιλαμβάνει συνολικά 76 γονίδια IGKV, που κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (IGKV1- IGKV7), 5 γονίδια IGKJ και ένα μοναδικό γονίδιο IGKC. Τα γονίδια IGKV οργανώνονται σε δύο συστοιχίες, οι οποίες απέχουν κατά 800 kb. Η απομακρυσμένη συστοιχία (distal cluster), προς το 5' άκρο του γενετικού τόπου, έχει μήκος 400 kb και περιλαμβάνει 36 γονίδια. Η εγγύς συστοιχία (proximal cluster) βρίσκεται στο 3' άκρο του γενετικού τόπου, έχει μήκος 600 kb και περιλαμβάνει 40 γονίδια⁵. Στην πράξη, το ρεπερτόριο των γονιδίων της κ ελαφριάς αλυσίδας είναι πιο περιορισμένο, αποτελούμενο από 31-36 λειτουργικά γονίδια IGKV (συνολικά 5 υποομάδες), τα 5 γονίδια IGKJ, και το γονίδιο IGKC.



Εικόνα 2: Ο γενετικός τόπος της κάππα ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο. (Προέλευση IMGT Web resources; <http://www.imgt.org>).

Γενετικός τόπος λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL)

Εντοπίζεται στη ζώνη 22q11.2 του μεγάλου βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 22 κι έχει μήκος 1.050 kb (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ο γενετικός τόπος της λάμδα ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο. (Προέλευση IMGT Web resources; <http://www.imgt.org>).

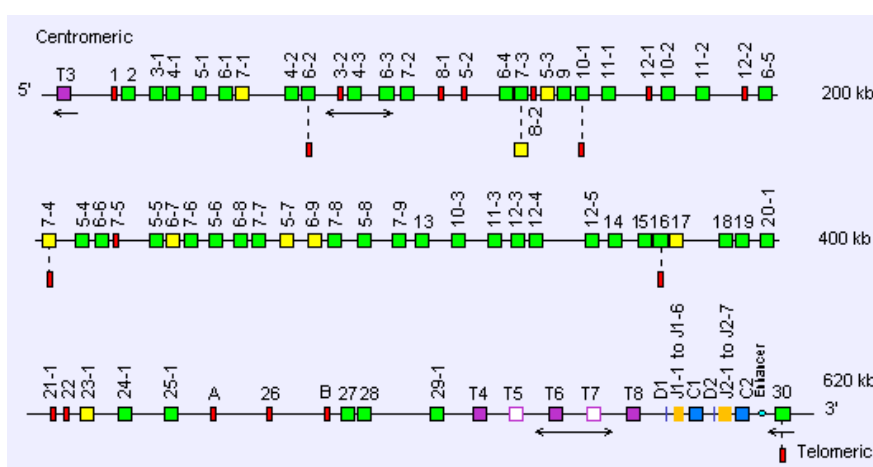
Περιλαμβάνει 73-74 γονίδια IGLV που κατανέμονται σε μήκος 900kb, 7-11 γονίδια IGLJ και 7-11 γονίδια IGLC, ανάλογα με τον απλότυπο. Τα γονίδια IGLJ είναι ισάριθμα με τα γονίδια IGLC και οργανώνονται σε ζεύγη γονιδίων. Τα 56-57 λειτουργικά γονίδια IGLV κατατάσσονται σε 11 υποομάδες.⁶ Στην πράξη, το ρεπερτόριο των γονιδίων της λ ελαφριάς αλυσίδας είναι πιο περιορισμένο, αποτελούμενο από 29-33 λειτουργικά γονίδια IGLV (συνολικά 10 υποομάδες), 4-5 γονίδια IGKJ, και 4-5 γονίδια IGKC.

Γενετικοί τόποι T-κυτταρικών υποδοχών

Στον άνθρωπο, οι γενετικοί τόποι των γονιδίων των T-κυτταρικών υποδοχών οργανώνονται κατ' αντιστοιχία με αυτούς των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, περιλαμβάνοντας συστοιχίες γονιδίων⁷. Ο γενετικός τόπος της β αλυσίδας (TRB) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και περιλαμβάνει 4 ομάδες γονιδίων (V-D-J-C). Ο γενετικός τόπος της α αλυσίδας (TRA) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και περιλαμβάνει 3 ομάδες γονιδίων (V-J-C), καθώς και τον γενετικό τόπο της δ αλυσίδας (TRD, με 4 ομάδες γονιδίων V-D-J-C) μεταξύ των συστοιχιών γονιδίων TRAV και TRAJ. Αυτή η διάταξη εξασφαλίζει πως η αναδιάταξη των γονιδίων TRA-TRJ θα οδηγήσει σε διαγραφή των γονιδίων της δ αλυσίδας. Ο γενετικός τόπος της γ αλυσίδας (TRG) εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 και περιλαμβάνει 3 ομάδες γονιδίων (V-J-C). Εξάλλου, οι γενετικοί τόποι των αλυσίδων του T κυτταρικού υποδοχέα περιλαμβάνουν πληθώρα ρυθμιστικών γονιδίων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή ή την αποσιώπηση, όπως αλληλουχίες-οδηγούς (leader sequences, L) πριν από κάθε γονίδιο V.

Γενετικός τόπος β αλυσίδας (TRB)

Εντοπίζεται στη ζώνη 7q35 του μακρού σκέλους του ανθρώπινου χρωμοσώματος 7 κι έχει μήκος 620 kb. Περιλαμβάνει 64-67 γονίδια TRBV που κατατάσσονται σε 32 υποομάδες. Με εξαίρεση το γονίδιο TRBV30, που βρίσκεται καθοδικά του γονιδίου TRBC2, όλα τα υπόλοιπα γονίδια TRBV βρίσκονται ανοδικά μιας διπλασιασμένης συστοιχίας γονιδίων D-J-C. Η πρώτη συστοιχία V-D-J περιλαμβάνει 1 γονίδιο TRBD, 6 γονίδια TRBJ και το γονίδιο TRBC1, και η δεύτερη συστοιχία περιλαμβάνει 1 γονίδιο TRBD, 8 γονίδια TRBJ και το γονίδιο TRBC2 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ο γενετικός τόπος της β αλυσίδας των T-κυτταρικών υποδοχών στον άνθρωπο. (Προέλευση <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes>).

Μηχανισμοί διαφοροποίησης των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας

Στη φύση υπάρχει τεράστιος αριθμός και ποικιλία αντιγόνων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κάθε Β και κάθε Τ λεμφοκύτταρο φέρει έναν αντιγονικό υποδοχέα με συγκεκριμένη ειδικότητα, τόσο οι ανοσοσφαιρίνες, όσο και οι Τ-κυτταρικοί υποδοχείς πρέπει να διακρίνονται από εξαιρετική δομική ετερογένεια προκειμένου να είναι εφικτή η αναγνώριση του συνόλου των επιτόπων με τους οποίους μπορεί να έλθει σε επαφή ο ανθρώπινος οργανισμός. Πράγματι, το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου έχει την ικανότητα αναγνώρισης 10^9 - 10^{12} διαφορετικών επιτόπων, δηλαδή είναι σε θέση να παράξει αντίστοιχο αριθμό διακριτών κλώνων λεμφοκυττάρων, καθένας από τους οποίους διαθέτει αντιγονικούς υποδοχείς μοναδικής ειδικότητας.

Αυτή η τεράστια ετερογένεια των αντιγονικών υποδοχέων έμφυτης ανοσίας εξασφαλίζεται χάρη στη διαδικασία ανασυνδυασμού μιας ήδη μεγάλης ποικιλίας γονιδίων και του συνδυασμού των αλυσίδων (βαριά/ελαφριά στην περίπτωση των ΒcRs και α/β ή γ/δ στην περίπτωση των TRs) ώστε να προκύψει η μεταβλητή περιοχή του μορίου του υποδοχέα. Ειδικά στις ανοσοσφαιρίνες, λειτουργεί κι ένας ακόμη μηχανισμός, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, εισάγοντας σωματικές μεταλλάξεις στο ανασυνδυασμένο DNA^{1,8}.

Μηχανισμοί διαφοροποίησης των ανοσοσφαιρινών

1) Ανασυνδυασμός V(D)J

Πρόκειται για τη διεργασία αναδιάταξης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που πραγματοποιείται στο μυελό των οστών κατά την πρώιμη φάση της οντογένεσης των Β λεμφοκυττάρων. Κατά την ωρίμανσή του, το Β λεμφοκύτταρο περνά από διακριτά στάδια διαφοροποίησης, τα οποία χαρακτηρίζονται από αντίστοιχα στάδια παραγωγής του ΒcR. Τελικά, το παρθένο Β λεμφοκύτταρο που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος εκφράζει στην επιφάνειά του έναν μοναδικό, λειτουργικό αντιγονικό υποδοχέα-ανοσοσφαιρίνη, απαραίτητο για τη μεταβίβαση σημάτων επιβίωσης και πολλαπλασιασμού^{1,9}.

Τα γονίδια V, D (για τις βαριές αλυσίδες) και J περιβάλλονται από cis-ενεργές αλληλουχίες γνωστές ως αλληλουχίες σηματοδότησης του ανασυνδυασμού (recombination signal sequences, RSS). Όλες οι αλληλουχίες RSS έχουν δύο συντηρημένες αλληλουχίες: ένα παλίνδρομο επτανουκλεοτίδιο με συναινετική (consensus) αλληλουχία 5'-CACAGTG-3' κι ένα εννεανουκλεοτίδιο με συναινετική, πλούσια σε A/T αλληλουχία 5'-ACAAAACC-3', τα οποία διαχωρίζονται από διαστηματική περιοχή (spacer) μήκους 12 ή 23 ζευγών βάσεων¹⁰. Η αλληλουχία της διαστηματικής περιοχής δεν είναι συντηρημένη, αλλά το μήκος της έχει κρίσιμο ρόλο στη λειτουργικότητα των αλληλουχιών RSS. Συγκεκριμένα, 12 ζεύγη βάσεων αντιστοιχούν σε μια στροφή της έλικας του DNA και 23 ζεύγη βάσεων σε δύο στροφές. Έτσι, χάρη στο συγκεκριμένο μήκος εξασφαλίζεται ο προσανατολισμός της επταμερούς και της εννεαμερούς αλληλουχίας προς την ίδια πλευρά της έλικας του DNA, όπου αναγνωρίζονται από τα ειδικά ένζυμα ανασυνδυασμού. Δύο γονίδια μπορεί να ανασυνδυαστούν μόνο εφόσον διαθέτουν RSS με διαφορετική διαστηματική αλληλουχία (12 bp ή 23 bp). Αυτή η συνθήκη είναι γνωστή ως κανόνας 12/23 ή κανόνας one turn/two turns.

Τα γονίδια κάθε ομάδας φέρουν ένα συγκεκριμένο τύπο RSS. Η μεταβλητή περιοχή μιας βαριάς αλυσίδας, που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό ενός γονιδίου IGHD μ' ένα

γονίδιο IGHD στο 3' άκρο και στη συνέχεια του συμπλόκου IGHD-IGHJ μ' ένα γονίδιο IGHV στο 5' άκρο, θα σχηματιστεί μόνο αν τα γονίδια IGHV και IGHJ φέρουν RSS με διαστηματική περιοχή ίδιου μήκους (23bp) και το γονίδιο IGHD φέρει ανοδικά και καθοδικά της αλληλουχίας του RSS με διαστηματική περιοχή μήκους 12bp. Έτσι, διασφαλίζεται ότι ο ανασυνδυασμός θα οδηγήσει σε λειτουργικό προϊόν¹¹. Ο μηχανισμός αναδιάταξης είναι ίδιος και για τις ελαφριές αλυσίδες, με τη διαφορά ότι για το σχηματισμό της μεταβλητής περιοχής μιας ελαφριάς αλυσίδας χρειάζεται ν' ανασυνδυαστούν δύο γονίδια (IGLV και IGLJ) σ' ένα μοναδικό συμβάν ανασυνδυασμού.

Ο ανασυνδυασμός V(D)J συνίσταται σε κοπή κι επανένωση γονιδίων που μπορεί να απέχουν πολύ μεταξύ τους στη βλαστική διάταξη του DNA. Συνηθέστερα, τα γονίδια που ανασυνδυάζονται έχουν τον ίδιο μεταγραφικό προσανατολισμό, οπότε ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μέσω κοπής και απαλοιφής του παρεμβαλλόμενου τμήματος DNA. Σε περίπτωση που τα γονίδια έχουν αντίθετο μεταγραφικό προσανατολισμό, ο ανασυνδυασμός περιλαμβάνει αναστροφή του παρεμβαλλόμενου DNA, το οποίο δεν απομακρύνεται από το χρωμόσωμα¹².

Πρωταρχικό ρόλο στον ανασυνδυασμό παίζουν οι πρωτεΐνες RAG, τα δύο ένζυμα του ετεροδιμερούς συμπλόκου RAG-1/RAG-2, το οποίο αναγνωρίζει και προσδέεται στις αλληλουχίες RSS, προκαλώντας στη συνέχεια μια μονόκλωνη εντομή στη συμβολή μεταξύ του επταμερούς και της κωδικοποιητικής αλληλουχίας σε καθένα από τα γονίδια που ανασυνδυάζονται [V, (D) ή J]. Μετά την εντομή προκύπτει ένα ελεύθερο 3'-OH, το οποίο επιδρά στο συμπληρωματικό κλώνο και τελικά προκαλεί δίκλωνη εντομή (DSB, double strand break) μέσω trans-εστεροποίησης. Τελικά προκύπτουν τέσσερα ελεύθερα δίκλινα άκρα DNA. Τα μεν άκρα των γονιδίων καλούνται κωδικοποιητικά, ενώ τα άκρα του τμήματος που φέρει τις αλληλουχίες RSS και το παρεμβαλλόμενο DNA σηματοδοτικά. Το σύμπλοκο RAG παραμένει προσδεμένο στις αλληλουχίες RSS των σηματοδοτικών άκρων (μετασυναπτικό σύμπλοκο, post synaptic complex, PSC). Στα κωδικοποιητικά άκρα το νουκλεοτίδιο με την ελεύθερη 3'-OH ρίζα σχηματίζει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το συμπληρωματικό του νουκλεοτίδιο, δημιουργώντας δομή φουρκέτας (hairpin). Ο σχηματισμός αυτών των δομών στα δύο είδη άκρων, προσελκύει ένζυμα ένωσης μη ομόλογων άκρων (Non Homologous End-Joining, NHEJ), τα οποία ενώνουν τα κωδικοποιητικά και τα σηματοδοτικά άκρα μεταξύ τους^{13,14}.

2) Ποικιλομορφία στα σημεία ένωσης των ανασυνδυασμένων γονιδίων

Κατά την ένωση των κωδικοποιητικών άκρων, μέσω μιας σειράς διαδοχικών αντιδράσεων ενεργοποιείται τελικά η ενδονουκλεάση Artemis, η οποία διασπά τη δομή φουρκέτας στα κωδικοποιητικά άκρα. Η θέση της εντομής είναι τυχαία, πρακτικά σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο της φουρκέτας. Όταν η διάσπαση συμβαίνει σε απόσταση μερικών νουκλεοτιδίων από την κορυφή της δομής, προκύπτει μια μονόκλωνη ουρά στο συμπληρωματικό κλώνο με παλίνδρομη αλληλουχία (νουκλεοτιδία P, palindromic nucleotides). Στη συνέχεια, το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) προσθέτει de novo νουκλεοτιδία N (non-templated, N nucleotides, κατά προτίμηση νουκλεοτιδία γουανίνης και κυτοσίνης) με τυχαίο τρόπο - χωρίς εκμαγείο- στα προεξέχοντα άκρα της κωδικοποιητικής αλληλουχίας. Η TdT μπορεί να προσθέσει από ένα έως είκοσι νουκλεοτιδία. Η ποικιλότητα αυξάνει ακόμη περισσότερο με τη δράση άλλων ενζύμων μ' ενεργότητα εξωνουκλεάσης που αφαιρούν

νουκλεοτίδια πριν από την οριστική ένωση των γονιδίων, που πραγματοποιείται με τη δράση της λιγκάσης IV^{15,16}. Αυτοί οι μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας στα σημεία σύνδεσης των ανασυνδυαζόμενων γονιδίων (συνδετική ετερογένεια) αυξάνουν εκθετικά το ρεπερτόριο ειδικοτήτων των BcR IGs. Αξίζει να τονιστεί ότι οι περιοχές συνδετικής ποικιλότητας είναι αυτές που παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στον καθορισμό της αντιγονικής ειδικότητας της ανοσοσφαιρίνης, καθώς αντιστοιχούν στην περιοχή καθορισμού συμπληρωματικότητας 3 (CDR3).

3) Συνδυασμοί βαριών και ελαφριών αλυσίδων

Εκτός από τη συνδυαστική ετερογένεια που αφορά στο σχηματισμό της μεταβλητής περιοχής της αλυσίδας από πληθώρα λειτουργικών γονιδίων V-(D)-J, υπάρχει και η συνδυαστική ετερογένεια που προκύπτει από το συνδυασμό βαριάς κι ελαφριάς αλυσίδας ώστε να σχηματιστεί η πλήρης μεταβλητή περιοχή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Ο τυχαίος συνδυασμός 6300 διαφορετικών βαριών αλυσίδων με 185 διαφορετικές ελαφριές αλυσίδες κ ή 165 διαφορετικές αλυσίδες λ θεωρητικά αποδίδει $\sim 3 \times 10^6$ διαφορετικές ειδικότητες ανοσοσφαιρινών. Στην πράξη, ο αριθμός των διαφορετικών BcR IGs είναι κάπως μικρότερος από τον υπολογιζόμενο. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι τα γονίδια IG εμφανίζουν διαφορετικές συχνότητες έκφρασης¹⁷, ενώ παράλληλα συγκεκριμένες βαριές αλυσίδες τείνουν να συνδυάζονται με συγκεκριμένες ελαφριές, πιθανότατα λόγω σταθερότητας του μορίου IG¹.

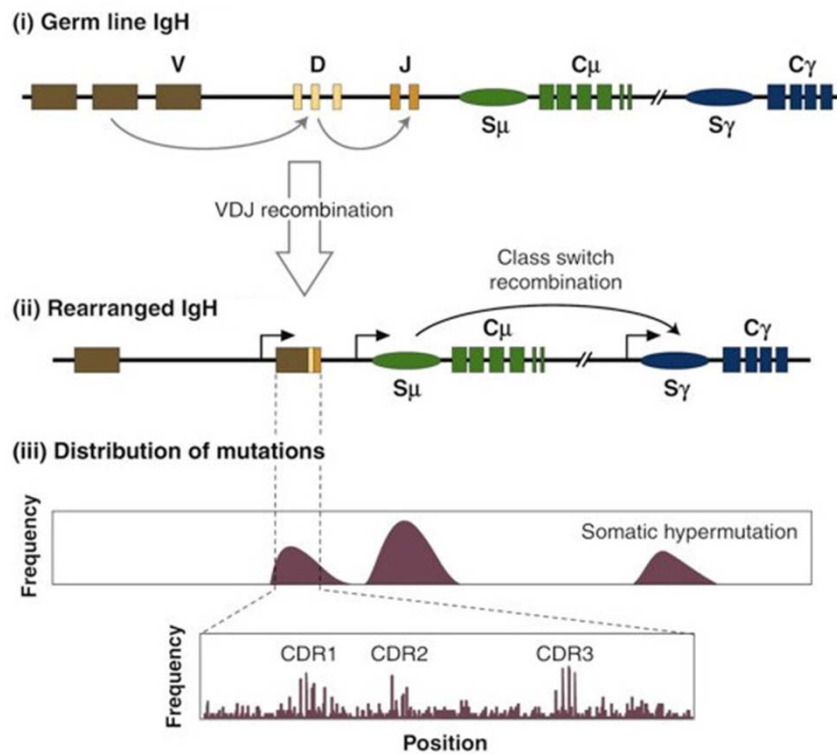
4) Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση

Οι τρεις μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας που αναπτύχθηκαν παραπάνω συμβαίνουν κατά την παραγωγή ενός πλήρους λειτουργικού μορίου BcR. Ειδικά στα B λεμφοκύτταρα λειτουργεί κι ένας τέταρτος μηχανισμός, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (SYM), που ενεργοποιείται με την επαφή του BcR με το αντιγόνο και εισάγει μεταλλάξεις στις μεταβλητές περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας με σκοπό τη βελτίωση της συγγένειας του BcR με το αντιγόνο. Τα B λεμφοκύτταρα των οποίων ο υποδοχέας έχει αποκτήσει το πρότυπο μεταλλάξεων που ευνοεί την καλύτερη δυνατή πρόσδεση με το αντιγόνο επιλέγονται για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, μια διεργασία που καλείται ωρίμανση συγγένειας (affinity maturation).

Η συχνότητα εισαγωγής σωματικών μεταλλάξεων μέσω SYM κυμαίνεται από 10^{-5} έως 10^{-3} /bp/κυτταρική γενιά, είναι δηλαδή σαφώς μεγαλύτερη από τη συχνότητα αυθόρμητων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα ενός φυσιολογικού ανθρώπινου κυττάρου (10^{-9} - 10^{-11}), γι' αυτό και η διεργασία καλείται «υπερμεταλλαξιγένεση»¹⁸.

Η SYM κυρίως εισάγει σημειακές μεταλλάξεις, ενώ σπανιότερα μπορεί να προκαλεί ενθέσεις και απαλοιφές DNA (insertions/deletions). Εισαγωγή μεταλλάξεων συμβαίνει τόσο σε λειτουργικές όσο και σε μη λειτουργικές αναδιατάξεις. Ωστόσο, στις μη λειτουργικές αναδιατάξεις οι μεταλλάξεις παρουσιάζουν τυχαία κατανομή, ενώ στις λειτουργικές αναδιατάξεις τείνουν να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές που παίζουν μεγαλύτερο λειτουργικό ρόλο στην αναγνώριση του αντιγόνου. Συγκεκριμένα, οι περιοχές CDR χαρακτηρίζονται από την εισαγωγή μεταλλάξεων αντικατάστασης (replacement mutations, R), ενώ στις περιοχές πλαισίου επικρατούν οι «σιωπηρές» μεταλλάξεις¹⁹ (silent mutations, S) (**Error! Reference source not found.**).

Ο μηχανισμός της ΣΥΜ στοχεύει κατά προτίμηση νουκλεοτίδια G και C και συνηθέστερα οδηγεί σε μεταβάσεις (transitions) σε σχέση με τις μεταπτώσεις (transversions). Επίσης, παρουσιάζει επιλεκτική στόχευση συγκεκριμένων κωδικονίων των γονιδίων V. Οι θέσεις αυτές είναι γνωστές ως «επίκεντρα» εισαγωγής μεταλλάξεων (mutational hotspots) και συνηθέστερα είναι μοτίβα τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων, π.χ. RGYW, WYGR και GNW (R: πουρίνη, Y: πυριμιδίνη, W: A ήT)^{20,21}.



Εικόνα 5. Συχνότητα εισαγωγής σωματικών υπερμεταλλάξεων στο γενετικό τόπο IGH.
Προσαρμογή από Di Noia JM and Neuberger MS, Annu Rev Biochem 2007;76:1

Η ΣΥΜ στηρίζεται στο ένζυμο δεαμινάση της κυτιδίνης (activation-induced cytidine deaminase, AID) που μετατρέπει την κυτοσίνη (C) σε ουρακίλη (U) και στη δράση πολυμερασών που είναι επιρρεπείς σε λάθη (error-prone polymerases). Στον άνθρωπο, η AID κωδικοποιείται από το γονίδιο *HIGM2* που εκφράζεται μόνο στα Β λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν έλθει σε επαφή με αντιγόνο, και κατεξοχήν στα Β λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου.

Ο ακριβής μηχανισμός της ΣΥΜ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ωστόσο φαίνεται ότι πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο η AID απαμινώνει τις C του DNA-στόχου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη κανονικών ζευγών βάσεων U-G. Τα ζεύγη U-G απαλείφονται κι επιδιορθώνονται μέσω της οδού εκτομής βάσεων (σύντομη επιδιόρθωση, short-patch base-pair excision). Εναλλακτικά, η επιδιόρθωση των μη κανονικών ζευγών πραγματοποιείται κατά το δεύτερο στάδιο, μέσω της οδού εκτεταμένης επιδιόρθωσης (long-patch base-pair excision), όπου συμμετέχουν πολυμεράσες επιρρεπείς σε λάθη^{22,23}.

Η ΣΥΜ αυξάνει εκθετικά την ποικιλότητα του ρεπερτορίου των BcR IGs. Συνολικά, χάρη στους τέσσερις μηχανισμούς δημιουργίας ποικιλότητας που προαναφέρθηκαν [συνδυαστική ετερογένεια λόγω ανασυνδυασμού V-(D)-J και συνδυασμού ελαφριών-βαριών αλυσίδων, συνδυαστική ετερογένεια στα σημεία συμβολής των γονιδίων V-(D)-J, και ΣΥΜ], το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου είναι σε θέση να παράγει, τουλάχιστον θεωρητικά, περίπου 10^{12} διαφορετικές BcR IGs.

Μηχανισμοί διαφοροποίησης των T-κυτταρικών υποδοχέων

Στα T λεμφοκύτταρα λειτουργούν παραπλήσιοι μηχανισμοί δημιουργίας ετερογένειας με αυτούς που προαναφέρθηκαν για τα B λεμφοκύτταρα, με την εξαίρεση της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης. Συγκεκριμένα, αξιοποιείται η συνδυαστική ετερογένεια [ανασυνδυασμός V-(D)-J και συνδυασμός α/β ή γ/δ αλυσίδας] και η συνδυαστική ετερογένεια στα σημεία συμβολής των γονιδίων V-(D)-J¹.

Μολονότι οι κοινές προγονικές μορφές των λεμφοκυττάρων βρίσκονται στο μυελό των οστών, η διαφοροποίηση προς T λεμφοκύτταρα ξεκινά στο θύμο παράλληλα με τον ανασυνδυασμό των γονιδίων V-(D)-J, ο οποίος εξελίσσεται με ιεραρχική σειρά. Αρχικά συμβαίνουν αναδιατάξεις των γονιδίων της β, γ και δ αλυσίδας. Τα κύτταρα στα οποία συμβαίνουν επιτυχημένες αναδιατάξεις των γονιδίων της γ και δ αλυσίδας παράγουν ένα λειτουργικό TRγδ ο οποίος μεταβιβάζει σήματα για την περαιτέρω διαφοροποίησή τους προς τη σειρά γδ και εξέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος χωρίς να εκφράζουν CD4 ή CD8 (double negative). Σε κύτταρα όπου έχει συμβεί επιτυχής αναδιάταξη των γονιδίων της β αλυσίδας, η παραγόμενη β αλυσίδα συνδυάζεται μ' ένα υποκατάστατο πεπτιδίου της α αλυσίδας (pTα). Στη συνέχεια αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, εκφράζουν CD4 και CD8 (double positive) και προχωρούν σε αναδιάταξη των γονιδίων της α αλυσίδας, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ενός λειτουργικού TRαβ. Στο τελικό στάδιο, τα κύτταρα εκφράζουν είτε CD4 είτε CD8 (single positive) και εξέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το εύρος της συνδυαστικής ετερογένειας είναι πολύ μικρότερο στους TRγδ, λόγω σαφώς μικρότερου αριθμού λειτουργικών γονιδίων V-(D)-J.

Οντογένεση των B λεμφοκυττάρων

Η οντογένεση των B λεμφοκυττάρων ξεκινά στο μυελό των οστών και πραγματοποιείται με ιεραρχική σειρά. Συγκεκριμένα, κάθε στάδιο διαφοροποίησης ακολουθεί τη διεργασία ανασυνδυασμού γονιδίων για την παραγωγή λειτουργικού BcR, ενώ παράλληλα συνοδεύεται από την έκφραση κατάλληλων προσαρμοστικών μορίων και υποδοχέων στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων B λεμφοκυττάρων.

Μολονότι κάθε B λεμφοκύτταρο φέρει στο γονιδίωμα του δύο αλληλόμορφα για καθέναν από τους γενετικούς τόπους της βαριάς αλυσίδας (IGH) και των ελαφριών αλυσίδων (IGK/IGL), τελικά εκφράζει στην επιφάνεια του ένα μοναδικό μόριο ανοσοσφαιρίνης χάρη στη λειτουργία του μηχανισμού αποκλεισμού αλληλόμορφου (allelic exclusion). Αυτός ο μηχανισμός βασίζεται στη χρονική καθυστέρηση που μεσολαβεί ανάμεσα στο ανασυνδυασμό του ενός και του άλλου αλληλόμορφου. Συγκεκριμένα, αν πραγματοποιηθεί επιτυχώς η αναδιάταξη του ενός αλληλόμορφου, το προϊόν αναστέλλει πλήρως τον ανασυνδυασμό στο άλλο αλληλόμορφο.

Κατά την οντογένεση, αρχικά πραγματοποιείται ανασυνδυασμός στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας. Η παραγωγή λειτουργικής αναδιάταξης οδηγεί σε ανασυνδυασμό στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων (αρχικά στον IGK κι έπειτα, αν η αναδιάταξη του IGK αποτύχει και στα δύο αλληλόμορφα, στον IGL). Η αποτυχία παραγωγής λειτουργικής αναδιάταξης είτε βαριάς είτε ελαφριάς αλυσίδας οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση λόγω αδυναμίας παραγωγής λειτουργικού BcR²⁴⁻²⁶. Η έκφραση λειτουργικού BcR στην επιφάνεια του B λεμφοκυττάρου σηματοδοτεί την παύση περαιτέρω ανασυνδυασμών^{27,28}.

1. Φάση διαφοροποίησης ανεξάρτητη από το αντιγόνο

Η διαφοροποίηση των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (pluripotent hematopoietic stem cells, PHSCs) σε B λεμφοκύτταρα πραγματοποιείται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, τα κύτταρα του οποίου παρέχουν απαραίτητα σήματα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανσή τους. Αρχικά τα PHSCs διαφοροποιούνται (χάνοντας ταυτόχρονα και την ικανότητα αυτοανανέωσης) προς πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (multipotential progenitors, MPPs), από τα οποία προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος. Η διαφοροποίηση των MPPs οδηγεί στο κοινό προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς (common myeloid progenitor, CMP) και το πρώιμο προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς (early lymphoid progenitor, ELP). Τα κύτταρα ELP εκφράζουν τα ένζυμα RAG1 και RAG2, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έναρξη ανασυνδυασμού στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας²⁹. Η έναρξη του ανασυνδυασμού μεταξύ των γονιδίων IGHD και IGHJ σηματοδοτεί το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης του ELP προς πρώιμο προ-προ-B λεμφοκύτταρο, ενώ η αναδιάταξη ενός γονιδίου IGHV με το σύμπλοκο IGHD-IGHJ σηματοδοτεί το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης προς όψιμο προ-προ-B λεμφοκύτταρο. Εάν δεν επιτευχθεί παραγωγική αναδιάταξη IGHV-IGHD-IGHJ, τα προ-προ-B λεμφοκύτταρα υφίστανται απόπτωση και φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα του μυελού των οστών. Εάν η αναδιάταξη είναι παραγωγική, το κύτταρο διαφοροποιείται σε μεγάλο προ-B λεμφοκύτταρο I (large pre B-cell I), εκφράζοντας στην επιφάνεια του τον οικουμενικό B δείκτη CD19³⁰. Σε αυτό το στάδιο, το ένζυμο TdT παύει να εκφράζεται και η βαριά αλυσίδα βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Στο επόμενο στάδιο [μεγάλο προ-B λεμφοκύτταρο II (large pre-B cell II)], το κύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του τον προ-B υποδοχέα (pre-BCR), που αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα ισοτύπου μ σε συνδυασμό με μια «υποκατάστατη» ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain, SLC), καθώς και τους συνυποδοχείς (co-receptors) Ig α και Ig β ³¹⁻³³. Τα κύτταρα που αποτυγχάνουν να δημιουργήσουν σύμπλοκο βαριάς αλυσίδας/υποκατάστατης ελαφριάς αλυσίδας υφίστανται απόπτωση, εκτός αν κατορθώσουν να διασωθούν με δευτερογενή ανασυνδυασμό και διόρθωση υποδοχέα (receptor editing)³⁴. Τα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον pre-BcR λαμβάνουν μέσω αυτού σήματα επιβίωσης, καθώς και διαφοροποίησης σε μικρά προ-B λεμφοκύτταρα (small pre-B cells). Σε αυτό το στάδιο παύει η μεταγραφή των γονιδίων της SLC, ενώ τα γονίδια RAG που είχαν προσωρινά κατασταλεί επανενεργοποιούνται για την αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων. Αρχικά επιχειρείται ο ανασυνδυασμός στο γενετικό τόπο IGK. Σε περίπτωση μη παραγωγικής αναδιάταξης και στα δύο αλληλόμορφα, ανασυνδυάζονται τα γονίδια της λ ελαφριάς αλυσίδας. Τελικά, η ελαφριά αλυσίδα (κ ή λ) που παράγεται συνδέεται με τη βαριά αλυσίδα μ και το

σύμπλοκο εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ως μονομερές μόριο BcR, σηματοδοτώντας το επόμενο στάδιο ωρίμανσης (ανώριμο B λεμφοκύτταρο, immature B-cell)^{34,35}.

2. Φάση διαφοροποίησης εξαρτώμενη από το αντιγόνο

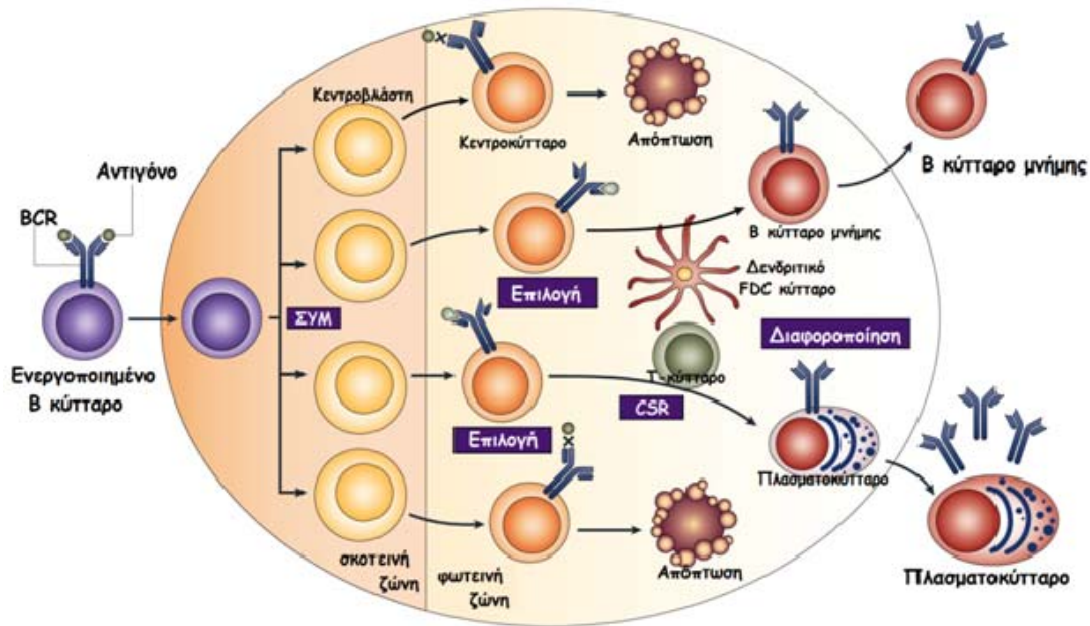
Μόλις τα B λεμφοκύτταρα εκφράσουν στην επιφάνειά τους BcR, προχωρούν σε έλεγχο αυτο-ανοχής και στη συνέχεια, ως παρθένα B λεμφοκύτταρα (naive B cells), μετακινούνται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος προς τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Η πρόσδεση αντιγόνου σε συνδυασμό με κατάλληλα σήματα ενεργοποίησης από το μικροπεριβάλλον σε περιοχές των δευτερογενών λεμφικών οργάνων (λεμφοζίδια) στις οποίες συμβαίνουν εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ B, T και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen-presenting cells, APCs) οδηγούν στον πολλαπλασιασμό τους. Επτά έως 10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση, διαμορφώνονται ειδικές δομές που καλούνται βλαστικά κέντρα (germinal centers)³⁶.

ι. Το βλαστικό κέντρο

Το βλαστικό κέντρο αποτελεί παροδική δομή που σχηματίζεται στα περιφερικά λεμφικά όργανα στα πλαίσια της άνοσης απάντησης σε θυμοεξαρτώμενο αντιγόνο (T-cell dependent antigen). Στο βλαστικό κέντρο συμβαίνει η διεργασία ωρίμανσης συγγένειας των BcR με το αντιγόνο που αναγνωρίζουν (affinity maturation), η εναλλαγή ιστοτύπου (class-switch recombination) και η διαφοροποίηση των αντίστοιχων λεμφοκυττάρων προς πλασματοκύτταρα και κύτταρα μνήμης. Πράγματι, η αδυναμία σχηματισμού βλαστικών κέντρων οδηγεί σε εκδήλωση σοβαρών συνδρόμων ανοσοανεπάρκειας.

Σύμφωνα με κλασικούς ιστοπαθολογικούς ορισμούς, το βλαστικό κέντρο αποτελείται από μια σκοτεινή ζώνη (dark zone), που περιέχει σχεδόν αποκλειστικά B λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο και πολλαπλασιάζονται γρήγορα (κεντροβλάστες), και μια φωτεινή ζώνη (light zone) που περιέχει B λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular dendritic cells, FDCs), T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Στη σκοτεινή ζώνη οι κεντροβλάστες υπόκεινται στη διεργασία της ΣΥΜ, ενώ στη φωτεινή ζώνη επιλέγονται με βάση τη συγγένεια των υποδοχέων τους με το αντιγόνο (affinity maturation). Η διαδικασία της ωρίμανσης των B κυττάρων συνεχίζεται με διαδοχικούς κύκλους (re-entries) μεταξύ φωτεινής και σκοτεινής ζώνης, κατά τους οποίους τα GC B κύτταρα της φωτεινής ζώνης, αφού υποβληθούν σε θετική επιλογή με βάση τη συγγένεια του BcR με το αντιγόνο, επιστρέφουν στη σκοτεινή ζώνη για να υποβληθούν εκ νέου σε ΣΥΜ και πολλαπλασιασμό κ.ο.κ.

Τελικά, με μοριακούς μηχανισμούς που δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένοι, τα B λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας για το αντιγόνο εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή B λεμφοκύτταρα μνήμης. Τα B λεμφοκύτταρα που δεν επιλέγονται κατά τον έλεγχο συγγένειας υφίστανται απόπτωση στο βλαστικό κέντρο³⁷ (**Εικόνα**).



Εικόνα 6: Το βλαστικό κέντρο. Προσαρμογή από Klein U and Dalla-Favera R, *Nature Reviews Immunology* 2008;8:22-23

Υποκατηγορίες Β λεμφοκυττάρων

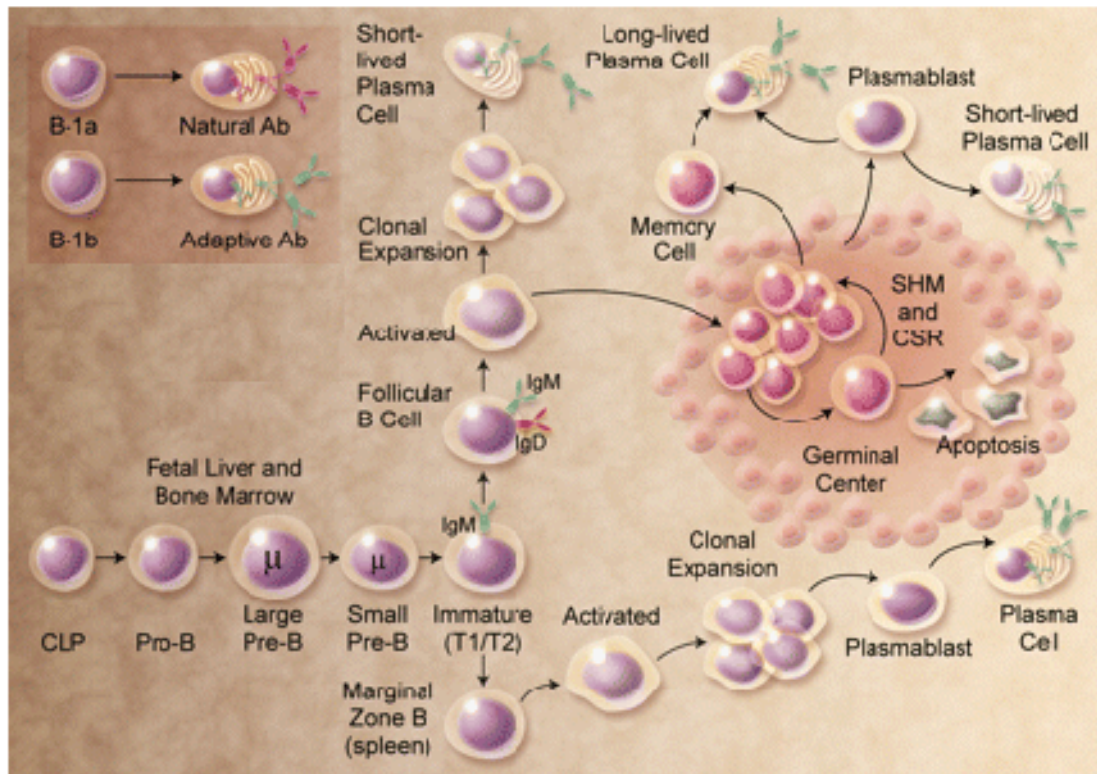
B2 λεμφοκύτταρα

Τα B2 (ή θυλακιώδη, follicular-FO) λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στις θυμοεξαρτώμενες απαντήσεις (T cell-dependent, TD) της προσαρμοστικής ανοσίας. Κυκλοφορούν στο αίμα και τη λέμφο και αθροίζονται στα λεμφοζύδια (follicles) των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, όπου αναγνωρίζουν αντιγόνα πρωτεϊνικής φύσης και εισέρχονται σε αντιδράσεις βλαστικού κέντρου (σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, ωρίμανση συγγένειας όπου επιλέγονται και πολλαπλασιάζονται μόνο τα Β λεμφοκύτταρα που λαμβάνουν έντονο σήμα ενεργοποίησης μέσω ισχυρής πρόσδεσης του αντιγόνου, και εναλλαγή ισότυπου). Τελικά, τα κύτταρα εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες ή κύτταρα μνήμης που μεταναστεύουν στο μυελό των οστών κι επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα³⁷⁻³⁹ (Error! Reference source not found.).

Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (MZ)

Τα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (MZ cells) κατά πολλούς θεωρούνται υποκατηγορία των B2 λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, έχουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο, ιδιαίτερη μορφολογία, συγκεκριμένη ανατομική εντόπιση και φαίνεται να εξυπηρετούν ειδικούς λειτουργικούς σκοπούς της προσαρμοστικής ανοσίας. Ο φαινότυπός τους αντιστοιχεί σε ώριμα Β λεμφοκύτταρα χωρίς εναλλαγή ισότυπου με ασθενή έκφραση επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgD ($IgM^{high}IgD^{low}CD23^{-}CD21^{+}CD1c^{+}$). Παρουσιάζουν επιλεκτικότητα στη χρήση γονιδίων ανοσοσφαιρινών. Είναι λίγο μεγαλύτερα από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα, με ομαλό πυρηνικό περίγραμμα και μέτρια αυξημένο, διαυγές κυτταρόπλασμα. Καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος της οριακής ζώνης του σπλήνα και συμμετέχουν σε άνοσες απαντήσεις εναντίον αντιγόνων τύπου TI-2, όπως

οι πολυσακχαρίτες της κάψας βακτηριδίων που φτάνουν στο σπλήνα με την κυκλοφορία του αίματος^{40,41}.



Εικόνα 7: Οντογένεση και ιδιαίτερες λειτουργίες των B λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών (Προέλευση LeBien, TW et al. Blood; 2008)

Τα MZ B λεμφοκύτταρα εκφράζουν ένα συνδυασμό σηματοδοτικών μορίων που τους επιτρέπει ν' αντιδρούν πολύ ταχύτερα από τα υπόλοιπα B2 λεμφοκύτταρα του σπλήνα μετά την αναγνώριση αντιγόνου και να διαφοροποιούνται άμεσα (μέσα σε 3-4 ημέρες) σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgM^{42,43}. Η ικανότητά τους να ενεργοποιούνται ακόμη και με ασθενή σηματοδότηση μέσω του BcR (είτε λόγω ελαττωμένης συγγένειας πρόσδεσης με το αντιγόνο είτε λόγω μικρού αντιγονικού φορτίου) επιτρέπει την ανάπτυξη μιας γρήγορης άνοσης απάντησης σ' ευρύ φάσμα παθογόνων που έχουν εισέλθει στην αιματική κυκλοφορία^{44,45}.

Τα MZ B λεμφοκύτταρα πληθυσμοποιούν την οριακή ζώνη του σπλήνα στην ηλικία των 2 ετών. Ωστόσο, IgM⁺IgD⁺ B λεμφοκύτταρα με φαινότυπο MZ B λεμφοκυττάρων έχουν εντοπιστεί και στο αίμα παιδιών <2 ετών⁴⁶. Συνολικά, η οντογένεση αυτής της υποκατηγορίας λεμφοκυττάρων δεν είναι καλά καθορισμένη.

B1 λεμφοκύτταρα

Οι περισσότερες πληροφορίες γι' αυτή την υποκατηγορία B λεμφοκυττάρων προέρχονται από μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα τρωκτικών⁴⁷. Στα τρωκτικά, τα B1 λεμφοκύτταρα εντοπίζονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα και τον υπεζωκότα. Έχουν φαινότυπο IgM^{high}IgD^{low}CD43⁺CD11b⁺CD45^{low} και διαχωρίζονται περαιτέρω σε CD5⁺, B-1a κύτταρα και CD5⁻, B-1b κύτταρα. Φαίνεται πως συμμετέχουν σε θυμοανεξάρτητες (T cell-independent, TI) άνοσες απαντήσεις μέσω έκκρισης ανοσοσφαιρινών IgM εναντίον

συντηρημένων βακτηριακών επιτόπων, π.χ. της φωσφορυλοχολίνης. Χαρακτηρίζονται από επιλεκτικότητα ρεπερτορίου IGs που σπάνια φέρουν σωματικές υπερμεταλλάξεις. Η ενεργοποίησή τους μπορεί να γίνει χωρίς την πρόσδεση αντιγόνου, πιθανόν μέσω των υποδοχέων τύπου Toll. Στην περίπτωση αυτή, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε βραχύβια πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ολιγο-/πολυαντιδραστικές ανοσοσφαιρίνες IgM. Η οντογενετική προέλευσή τους δεν έχει διευκρινιστεί, ωστόσο οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν την ύπαρξη ξεχωριστού προγονικού κυττάρου της εμβρυϊκής ζωής, ενώ τελευταία έχει διατυπωθεί και η θεωρία της κλιμακωτής οντογένεσης που συμβαίνει κατά κύματα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη αντίστοιχου πληθυσμού και στον άνθρωπο, με φαινότυπο CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη ενός τέτοιου υποπληθυσμού B λεμφοκυττάρων θα εξυπηρετούσε την ταχεία ανάπτυξη βραχύβιων άνοσων απαντήσεων έναντι ενός περιορισμένου συνόλου παθογόνων με κοινές, συντηρημένες δομές, παραλείποντας το στάδιο ωρίμανσης συγγένειας και αποτελώντας ουσιαστικά ένα λειτουργικό ενδιάμεσο έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Εξάλλου, τέτοιου τύπου κύτταρα μπορεί να παράγουν αυτο-αντιδραστικές ανοσοσφαιρίνες IgM που συμμετέχουν στη διεργασία εκκαθάρισης αποπτωτικών κυττάρων. Συνεπώς, η ύπαρξη ενός παράλληλου μονοπατιού οντογένεσης που αποκλείει αυτοαντιδραστικά κύτταρα από αντιδράσεις του βλαστικού κέντρου θα εξυπηρετούσε ώστε να ελαττώνει την πιθανότητα δημιουργίας αυτο-αντιδραστικών μνημονικών B λεμφοκυττάρων υψηλής συγγένειας^{40,42,48}.

Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Γενικά

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL) είναι η συχνότερη λευχαιμία των ενηλίκων του Δυτικού κόσμου. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής η επίπτωσή της στο γενικό πληθυσμό ανέρχεται σε 4.6/100.000 κατοίκους, εκτιμάται δε ότι το 2016 θα διαγνωστούν με CLL περίπου 19.000 άνθρωποι, ενώ περίπου 4.600 θα πεθάνουν από αυτή (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>). Εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, με αναλογία 1,7:1. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι ~72 έτη, και η επίπτωση αυξάνει με την ηλικία.^{49,50} Γι' αυτό, αναμένεται ότι τόσο η επίπτωσή της CLL όσο και η νοσηρότητα/θνητότητα που τη συνοδεύει θα αυξηθούν στις επόμενες δεκαετίες παράλληλα με την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης του γενικού πληθυσμού. Εξάλλου, αναμένεται να αυξηθεί και ο αριθμός των ασθενών που διαγιγνώσκονται σε νεότερη ηλικία με ελαφρά ή καθόλου συμπτώματα, λόγω της ευρύτερης διάδοσης των ελέγχων ρουτίνας με γενική αίματος.⁵¹

Η CLL είναι νεόπλασμα των ώριμων B λεμφοκυττάρων και χαρακτηρίζεται από την κλωνική έκπτυξη και προοδευτική συσσώρευσή τους στο αίμα, το μυελό των οστών, σε λεμφαδένες και άλλα λεμφικά όργανα, όπως ο σπλήνας. Τα νεοπλασματικά B λεμφοκύτταρα έχουν χαρακτηριστικό ομοιογενή ανοσοφαινότυπο, που τυπικά περιλαμβάνει έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD5 και CD23 και ασθενή έκφραση επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης (IG), CD20 και CD79b.⁵² Ωστόσο, η CLL εμφανίζει αξιοσημείωτη κλινική ετερογένεια, με κάποιους ασθενείς να παρουσιάζουν επιθετική μορφή της νόσου που απαιτεί θεραπεία αμέσως ή σύντομα μετά τη διάγνωση, γίνεται

γρήγορα χημειοανθεκτική και οδηγεί σε ολική επιβίωση 2-3 έτη, και άλλους να ακολουθούν ήπια κλινική πορεία που μπορεί να μη χρειαστεί ποτέ θεραπεία⁵³.

Αυτή η ετερογένεια πιθανώς αντανάκλα την (αλληλ)επίδραση πολλών παραγόντων, που καθιστούν τη CLL πρότυπο καρκίνου όπου η κακοήθης εξαλλαγή και η εξέλιξη του νεοπλασματικού κλώνου προκύπτουν από συνδυασμό ενδογενών (cell-intrinsic) και εξωγενών (cell-extrinsic) παραγόντων⁵⁴. Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται κλασικοί ογκογενετικοί μηχανισμοί π.χ. ενεργοποίηση ογκογονιδίων (π.χ. *NOTCH1*) ή/και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *TP53* και *ATM*). Τέτοιου τύπου βλάβες μπορεί να επηρεάζουν καθοριστικά την πρόγνωση της νόσου, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τις βλάβες του γονιδίου *TP53*⁵⁵⁻⁵⁷. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται κυρίως σήματα του μικροπεριβάλλοντος που μεταδίδονται μέσω αντίστοιχων υποδοχέων στο εσωτερικό του νεοπλασματικού κυττάρου⁵⁸⁻⁶⁰.

Πλειάδα ενδείξεων συνηγορούν ότι η κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη του Β-κυτταρικού υποδοχέα (BcR IG) παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της CLL⁶¹. Ήδη από τη δεκατία του 1990 υπήρχαν μελέτες που έδειχναν ότι ένα ποσοστό περιπτώσεων CLL εκφράζουν BcR IG με σωματικές υπερμεταλλάξεις (somatic hypermutations, SHM), υποδεικνύοντας ότι τα Β κύτταρα της CLL μπορεί να έχουν έλθει σε επαφή με αντιγόνο⁶². Λίγο αργότερα, δύο κομβικές μελέτες έδειξαν ότι η CLL διακρίνεται σε δύο προγνωστικές κατηγορίες με βάση το φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας (IGHV) της κλωνοτυπικής BcR IG. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με λίγες ή καθόλου σωματικές υπερμεταλλάξεις του γονιδίου IGHV ($\geq 98\%$ ταυτότητα με τη βλαστική σειρά, "unmutated" CLL, U-CLL) έχουν πολύ δυσμενέστερη πρόγνωση από αυτούς με περισσότερες σωματικές υπερμεταλλάξεις ($< 98\%$ ταυτότητα με τη βλαστική σειρά, "mutated" CLL, M-CLL)^{63,64}. Μολονότι η προγνωστική σημασία του φορτίου σωματικών υπερμεταλλάξεων έχει επιβεβαιωθεί σε όλες τις προοπτικές μελέτες που ακολούθησαν, δεν αποτελεί δογματική διχοτόμηση της CLL σε δύο κατηγορίες, υπό την έννοια ότι υπάρχουν περιπτώσεις με μεταλλαγμένες BcR IG που μπορεί να παρουσιάσουν πρόοδο νόσου, ανάγκη θεραπείας, ή και ανθεκτικότητα στη θεραπεία και τελικά να καταλήξουν από το νόσημα⁶⁵.

Το φορτίο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς προγνωστικούς δείκτες στη CLL, ανεξαρτήτως σταδίου νόσου ή άλλων βιοδεικτών⁶⁶. Μάλιστα, είναι δείκτης που παραμένει σταθερός στο χρόνο, σε αντίθεση με άλλους προγνωστικούς/προβλεπτικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων γενετικών βλαβών, που επηρεάζονται ή αντανάκλουν την κλωνική εξέλιξη της νόσου^{56,67}. Κατά συνέπεια, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η ανοσογενετική ανάλυση της CLL υπήρξε ιδιαίτερα αποκαλυπτική τόσο σε σχέση με την παθοφυσιολογία της νόσου, όσο και για κλινικούς/διαγνωστικούς σκοπούς.

Καθώς ολοένα και περισσότερες χαρακτηρισμένες κλωνοτυπικές αλληλουχίες από ασθενείς με CLL γίνονταν διαθέσιμες, έγινε αντιληπτό ότι διαφορετικοί ασθενείς εξέφραζαν πανομοιότυπες ή ταυτόσημες BcR IG. Αυτό το φαινόμενο καλείται στερεοτυπία του Β-κυτταρικού υποδοχέα και αποτελεί τη ισχυρότερη ένδειξη επιλογής του κλώνου από περιορισμένο αριθμό αντιγονικών επιτόπων.⁶⁸ Μάλιστα, ασθενείς που εκφράζουν παρόμοιες BcR IG και κατατάσσονται στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο φαίνεται πως χαρακτηρίζονται από παρόμοια κλινική πορεία, γεγονός που υπογραμμίζει

τη σημασία της αντιγονικής διέγερσης μέσω του κλωνοτυπικού BcR για την παθοφυσιολογία της νόσου.⁶⁸

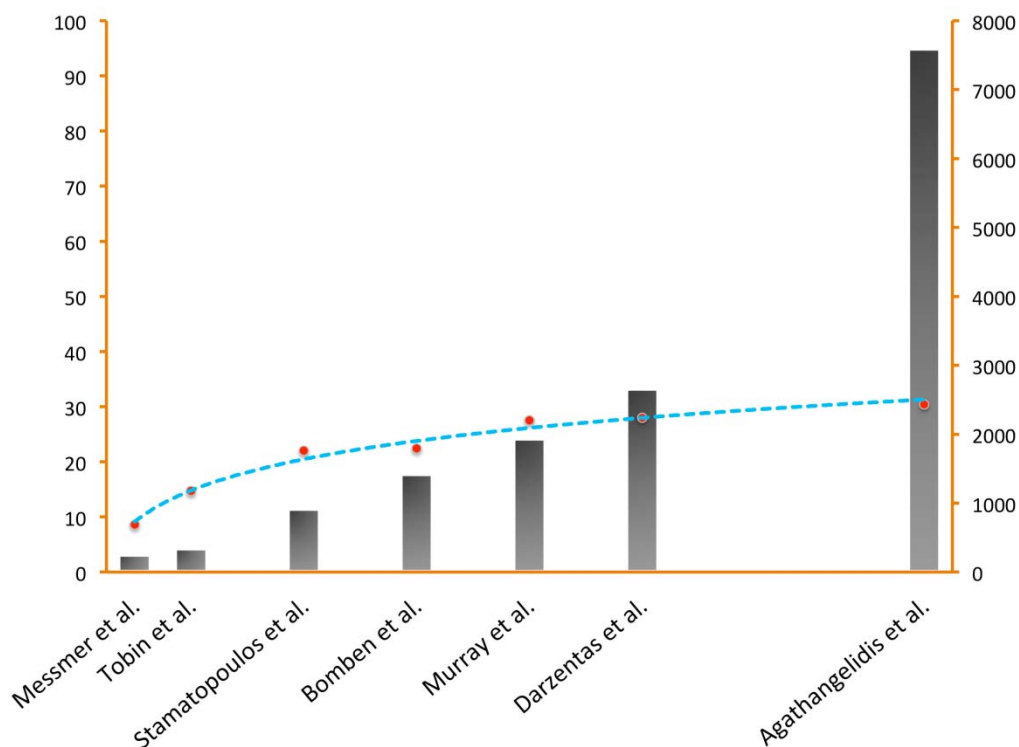
Οι παραπάνω παρατηρήσεις πυροδότησαν εντατική έρευνα στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν το μονοπάτι σηματοδότησης του BcR. Πράγματι, αναστολείς του BcR που δοκιμάστηκαν πρόσφατα σε κλινικές μελέτες φάσης III είχαν τόσο εντυπωσιακή αποτελεσματικότητα, ακόμη και σε χημειοανθεκτικές περιπτώσεις με δυσμενείς προγνωστικούς/προβλεπτικούς δείκτες, ώστε έλαβαν πρώιμες εγκρίσεις από τις αρμόδιες αρχές για εφαρμογή στην κλινική πράξη^{69,70}.

Συνολικά, όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την επιλογή των κλώνων CLL από αντιγόνο(-α). Η φύση αυτών των αντιγόνων δεν έχει σαφώς διευκρινιστεί. Μέχρι πρότινος, οι σχετικές μελέτες υποδείκνυαν την εμπλοκή εξωγενών αντιγόνων ή/και αυτοαντιγόνων,⁷¹ ωστόσο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα κύτταρα της CLL επίσης λειτουργούν στα πλαίσια ενός μοντέλου αυτόνομης σηματοδότησης, αναγνωρίζοντας επιτόπους της ίδιας της κλωνοτυπικής BcR IG (cell-autonomous signaling)⁷². Ακόλουθη μελέτη στο διαγονιδιακό μοντέλου ποντικού Εμ-TCL1 έδειξε ότι η αυτόνομη σηματοδότηση μέσω αλληλεπίδρασης μορίων BcR μεταξύ τους αποτελεί οικουμενικό χαρακτηριστικό των BcR IG της CLL. Αξίζει να σημειωθεί ότι το είδος αλληλεπίδρασης φάνηκε να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου⁷³. Μάλιστα, συνδυασμένες μοριακές και λειτουργικές αναλύσεις έδειξαν ότι διαφορετικές CLL BcR IG πραγματοποιούν ομότυπες αλληλεπιδράσεις αναγνωρίζοντας διακριτούς επιτόπους και μεταβιβάζουν ενδοκυττάρια σήματα. Η ισχύς της ομότυπης αλληλεπίδρασης φαίνεται να σχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου, καθότι σε ασθενείς ευνοϊκής πρόγνωσης παρατηρήθηκε σταθερή, παρατεταμένη σύνδεση, ενώ σε ασθενείς με επιθετική νόσο παρατηρήθηκαν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις⁷³. Συνεπώς, η CLL μπορεί να χαρακτηρίζεται από διαφορετικά πρότυπα σηματοδότησης, τα οποία πιθανόν μεταφράζονται σε κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά του κακοήθους κλώνου.

Στερεοτυπία του Β-κυτταρικού υποδοχέα στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Τα κριτήρια για την κατάταξη αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ σε στερεότυπο υποσύνολο BcR IG απαιτούν: (i) χρήση του ίδιου γονιδίου IGHV, ή γονιδίων IGHV που ανήκουν στην ίδια φυλογενετική κατηγορία (I, II, ή III), (ii) ίδιο μήκος VH CDR₃, (iii) ταύτιση αμινοξέων VH CDR₃ κατά 50%, και ταύτιση κατά 70% ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, και (iv) ίδια αφετηρία των συντηρημένων μοτίβων εντός της VH CDR₃.⁷⁴ Αυτού του είδους η ανάλυση γίνεται με τη χρήση εξειδικευμένων εργαλείων πληροφορικής που αξιοποιούν αλγορίθμους αναγνώρισης μοτίβων (pattern discovery) κι εφαρμόζουν ομαδοποίηση σε διαδοχικά ιεραρχικά επίπεδα (hierarchical clustering)⁷⁵.

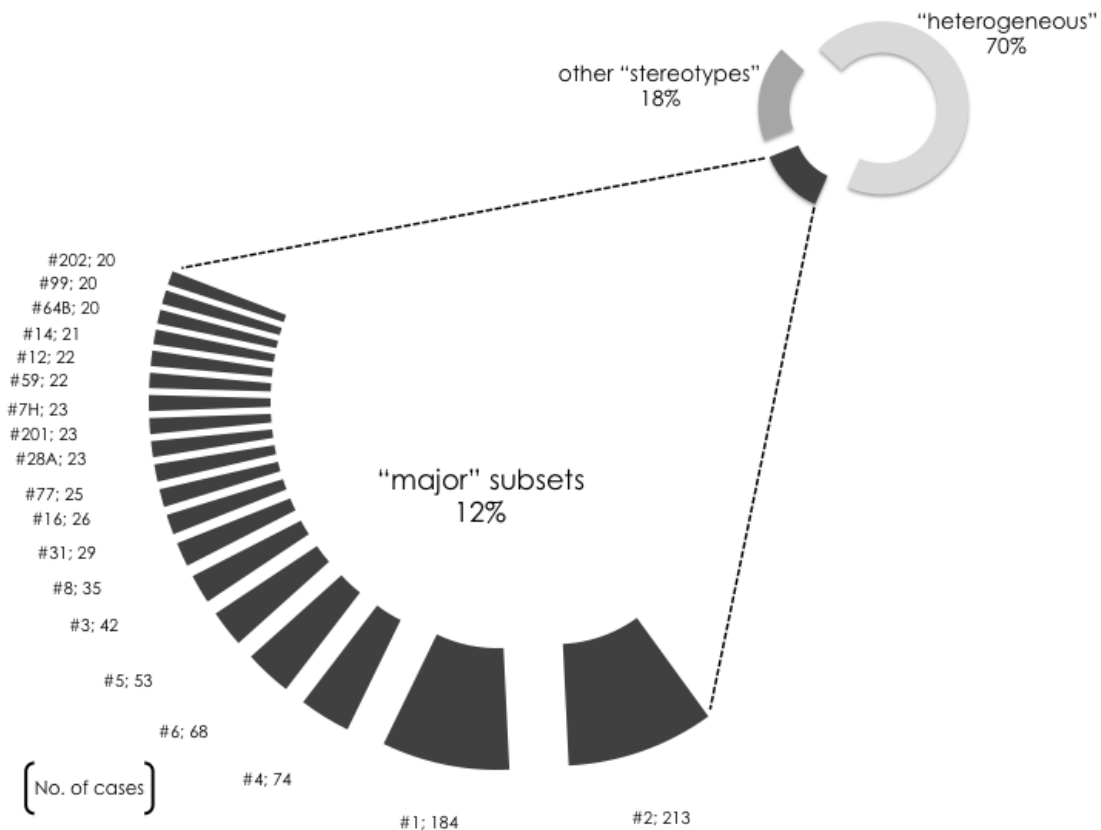
Εφαρμογή αυτών των εργαλείων σε 7,596 αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ ασθενών με CLL έδειξε ότι η πάθηση διακρίνεται σε δύο ανοσογενετικές κατηγορίες: η πρώτη, περίπου το ένα τρίτο του συνόλου, αφορά περιπτώσεις που κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής BcR IG, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει περιπτώσεις με ετερογενείς αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ.⁷⁴ Αυτή η πρόταση βασίστηκε στη διαπίστωση πως το ποσοστό της στερεοτυπίας παρέμενε πρακτικά σταθερό, παρά τη σημαντική αύξηση του αριθμού ασθενών με CLL που συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη σε σχέση με προηγούμενες δημοσιεύσεις (Εικόνα 8).⁷⁵⁻⁷⁸



Εικόνα 8. Η συχνότητα της στερεοτυπίας παρουσιάζει plateau παρά την αύξηση των αναλυόμενων αλληλουχιών CLL.⁷⁴

Η ίδια μελέτη αποκάλυψε την ύπαρξη εκατοντάδων στερεότυπων υποσυνόλων, το καθένα με το δικό του μοναδικό μοτίβο εντός της VH CDR3.⁷⁴ Τα 19 μεγαλύτερα στερεότυπα υποσύνολα αντιπροσώπευαν το 41% όλων των περιπτώσεων CLL με στερεοτυπία, και το 12.4% όλων των ασθενών με CLL (**Εικόνα 9**). Με άλλα λόγια, 1 στους 8 ασθενείς με CLL εκφράζει ένα αρχετυπικό μοτίβο VH CDR3, γεγονός εξαιρετικά αξιοσημείωτο με δεδομένη την πραγματικά απειροελάχιστη πιθανότητα αυτό να συμβαίνει κατά τύχη. Σήμερα, η ανίχνευση στερεοτυπίας μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτόματα με ένα ελεύθερα διαθέσιμο εργαλείο πληροφορικής (<http://www.ericll.org/pages/services/tool>), που αναπτύχθηκε από την ομάδα μας υπό την αιγίδα του European Research Initiative in CLL (ERIC).⁷⁹

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί πως η στερεοτυπία του BcR που χαρακτηρίζει τη CLL είναι ειδική για την πάθηση, όπως προέκυψε από μελέτες που συνέκριναν αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ ασθενών με CLL με αλληλουχίες BcR IG από άλλες κλινικές οντότητες.^{68,76} Εξάλλου, ανοσογενετικές μελέτες μεγάλης κλίμακας τεκμηρίωσαν την παρουσία στερεοτυπίας του BcR και σε άλλα B-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, ιδίως στο λέμφωμα μανδύα (mantle cell lymphoma, MCL)⁸⁰ και στο σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης (splenic marginal-zone lymphoma, SMZL)^{81,82}, αν και σε μικρότερη συχνότητα απ' ό,τι στη CLL. Από αυτές τις μελέτες προέκυψε ότι κάθε κλινική οντότητα παρουσιάζει συνολικά διαφορετικό ανοσογενετικό προφίλ όσον αφορά στη χρήση των γονιδίων IGHV, IGHD και



Εικόνα 9. Δεκαετηρία μείζονα στερεότυπα υποσύνολα εκπροσωπούν σημαντικό ποσοστό της CLL. Το γράφημα αποδίδει τη σχετική συχνότητά τους.⁷⁴

IGHJ, το μήκος και τη σύνθεση των VH CDR₃, και χαρακτηρίζεται από διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα⁷⁴. Λίγες εξαιρέσεις αφορούσαν στερεότυπες BcR IG από λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα που συνδέονται, άμεσα ή έμμεσα, με λοιμώξεις από συγκεκριμένα παθογόνα (π.χ. ιό ηπατίτιδας C - στερεότυπο υποσύνολο #13)⁸³. Με βάση αυτή την παρατήρηση προτείνεται ότι κοινές άνοσες διεργασίες που πυροδοτούνται από παθογόνα μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, επειδή στοχεύονται (i) B κύτταρα σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης, ή (ii) διαφορετικοί υποπληθυσμοί B κύτταρων, ή/και (iii) B κύτταρα που λειτουργούν σε διαφορετικό μικροπεριβάλλον.

Στερεότυπα υποσύνολα CLL

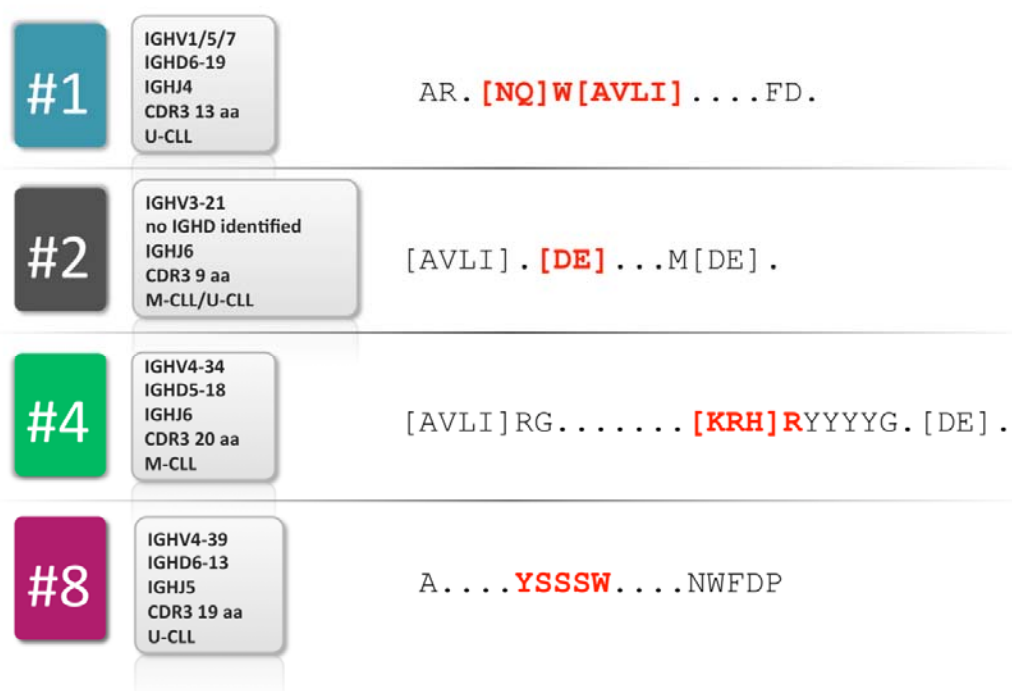
Σωρεία δεδομένων υποδεικνύει πως τα στερεότυπα υποσύνολα, πέρα από κοινά ανοσογενετικά μοριακά χαρακτηριστικά, μπορεί να παρουσιάζουν κοινές γενετικές βλάβες, επιγενετικό⁸⁴ και μεταγραφικό^{85,86} προφίλ, καθώς και παρόμοιες λειτουργικές απαντήσεις σε άνοσα ερεθίσματα μέσω του BcR ή άλλων υποδοχέων^{87,88}. Συνεπώς, συγκεκριμένα υποσύνολα χαρακτηρίζονται από διακριτές υπογραφές⁸⁹.

Στερεότυπο υποσύνολο #1

Το υποσύνολο #1 (Οικογένεια γονιδίων IGHV I/IGKV1(D)-39) (Εικόνα 10) αντιστοιχεί στο 2-2.5% του συνόλου ασθενών με CLL και περιλαμβάνει κλώνους με ιδιαίτερο προφίλ

έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οξειδωτικών διεργασιών και σηματοδότησης μέσω του BcR⁹⁰. Επίσης, χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη έκφραση του miR-101⁸⁶, που συμμετέχει μαζί με άλλα eri-miRNA στη ρύθμιση της έκφρασης συστατικών του επιγενετικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, ρυθμίζει την έκφραση του ενζύμου EZH2 του κατασταλτικού συμπλόκου polycomb repressive complex 2 (PRC2), το οποίο καταστέλλει γονίδια μέσω τριμεθυλίωσης της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο της λυσίνης 27⁹¹. Υπερέκφραση της EZH2 έχει αναφερθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων αιματολογικών κακοηθειών^{92,93}, και σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁹⁴. Κατ' αντιστοιχία, βρέθηκε ότι τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης EZH2 ήταν πολύ αυξημένα σε ασθενείς του υποσυνόλου #1 και σχετίζονταν με αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με άλλους κλώνους CLL⁸⁶. Επιπλέον, οι περιπτώσεις του υποσυνόλου #1 φέρουν συχνά μεταλλάξεις του γονιδίου *NOTCH1* (22%, σε σύγκριση με 5-10% σε όλη τη CLL)^{54,95}, καθώς και μεταλλάξεις του γονιδίου *NFKBIE* (15% σε σύγκριση με 7% στην υπόλοιπη CLL) που οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB μέσω ελαττωμένης παραγωγής του καταστολέα IκBe⁹⁶.

Από κλινική σκοπιά, το υποσύνολο #1 σχετίζεται με επιθετική κλινική πορεία και δυσμενή πρόγνωση, παρόμοια με αυτή των ασθενών με CLL που φέρουν βλάβη του γονιδίου *TP53*, με διάμεσο διάστημα έως την πρώτη θεραπεία (time to first treatment, TTFT) μόλις 1.6 έτη⁹⁷ (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 10. Ανοσογενετικά χαρακτηριστικά των στερεότυπων υποσυνόλων #1, #2 και #4. Δεξιά εικονίζεται η VH CDR3. Εικονίζονται μόνο τα αμινοξικά μοτίβα (συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα μεταξύ των περιπτώσεων του κάθε υποσυνόλου). Αν υπάρχουν εναλλακτικές επιλογές ανά θέση, τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα εικονίζονται εντός αγκυλών. Με κόκκινο χρώμα αποδίδονται τα αμινοξικά κατάλοιπα των συνδετικών περιοχών⁹⁸.

Στερεότυπο υποσύνολο #2

Το στερεότυπο υποσύνολο #2 (IGHV3-21/IGLV3-21) (**Εικόνα 10**) είναι το πολυπληθέστερο, εκπροσωπώντας το 5-3% του συνόλου της CLL και το 5.5% των περιπτώσεων που θα χρειαστούν θεραπεία.^{74,99} Περιλαμβάνει περιπτώσεις M-CLL (60%) και U-CLL (40%).^{74,76,77,100} Οι M-CLL παρουσιάζουν ειδικά πρότυπα κατανομής σωματικών υπερμεταλλάξεων.^{77,101} Η πιο χαρακτηριστική αφορά την απαλοιφή ενός κωδικονίου.^{77,102} Αυτό το υποσύνολο χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα επιθετική κλινική συμπεριφορά, με TTFT 1.9 έτη, που δε μπορεί να εξηγηθεί στο πλαίσιο των κυτταρογενετικών ανωμαλιών που το χαρακτηρίζουν (κυρίως del(11)(q22q23) and del(13)(q14)^{97,103}, με χαμηλή συχνότητα βλαβών του γονιδίου *TP53*.^{97,103,104} Το 2013 δύο ανεξάρτητες μελέτες^{105,106} ανέφεραν σημαντικά αυξημένα συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *SF3B1*, που κωδικοποιεί ένα σημαντικό συστατικό του σωματίου συρραφής (spliceosome)¹⁰⁷ σε σχέση με άλλα επιθετικά υποσύνολα της CLL (45-50% έναντι 5-10%).^{67,108} Μολονότι ο ακριβής ρόλος της δυσλειτουργίας συρραφής στο στερεότυπο υποσύνολο #2 παραμένει αδιευκρίνιστος, η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να αποτελέσει αφορμή για εφαρμογή βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες.

Στερεότυπο υποσύνολο #4

Το στερεότυπο υποσύνολο #4 (IGHV4-34/IGKV2-30) (**Εικόνα 10**) εκπροσωπεί ~1% της CLL και είναι το πολυπληθέστερο μεταξύ M-CLL. Παρουσιάζει συχνά del(13)(q14)^{97,103,109}, που συσχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση¹¹⁰. Δεν χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες (recurrent) μεταλλάξεις γονιδίων, τουλάχιστον όσον αφορά τα πιο συχνά μεταλλάσσόμενα γονίδια στη CLL (*NOTCH1*, *SF3B1* and *TP53*).⁹⁵ Ωστόσο, από ανοσογενετική σκοπιά το υποσύνολο #4 παρουσιάζει αξιοσημείωτες ιδιαιτερότητες. Συγκεκριμένα, οι κλωνοτυπικές BcR IG: (i) παρουσιάζουν πάντοτε εναλλαγή ισotyπου (IgG-switched)¹¹¹, φαινόμενο σπάνιο στη CLL (5-8%), (ii) προκύπτουν από βαριές αλυσίδες με γονίδιο IGHV4-34 και ελαφριές αλυσίδες με γονίδιο IGKV2-30, σπάνιος συνδυασμός στο φυσιολογικό ρεπερτόριο, και χαρακτηρίζονται από μακριά VH CDR3, πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα⁷⁶ που παραπέμπει σε αντισώματα με anti-DNA ειδικότητα¹¹², (iii) παρουσιάζουν πρότυπα σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης που προσομοιάζουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης της αυτοαντιδραστικότητας (editing), π.χ. εισαγωγή αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων^{77,101}, και (iv) χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ενδοκλωνική ετερογένεια στα πλαίσια συνεχιζόμενης σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης¹¹³⁻¹¹⁶, παραπέμποντας σε παρατεταμένη αλληλεπίδραση με αντιγόνο (-α).

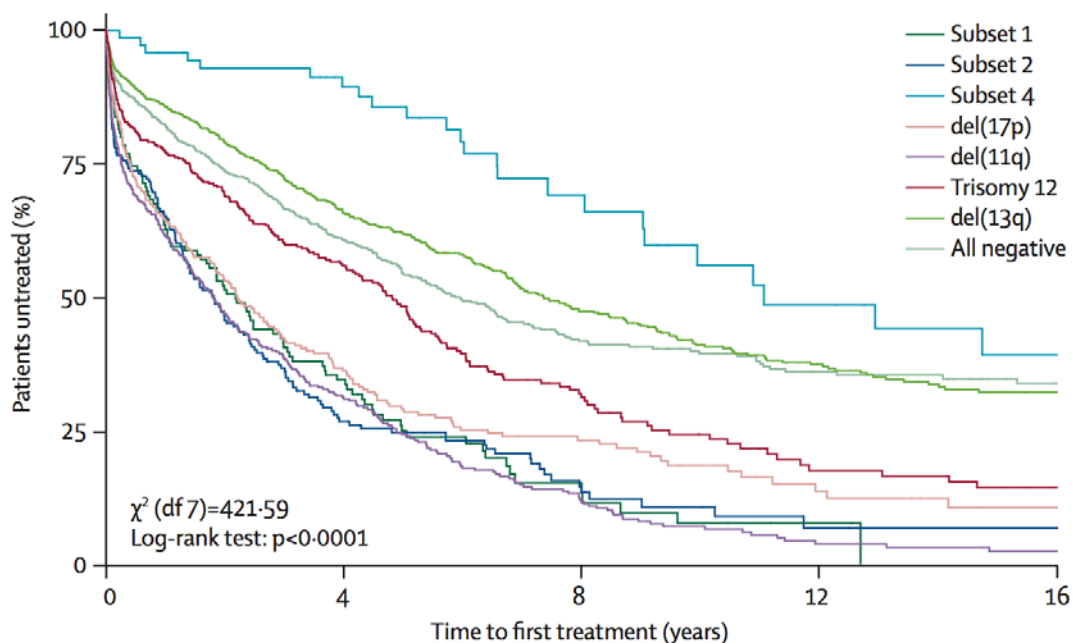
Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, προτάθηκε ότι τα CLL κύτταρα του υποσυνόλου #4 μπορεί να είναι ανεργικά, στα πλαίσια εξασθενημένης άνοσης απάντησης σε (αυτο)αντιγόνα^{77,101,113,115,116}. Πράγματι, φάνηκε ότι παρουσιάζουν συνεχή ενεργοποίηση της ERK1/2 και δεν απελευθερώνουν Ca²⁺ ενδοκυττάρια, ούτε σηματοδοτούν μέσω MAP-κινάσης μετά από πρόσδεση του BcR⁸⁹, που αποτελεί χαρακτηριστική υπογραφή ανεργίας τουλάχιστο Στα Β λεμφοκύτταρα των ποντικών.¹¹⁷

Από κλινική σκοπιά, το υποσύνολο #4 φαίνεται να αποτελεί ξεχωριστή κλινική οντότητα. Παρουσιάζει εξαιρετικά ήπια κλινική πορεία, με TTFT 11 έτη που ξεπερνά ακόμη και τις κυτταρογενετικές κατηγορίες με την ευνοϊκότερη πρόγνωση [del(13)(q14), TTFT 6.7 έτη]⁹⁷.

Εξάλλου, αφορά κυρίως νεότερους ασθενείς, με διάμεση ηλικία τα 55 έτη (έναντι διάμεσης ηλικίας 65 έτη για ασθενείς των υποσυνόλων #1 ή #2).⁹⁷

Στερεότυπο υποσύνολο #8

Το υποσύνολο #8 (Εικόνα 10) χαρακτηρίζεται από την έκφραση στερεότυπων, αμετάλλακτων IGHV₄₋₃₉/IGKV_{1(D)-39} BcR IG γάμμα ισοτύπου^{111,118}, καθώς και υψηλή συχνότητα τρισωμίας 12 (60%)⁹⁷ και μεταλλάξεων του γονιδίου *NOTCH1* (34%-62%)^{95,105,106}. Οι κλωνοτυπικές IG είναι κατεξοχήν πολυαντιδραστικές: προσδένουν πρακτικά όλα τα αντιγόνα που δοκιμάστηκαν (μοριακές δομές στην επιφάνεια μικροβίων, αυτοαντιγόνα και νεο-επιτόπους που δημιουργούνται κατά την απόπτωση μέσω χημικών τροποποιήσεων), σε αντίθεση με τις κλωνοτυπικές IG άλλων επιθετικών στερεότυπων υποσυνόλων (π.χ. των υποσυνόλων #1 και #2), οι οποίες επιδεικνύουν μεγαλύτερη ειδικότητα.⁸⁸ Αυτή η πολυαντιδραστικότητα μεταφράζεται σε έντονη διέγερση του B κυττάρου μετά από έκθεση σε αντιγόνο.⁸⁸ Πιθανώς, η ικανότητα να απαντά σε πολλαπλά ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό, που καταλήγει σε προοδευτική επιλογή ολοένα και πιο επιθετικών υποκλώνων. Αυτή η υπόθεση ίσως αποτελεί λειτουργική εξήγηση της αυξημένης συχνότητας εκτροπής σε σύνδρομο Richter (λέμφωμα υψηλής κακοήθειας) που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο υποσύνολο.¹¹⁹



Εικόνα 11. Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με CLL που κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα σε σχέση με γνωστές κυτταρογενετικές κατηγορίες.⁹⁷

Οντογένεση της CLL

Παρά την εντατική έρευνα, το κύτταρο προέλευσης της CLL παραμένει άγνωστο.^{120,121} Μια εύλογη υπόθεση θα ήταν ότι η U-CLL προέρχεται από B κύτταρα που δεν έχουν έλθει σε επαφή με αντιγόνο (naïve), ενώ η M-CLL από B κύτταρα που έχουν διεγερθεί κλασικά μετά από έκθεση σε θυμοεξαρτώμενο αντιγόνο κι έχουν υποβληθεί σε σωματική υπερμεταλλαξιγένεση στο βλαστικό κέντρο.¹²⁰ Ωστόσο, η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν εξηγεί γιατί τα κύτταρα της U-CLL έχουν φαινότυπο και προφίλ γονιδιακής έκφρασης ενεργοποιημένου B κυττάρου, ούτε βεβαίως το φαινόμενο της στερεοτυπίας, που κατά κύριο λόγο αποτελεί γνώρισμα της U-CLL.

Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ενεργοποίηση των B κυττάρων μπορεί να συμβεί και εκτός βλαστικού κέντρου, ίσως στο περιβάλλον της οριακής ζώνης (MZ)¹²², κι έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η CLL μπορεί να προέρχεται από MZ B κύτταρα.¹²³ Αυτού του τύπου οι άνοσες απαντήσεις προκαλούνται από αυτοαντιγόνα ή από λιποπολυσακχαριτιδικά (τύπου I)/πολυσακχαριτιδικά (τύπου II) θυμοανεξάρτητα αντιγόνα και καταλήγουν στον πολλαπλασιασμό B κυττάρων χαμηλής συγγένειας με το αντιγόνο, με λίγες ή καθόλου υπερμεταλλάξεις.¹²⁴ Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε την ύπαρξη μιας υποκατηγορίας δενδριτικών κυττάρων οριακής ζώνης (DIRC2+ MZ DCs) που μπορούν να πυροδοτήσουν άνοσες απαντήσεις κατά θυμοεξαρτώμενων αντιγόνων εκτός βλαστικού κέντρου, που μπορεί να περιλαμβάνουν εναλλαγή ισοτύπου χωρίς να συμβαίνει σωματική υπερμεταλλαξιγένεση.¹²⁵ Αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να ερμηνεύουν την οντογένεση μιας υποκατηγορίας U-CLL που παρουσιάζει εναλλαγή ισοτύπου, συγκεκριμένα του στερεότυπου υποσυνόλου #8 (βλ. και παραπάνω).^{76,118} Εξάλλου, παρόμοιο ανοσογενετικό προφίλ (αμετάλλακτες IG με εναλλαγή ισοτύπου) έχει περιγραφεί για B κύτταρα μνήμης που προκύπτουν νωρίς μετά από εμβολιασμό με θυμοεξαρτώμενο μεν μηχανισμό, αλλά εκτός του βλαστικού κέντρου¹²⁶.

Τα κύτταρα της CLL, ιδίως της U-CLL, συχνά εκφράζουν πολυ- και αυτοαντιδραστικές BcR IG¹²⁷⁻¹³², που προσομοιάζουν με φυσικά αντισώματα. Τα φυσικά αντισώματα κυκλοφορούν στο αίμα υγιών ατόμων και είναι σε θέση να αναγνωρίζουν μη πρωτεϊνικά αντιγόνα που ανευρίσκονται σε πλειάδα παθογενετικών και συμβιωτικών μικροοργανισμών, ή ακόμη και αυτοαντιγόνα.^{133,134} Το ρεπερτόριο και το προφίλ αντιδραστικότητας αυτών των αντισωμάτων είναι σχετικά σταθερό, τόσο για άτομα του ίδιου είδους, όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών οργανισμών, πιθανώς λόγω του ρόλου τους ως 1η γραμμή άμυνας σε λοιμώξεις, αλλά και ως μηχανισμού εκκαθάρισης αποπτωτικών κυττάρων και μεταβολικών παραπροϊόντων.¹³³⁻¹³⁶ Στα ποντίκια, η βασική πηγή παραγωγής φυσικών αντισωμάτων είναι τα B1 κύτταρα (βλέπε και παραπάνω)^{137,138}. Μολονότι η ύπαρξη αντίστοιχου B κυτταρικού υποπληθυσμού δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως στον άνθρωπο,⁴⁷ θα μπορούσε να αποτελεί το προγονικό διαμέρισμα της στερεότυπης CLL, ιδίως των υποσυνόλων της U-CLL, όπου τα στερεότυπα μοτίβα της VH CDR3 μπορεί να περιορίζονται σε ελάχιστα αμινοξικά κατάλοιπα τοποθετημένα σε κρίσιμες θέσεις. Εναλλακτικά, αντί για ξεχωριστή οντογενετική προέλευση, τέτοιου τύπου κύτταρα θα μπορούσαν να παραγόνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες του μικροπεριβάλλοντός τους.¹³⁷ Σε κάθε περίπτωση πάντως, επιχείρημα υπέρ της ύπαρξης τέτοιας κυτταρικής δεξαμενής στον άνθρωπο αποτελεί η ανεύρεση στερεότυπων αναδιατάξεων που χρησιμοποιούν το γονίδιοIGHV1-69 στο αίμα υγιών ατόμων.¹³⁹

Εισαγωγή

Η ύπαρξη μικρών μονοκλωνικών Β κυτταρικών πληθυσμών στο περιφερικό αίμα (peripheral blood, PB) υγιών ατόμων είναι γνωστή εδώ και πολλές δεκαετίες¹⁴¹⁻¹⁴³ ωστόσο η συχνότητα του φαινομένου και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των πληθυσμών αναδείχθηκαν προοδευτικά χάρη στην εφαρμογή ολοένα και πιο εξειδικευμένων τεχνικών κυτταρομετρίας ροής.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Πρόκειται για την κλινική οντότητα που πλέον καλείται "μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση" (monoclonal B cell lymphocytosis, MBL), παρότι δε συνοδεύεται πάντοτε από απόλυτη λεμφοκυττάρωση. Η MBL διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά του Β κλωνικού πληθυσμού: η πλειονότητα των περιπτώσεων MBL (75%) χαρακτηρίζονται από τον τυπικό ανοσοφαινότυπο της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ($CD5^+$, $CD23^+$, $CD20^{dim}$, sIg^{dim}) και καλούνται MBL τύπου ΧΛΛ (CLL-like MBL), ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις MBL διακρίνονται σε MBL τύπου άτυπης ΧΛΛ (atypical CLL-like MBL, με ανοσοφαινότυπο $CD5^+$, $CD20^{bright}$) και $CD5^-$ MBL.^{148,149}

Η CLL-like MBL θεωρείται προκαρκινική κατάσταση της CLL, κατ' αντιστοιχία με τη σχέση μεταξύ της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) και του πολλαπλού μυελώματος.¹⁵⁰ Η συχνότητά της κυμαίνεται από 3-12%, ανάλογα με την ευαισθησία των τεχνικών κυτταρομετρίας που χρησιμοποιούνται και φτάνει το 17% μεταξύ συγγενών ασθενών με CLL.^{145,146,151}

Προκειμένου να διαχωρίσει τι θεωρείται "πάθηση" και τι όχι, Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει θέσει ως συμβατικό όριο την τιμή των $5 \times 10^9/l$ κλωνικών Β κυττάρων στο περιφερικό αίμα.¹⁵² Παρόλ' αυτά, κάτω από αυτό το κατώφλι παρατηρείται μεγάλη διακύμανση του μεγέθους του κλώνου, τόσο ως προς τον απόλυτο αριθμό των κλωνικών Β κυττάρων, όσο και ως προς την αναλογία τους σε σχέση με το συνολικό αριθμό των Β κυττάρων που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Έτσι, η CLL-like MBL διακρίνεται πλέον σε δύο υποκατηγορίες: κλινική MBL, ή αλλιώς high-count MBL (HC-MBL), και MBL που ανιχνεύεται σε μελέτες διαλογής πληθυσμού, ή αλλιώς low-count MBL (LC-MBL).^{148,153} Η πρώτη υποκατηγορία συνήθως συνοδεύεται από απόλυτη λεμφοκυττάρωση και διαπιστώνεται από κλινικούς γιατρούς, εξ' ου και το όνομα κλινική MBL.¹⁵⁴ Η HC-MBL μπορεί να προοδεύσει σε CLL που απαιτεί θεραπεία με ρυθμό 1-2%/έτος.¹⁵⁴ Αντίθετα, η LC-MBL διαπιστώνεται μόνο εφόσον εφαρμοστούν εξειδικευμένα πρωτόκολλα κυτταρομετρίας ροής σε κατά τα άλλα υγιή άτομα,¹⁵³ και φαίνεται πως παραμένει σταθερή στο χρόνο.¹⁵⁵

Δεν είναι σαφές αν υπάρχει αριθμητικό όριο που μπορεί να διακρίνει τη CLL-like MBL σε πραγματικά διακριτές από κλινική και βιολογική άποψη οντότητες. Στην κλινική MBL η διάμεση τιμή των κλωνικών Β κυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι $2,9 \times 10^9$ Β κύτταρα/l

και 95% των περιπτώσεων έχουν $>0.45 \times 10^9$ κλωνικά Β κύτταρα/l,¹⁵⁶ ενώ στη LC-MBL η διάμεση τιμή των κλωνικών Β κυττάρων είναι μόλις 0.001×10^9 /l.¹⁵³ Γι' αυτό το λόγο, για τη διάκριση μεταξύ LC και HC-MBL έχει προταθεί και χρησιμοποιείται ως όριο η τιμή των 0.5×10^9 κλωνικών Β κυττάρων/l.^{148,153}

Κατά συνέπεια, ο όρος MBL συμπεριλαμβάνει περιπτώσεις με διαφορετική πιθανότητα να αντιπροσωπεύουν μια πραγματικά προκαρκινική κατάσταση, όπως εξάλλου προκύπτει και από τα κλινικά δεδομένα.^{144,155} Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, με την παρούσα μελέτη επιδιώξαμε να διαλευκάνουμε τη σχέση μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων MBL και της CLL αναλύοντας το ρεπερτόριο των γονιδίων IG μιας ομάδας 333 ατόμων με CLL-like MBL, LC (n=60) και HC (n=273) από συνεργαζόμενα κέντρα σε Ευρώπη και Η.Π.Α. Οι συγκρίσεις μεταξύ LC και HC-MBL με μια μεγάλη ομάδα ασθενών με CLL και μια υποομάδα ασθενών με CLL σταδίου Rai 0 (CLL-o) αποκάλυψε ότι η LC και η HC-MBL έχουν διαφορετικό ανοσογενετικό προφίλ, με τη HC-MBL να προσομοιάζει στη CLL-o, ενώ τη LC-MBL να διαφέρει εν γένει από τη CLL. Με βάση τα παραπάνω, προτείνουμε μια αναθεωρημένη οντογενετική σχέση της MBL με τη CLL με σαφείς κλινικές και κοινωνικές προεκτάσεις.

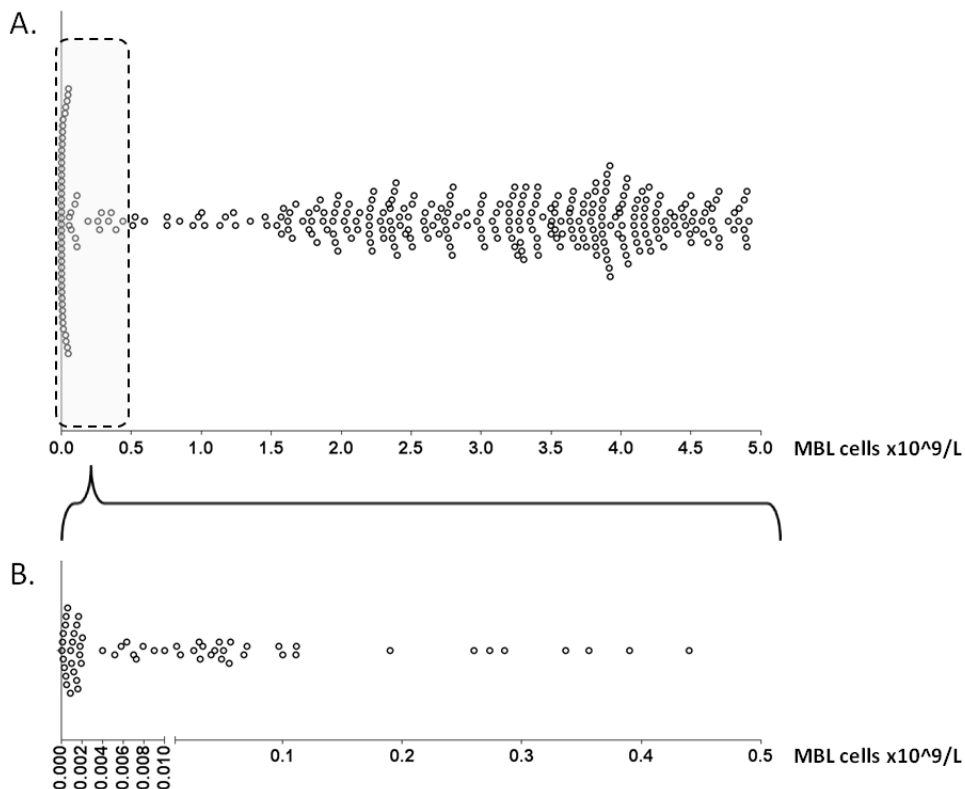
Υλικά και Μέθοδοι

Ομάδα ασθενών

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 333 περιπτώσεις CLL-like MBL από συνεργαζόμενα κέντρα σε Ευρώπη και Η.Π.Α. Όλες οι περιπτώσεις πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης MBL που καθιερώθηκαν το 2005,¹⁴⁹ δηλαδή διαταραγμένο λόγο κ/λ ($>3:1$ ή $< 1:3$) στα $CD19^+$, $CD5^{bright}$, $CD23^+$, $CD20^{dim}$ κύτταρα σε μελέτη κυτταρομετρίας ροής. Σε αυτή την ομάδα, 60 περιπτώσεις είχαν απόλυτο αριθμό κλωνικών Β λεμφοκυττάρων $<0.5 \times 10^9$ /l (LC-MBL), ενώ οι υπόλοιπες 273 περιπτώσεις είχαν $1.5-5.0 \times 10^9$ /l κλωνικά Β κύτταρα με τυπικό ανοσοφαινότυπο CLL (HC-MBL) (Πίνακας 1). Δεν υπήρχε καμία περίπτωση LC-MBL με αυξημένα T ή πολυκλωνικά Β κύτταρα, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε απόλυτη λεμφοκυττάρωση. Η κατανομή των περιπτώσεων MBL με βάση το μέγεθος του κλώνου φαίνεται στην Εικόνα 12. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής κάθε κέντρου που συμμετείχε.

	LC-MBL	HC-MBL
Απόλυτος αριθμός MBL κυττάρων ($\times 10^9$ /l)	0-0.5	0.5-5.0
Αριθμός περιπτώσεων	60	273
Αριθμός παραγωγικών αναδιατάξεων	72	283
Διάμεσος αριθμός Β κυττάρων ($\times 10^9$ /l)	0.14	3.52
Διάμεσος αριθμός MBL κυττάρων ($\times 10^9$ /l)	0.008	3.38
MBL/B κύτταρα (μέσος όρος)	21%	93%
Διάμεση απόλυτη τιμή λεμφοκυττάρων ($\times 10^9$ /l)	2.17	6.0

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά της ομάδας MBL ως προς το μέγεθος του κλώνου.



Εικόνα 12. Α) Κατανομή όλων των περιπτώσεων MBL ανάλογα με το μέγεθος του κλώνου. Κάθε περίπτωση απεικονίζεται ως κύκλος. Η κατανομή παρουσιάζει πόλωση είτε προς πολύ μικρούς κλώνους είτε προς κλώνους $>1.5 \times 10^9$ MBL κυττάρων/L. **Β) Κατανομή των περιπτώσεων LC-MBL ανάλογα με το μέγεθος του κλώνου.** Για λόγους ευκρινέστερης απεικόνισης, ο οριζόντιος άξονας χωρίζεται σε δύο τμήματα διαφορετικής κλίμακας (<0.005 και ≥ 0.005 MBL κυττάρων/L). Οι περισσότερες περιπτώσεις LC-MBL φέρουν κλώνους $<0.1 \times 10^9$ MBL κυττάρων/L.

Ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ πραγματοποιήθηκε σε γενωμικό DNA (gDNA) ή συμπληρωματικό DNA (cDNA), σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις.^{77,144}

Ανάλυση και ερμηνεία αλληλουχιών

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε άμεση αλληλούχηση και των δύο κλώνων, ή, σε 15 περιπτώσεις, σε αλληλούχηση μετά από υποκλωνοποίηση (αναλύθηκαν τουλάχιστον 10 αποικίες/προϊόν).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν υποβλήθηκαν στο εργαλείο IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>).¹⁵⁷ Οι θέσεις των κωδικονίων και των αμινοξέων περιγράφονται σύμφωνα με την αρίθμηση του IMGT για τη μεταβλητή περιοχή των IG.¹⁵⁸ Αξιολογήθηκαν μόνο οι παραγωγικές αναδιατάξεις (n=335). Τα γονίδια IGHV4-59 και IGHV4-61 θεωρήθηκαν μια ομάδα επειδή η χρήση ενός εκκινητή FR2 σε συγκεκριμένες αντιδράσεις PCR καθιστούσε δυσχερή τη διάκριση μεταξύ τους, καθώς διαφέρουν κυρίως στη VH FR1-VH CDR1. Προκειμένου να εκτιμηθούν αξιόπιστα οι σωματικές

υπερμεταλλάξεις των αλληλουχιών, οι αλλαγές των νουκλεοτιδίων σε σχέση με τη βλαστική σειρά αξιολογήθηκαν από το κωδικόνιο 27 στη CDR1-IMGT ή από το κωδικόνιο 56 στη CDR2-IMGT για τις αλληλουχίες που προέκυψαν με χρήση εκκινητή VH FR2.¹⁴⁴

Συγκρίσεις ρεπερτορίου IG και ομαδοποίηση VH CDR3

Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις του ρεπερτορίου IG ανάμεσα στις αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ των περιπτώσεων MBL που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και 7596 IGHV-IGHD-IGHJ αναδιατάξεων μιας ομάδας 7424 ασθενών με CLL όλων των σταδίων (CLL-all) από προηγούμενη δημοσίευση της ομάδας μας.⁷⁴ Επίσης, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ της MBL και μιας υποομάδας ασθενών με CLL σταδίου Rai 0 (CLL-o) που προέρχονταν από τρία συνεργαζόμενα κέντρα του δικτύου μας (San Raffaele, Μιλάνο / Γ.Ν.Θ. "Γ. Παπανικολάου", Θεσσαλονίκη / Γ.Ν. Νίκαιας, Αθήνα) τα οποία παρακολουθούν ασθενείς με CLL κοινότητας (και όχι ασθενείς σε κλινικές μελέτες) (n=544).

Επιπλέον, οι αλληλουχίες MBL στοιχήθηκαν και συγκρίθηκαν με μια σειρά 5494 μοναδικών, καλά χαρακτηρισμένων, παραγωγικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ από ποικίλες κλινικές οντότητες εκτός CLL, οι οποίες ανασύρθηκαν από την τράπεζα αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB (<http://www.imgt.org/IMGTindex/LIGM.html>) ή ήταν διαθέσιμες στην ομάδα μας από προηγούμενες μελέτες.^{75,76,144}

Η αξιολόγηση της στερεοτυπίας των BcR IG στο σύνολο των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ (MBL, CLL, άλλες οντότητες) πραγματοποιήθηκε με εξειδικευμένους βιοπληροφορικούς αλγορίθμους ομαδοποίησης, σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις.⁷⁵

Στατιστική ανάλυση

Τα περιγραφικά στατιστικά δεδομένα διακριτών παραμέτρων αφορούν απόλυτους αριθμούς και κατανομές συχνότητας. Για ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν μέσοι όροι, διάμεσες τιμές, ανώτατα και κατώτατα όρια. Η σημαντικότητα των δι/πολυπαραγοντικών σχέσεων μεταξύ μεταβλητών εκτιμήθηκε με τεστ χ^2 . Ως όριο σημαντικότητας για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το $p=0.05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Αποτελέσματα

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IG διαφέρει μεταξύ LC και HC-MBL

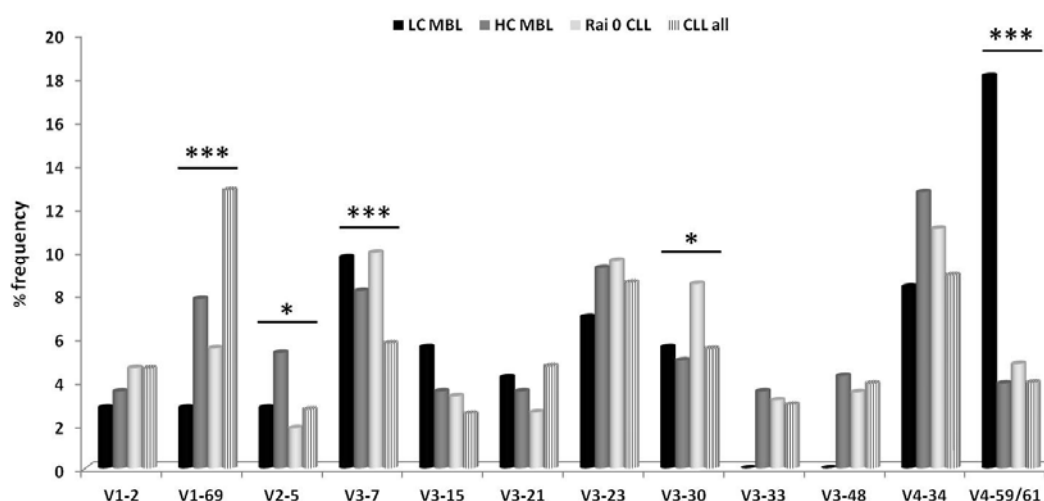
Συνολικά αξιολογήθηκαν 355 παραγωγικές αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ από 333 περιπτώσεις CLL-like MBL. Όταν διαχωρίσαμε τις περιπτώσεις MBL με βάση τον απόλυτο αριθμό των κλωνικών B κυττάρων σε LC-M(BL ($<0.5 \times 10^9/l$, Δμ $0.008 \times 10^9/l$) και HC-MBL ($\geq 0.5 \times 10^9$, $<5.0 \times 10^9/l$ και Δμ $3.38 \times 10^9/l$) (Πίνακας 1), παρατηρήσαμε ότι σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων LC-MBL έφερε πολλαπλές παραγωγικές αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ (7/60, 11.7%) σε σχέση με τις HC-MBL (8/273, 2.9%) ($p=0.003$). Στο σύνολο των αναδιατάξεων, επικρατέστερη ήταν η υποομάδα γονιδίων IGHV3 (175/355, 49.3%), ενώ ακολουθούσε η υποομάδα IGHV4 (87/355, 24.5%). Αναγνωρίστηκαν 39 λειτουργικά γονίδια IGHV, με συχνότερο το γονίδιο IGHV4-34 (42

αναδιατάξεις, 11.8%) και ακολούθως τα γονίδια *IGHV3-23* (8.7%), *IGHV3-7* (8.5%), *IGHV1-69* (6.8%) και *IGHV4-59/61* (6.8%) (**Συμπληρωματικός Πίνακας 1**).

Μεταξύ LC και HC-MBL διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα χρήσης των γονιδίων *IGHV*. Σε επίπεδο υπομάδων γονιδίων, στη HC-MBL υποεκπροσωπούσαν τα γονίδια *IGHV4* ($p=0.02$) και υποεκπροσωπούσαν τα γονίδια *IGHV1* ($p=0.04$). Σε επίπεδο ξεχωριστών γονιδίων, τα γονίδια *IGHV1-69*, *IGHV2-5*, *IGHV3-23*, *IGHV3-33*, *IGHV3-48* και *IGHV4-34* υπερεκπροσωπούσαν στη HC σε σχέση με τη LC-MBL, αν και οι παρατηρούμενες διαφορές δεν άγγιξαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, πιθανώς λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων για στατιστική σύγκριση. Ωστόσο, σε αυτό το πλαίσιο του σχετικά περιορισμένου αριθμού δειγμάτων, αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *IGHV4-59/61* ήταν σημαντικά συχνότερο στη LC σε σχέση με τη HC-MBL ($p<0.0001$) (**Εικόνα 13**).

Όσο αφορά το μήκος των VH CDR3 και το ρεπερτόριο των γονιδίων *IGHD* και *IGHJ*, αναλυτικά αποτελέσματα περιγράφονται στους **Συμπληρωματικούς Πίνακες 2-4**.

Με βάση το καθιερωμένο για τη CLL όριο ταυτότητας της αλληλουχίας του γονιδίου *IGHV* με τη βλαστική σειρά (98% germline identity, GI), 267/355 (75.2%) αναδιατάξεις ήταν μεταλλαγμένες, ενώ οι υπόλοιπες 88/355 (24.8%) αμετάλλακτες, από τις οποίες 52/88 (59.1%) έφεραν γονίδιο *IGHV* με 100% GI. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων μεταξύ LC και HC-MBL. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις MBL με πολλαπλές παραγωγικές αναδιατάξεις *IGHV-IGHD-IGHJ*, το μεταλλακτικό status ήταν γενικά "σύμφωνο" (concordant) στη LC-MBL (5/7 περιπτώσεις, 71.5%, με αποκλειστικά μεταλλαγμένα γονίδια *IGHV*), ενώ αντίθετα βρέθηκε συχνά "ασύμφωνο" (discordant) στη HC-MBL (5/8 περιπτώσεις, 62.5%, με συνυπάρχοντα μεταλλαγμένα και αμετάλλακτα γονίδια *IGHV*).



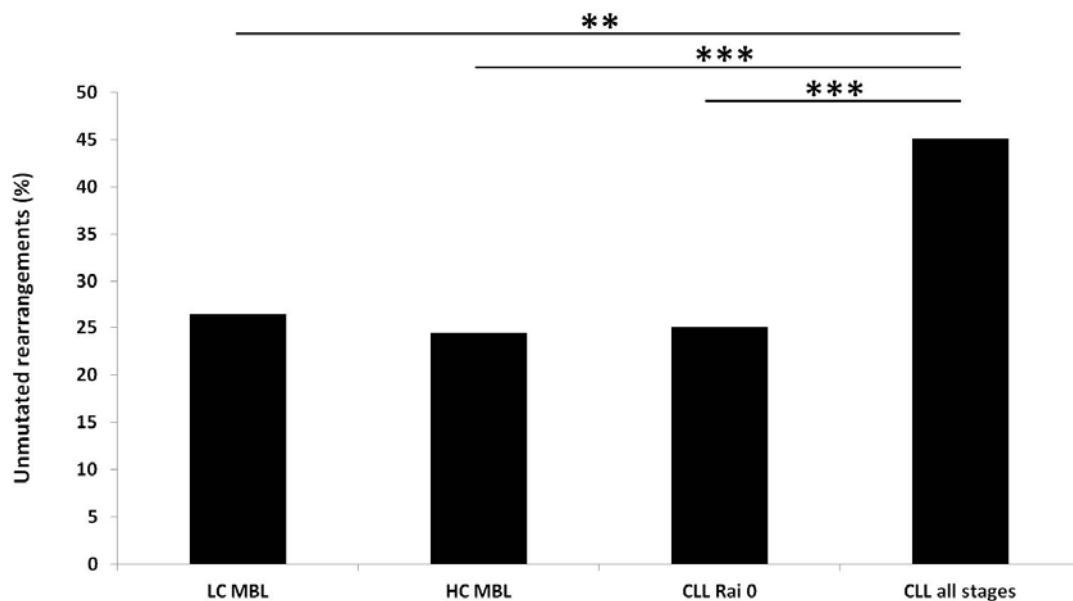
Εικόνα 13. Σύγκριση του ρεπερτορίου των γονιδίων *IGHV* μεταξύ LC-MBL, HC-MBL, CLL-ο και CLL όλων των σταδίων.

Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας $p<0.05$ και $p<0.001$ επισημαίνονται με [*] and [***], αντιστοίχως..

Η LC-MBL έχει ιδιαίτερο ρεπερτόριο γονιδίων IG, ενώ η HC-MBL προσομοιάζει στη CLL σταδίου Rai 0.

Στη συνέχεια συγκρίναμε το ρεπερτόριο των γονιδίων IG μεταξύ MBL και CLL. Χρησιμοποιήσαμε ως αναφορά δύο ομάδες αλληλουχιών CLL, από τις οποίες η μία συμπεριλάμβανε 544 περιπτώσεις CLL-o και η άλλη 7424 περιπτώσεις CLL-all, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα "Υλικά και Μέθοδοι". Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε αφορούσε το γονίδιο *IGHV4-59/61*, το οποίο υπερεκπροσωπούσαν σημαντικά στη LC-MBL ($p < 0.0001$) (Εικόνα 13). Σημαντικά διαφορετική συχνότητα παρατηρήθηκε και για το γονίδιο *IGHV1-69*, που ήταν σπάνιο στη LC-MBL (2.8%), χρησιμοποιούνταν με υψηλότερη συχνότητα στη HC-MBL και CLL-o (7.8% and 5.5%, αντίστοιχα) και υπερεκπροσωπούσαν σαφώς στη CLL-all (12.8%), όπου αποτελούσε και το συχνότερο γονίδιο *IGHV* ($p < 0.0001$). Άλλα παραδείγματα γονιδίων *IGHV* με ασύμμετρη συχνότητα χρήσης μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων παρατίθενται στο Συμπληρωματικό Πίνακα 5.

Όσο αφορά το φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ LC-MBL, HC-MBL και CLL-o, καθότι η συχνότητα αμετάλλακτων αναδιατάξεων ($\geq 98\%$ GI) ήταν γενικά παρόμοια (LC-MBL: 26.4%, HC-MBL: 24.4%, CLL-o: 25%). Ωστόσο, όλες αυτές οι ομάδες διέφεραν σημαντικά ($p = 0.001$, $p < 0.0001$, και $p < 0.0001$, αντίστοιχα) από τη CLL-all, όπου σχεδόν 1 στις 2 αναδιατάξεις (45.1%) έφερε αμετάλλακτα γονίδια *IGHV* (Εικόνα 14). Αξίζει να σημειωθεί πως τόσο στη HC-MBL, όσο και στη CLL-o, ένα σημαντικό ποσοστό -περίπου το ένα τρίτο- των αναδιατάξεων που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο *IGHV1-69* ήταν μεταλλαγμένες (7/22, 31.8% και 9/30, 30%, αντίστοιχα), σε αντίθεση με τη CLL-all, όπου λιγότερο από το 10% αυτών των αναδιατάξεων ήταν μεταλλαγμένο ($p < 0.001$). Στην ομάδα της LC-MBL, μόλις 2 περιπτώσεις χρησιμοποιούσαν το γονίδιο *IGHV1-69*, και οι δύο σε μεταλλαγμένη μορφή.



Εικόνα 14. Η % συχνότητα των αμετάλλακτων αναδιατάξεων IG ($\geq 98\%$ GI) στην MBL και τη CLL

Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.01$ και $p < 0.001$ επισημαίνονται με [**] and [***], αντίστοιχως.

Η στερεοτυπία του BcR είναι σπάνια στη LC-MBL, με περιστασιακές εξαιρέσεις που αντιστοιχούν σε 'δημόσιες' ανοσογενετικές υπογραφές

Επιχειρήσαμε να αναγνωρίσουμε στερεότυπες VH CDR3 εφαρμόζοντας εξειδικευμένους βιοπληροφορικούς αλγορίθμους για την ταυτοποίηση κοινών αμινοξικών μοτίβων.⁷⁵ Στη συνέχεια, συγκρίναμε το σύνολο των MBL VH CDR3 με 7596 αλληλουχίες CLL⁷⁴, καθώς και με 5494 μοναδικές, καλά χαρακτηρισμένες και πλήρεις αλληλουχίες VH CDR3 από διάφορες κλινικές οντότητες εκτός της CLL, τις οποίες ανασύραμε από την τράπεζα αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB.

Όταν συγκρίναμε τη συχνότητα των ειδικών για τη CLL στερεότυπων BcR IG μεταξύ LC-MBL και HC-MBL, διαπιστώσαμε ότι ήταν σημαντικά υψηλότερη στη HC-MBL ($p=0.001$), υπογραμμίζοντας περαιτέρω τη διαφορά στο ανοσογενετικό προφίλ αυτών των δύο υποκατηγοριών της MBL. Συγκεκριμένα, μόνο 4/72 (5.5%) αλληλουχίες LC-MBL ομαδοποιήθηκαν με άλλες αλληλουχίες σε υποσύνολα περιπτώσεων με στερεότυπες BcR IG και καμιά από αυτές δεν προήλθε από περίπτωση με πολλαπλές παραγωγικές αναδιατάξεις. Αυτές οι 4 αλληλουχίες αντιστοιχούσαν σε περιπτώσεις LC-MBL με αριθμό κλωνικών B κυττάρων μεταξύ $0.004-0.055 \times 10^9/l$. Συγκεκριμένα, (i) 1 περίπτωση LC-MBL ομαδοποιήθηκε μαζί με μία περίπτωση HC-MBL αλλά όχι με περιπτώσεις CLL, δημιουργώντας ένα ειδικό για την MBL υποσύνολο ("MBL-specific" subset), (ii) 1 περίπτωση LC-MBL κατατάχθηκε σ' ένα ειδικό για τη CLL, αλλά μικρό υποσύνολο (υποσύνολο #239), και (iii) 2 περιπτώσεις LC-MBL ομαδοποιήθηκαν μαζί με αλληλουχίες από διάφορες οντότητες, συμπεριλαμβανόμενης της CLL, και γι' αυτό το λόγο οι αλληλουχίες τους θεωρήθηκαν "δημόσια" στερεότυπα (βλ. παρακάτω).

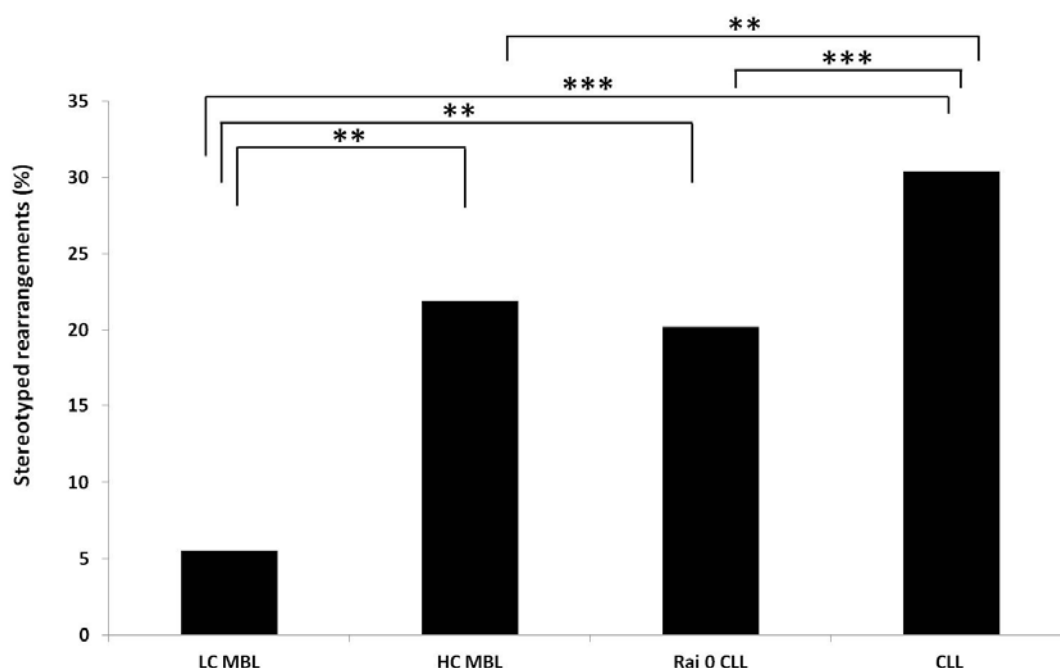
Αντίθετα, 62/283 (21.9%) αναδιατάξεις HC-MBL έφεραν ταυτόσημες VH CDR3s με περιπτώσεις MBL ή CLL (οι 3/62 αφορούσαν περιπτώσεις με πολλαπλές παραγωγικές αναδιατάξεις). Συγκεκριμένα: (i) 45 περιπτώσεις HC-MBL κατατάσσονταν σε γνωστά, καλά χαρακτηρισμένα, ειδικά για τη CLL υποσύνολα (π.χ. #1, #2, #4, #16, #28 κ.ά), (ii) 10 περιπτώσεις HC-MBL ομαδοποιήθηκαν με περιπτώσεις CLL, δημιουργώντας νέα υποσύνολα "MBL-CLL", (iii) 5 περιπτώσεις HC-MBL ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους, δημιουργώντας ειδικά για την MBL υποσύνολα, και (iv) 2 περιπτώσεις HC-MBL εξέφραζαν "δημόσιες" στερεότυπες IG BcR, δηλαδή ομαδοποιήθηκαν μαζί με αλληλουχίες από διάφορες οντότητες (βλ. επόμενη ενότητα).

Εξάλλου, διαπιστώθηκε προοδευτική αύξηση της συχνότητας στερεοτυπίας των BcR IG ανάλογα με τον απόλυτο αριθμό των κλωνικών B κυττάρων, ξεκινώντας με 5.5% στη LC-MBL, κλιμακούμενη σε 21.9%/20.2% στη HC-MBL/CLL-o, αντίστοιχα, και κορυφούμενη σε 30.4% στη CLL-all (Εικόνα 15).

Δημόσια στερεότυπα BcR IG στο ρεπερτόριο της MBL

Η μία περίπτωση LC-MBL με "δημόσια" στερεότυπη BcR IG (89VBB) κατατασσόταν σε μια ομάδα αλληλουχιών που κατά κύριο λόγο προέρχονταν από ασθενείς με CLL (υποσύνολο #13), αλλά και από άλλες κλινικές οντότητες (ένας ρευματοειδής παράγοντας από υγιές άτομο, η κλωνοτυπική BcR IG μιας περίπτωσης σπληνικού λεμφώματος οριακής ζώνης, 2 αλληλουχίες από ασθενείς με σύνδρομο Sjögren και μυοεπιθηλιακή σιελαδενίτιδα (SS-MESA) και η κλωνοτυπική BcR IG ασθενούς CLL με προηγηθείσα μικτή κρυσφαιριναιμία τύπου II σχετιζόμενη με HCV λοίμωξη (HCV/MC-II)). Όπως έχει ήδη αναφερθεί από την ομάδα μας⁸³, πολλές περιπτώσεις που κατατάσσονται σε αυτό το υποσύνολο, ανεξαρτήτως

πάθησης, είναι HCV-οροθετικά άτομα και το ίδιο βρέθηκε να ισχύει και για την περίπτωση 89VBB.



Εικόνα 15. Συχνότητα (%) της στερεοτυπίας BcR IG στην MBL και τη CLL.

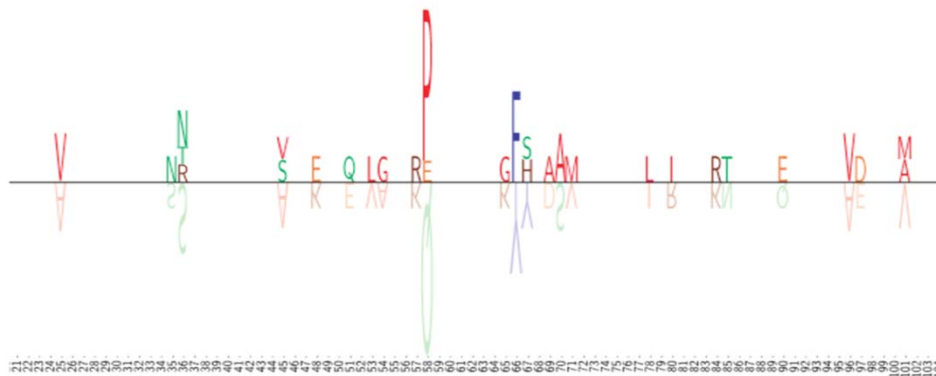
Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.01$ και $p < 0.001$ επισημαίνονται με **[**]** and **[***]**, αντιστοίχως.

Η δεύτερη περίπτωση LC-MBL με δημόσια στερεότυπη BcR IG (87VB) είχε ταυτόσημη VH CDR3 με: (i) μια περίπτωση λεμφώματος οριακής ζώνης του οφθαλμού (ocular adnexa marginal-zone lymphoma, OAMZL),¹⁵⁹ (ii) 2 περιπτώσεις CLL, (iii) 1 περίπτωση λεμφώματος οριακής ζώνης των σιελογόνων αδένων (salivary-gland MALT), (iv) 1 περίπτωση λεμφώματος MALT του στομάχου (gastric MALT), (v) 1 περίπτωση διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β κύτταρα (DLBCL) με HCV οροθετικότητα, και (vi) 1 ρευματοειδή παράγοντα (**Εικόνα 16A**).¹⁵⁹ Όλες αυτές οι περιπτώσεις είχαν ταυτόσημες VH CDR3 και επιπλέον παρουσίαζαν κοινό, στερεότυπο πρότυπο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στο κωδικόνιο 58 της VH CDR2 με αντικατάσταση της γλουταμίνης από προλίνη (**Εικόνα 16B**).

Σε αντίθεση με τη LC-MBL, μόνο 2 αναδιατάξεις HC-MBL ομαδοποιήθηκαν μαζί με αλληλουχίες από διαφορετικές οντότητες εκτός της CLL που βρίσκονταν κατατεθειμένες στην τράπεζα αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB. Η πρώτη ήταν μια μεταλλαγμένη αλληλουχία ταυτόσημη με ρευματοειδή παράγοντα, ενώ η δεύτερη ομαδοποιήθηκε με την κλωνοτυπική αλληλουχία μιας περίπτωσης λεμφώματος MALT σιελογόνων αδένων και την αυτοαντιδραστική IG ενός ασθενούς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren.

A.	LC-MBL	A R G D Y Y D S S G H Y H D A F D I
	OAMZL	- - - - - - - - - Y - - - - - - -
	Salivary gland MALT lymphoma	- - - - - - - - - Y F S - - - - T
	DLBCL, HCV-related	- - - - - - - T - - Y F S - - - - -
	Gastric MALT lymphoma	- - - - - F - - - - S F I - - - - -
	CLL	- - - - F - E - - - S - N - - - - V
	CLL	- - - - F - - T - - Y F N - - - - -
	Rheumatoid factor	- - - - - - - - - N - - - - - - V

B.



Εικόνα 16. Α) Οι VH CDR3 της περίπτωσης LC-MBL 87VB και των υπόλοιπων αλληλουχιών με τις οποίες ομαδοποιήθηκε. Οι παύλες υποδηλώνουν αμινοξική ταύτιση. Β) Οι σωματικές υπερμεταλλάξεις του γονιδίου IGHV της περίπτωσης LC-MBL 87VB και των υπόλοιπων αλληλουχιών με τις οποίες ομαδοποιήθηκε, όπως αποδίδονται με το εργαλείο στοίχισης πεπτιδίων TeXshade (<http://workbench.sdsc.edu/>). Απεικονίζονται οι αμινοξικές θέσεις 21-104 των γονιδίων IGHV κατά IMGT. Τα γράμματα πάνω από τη γραμμή επισημαίνουν τις αμινοξικές αλλαγές, ενώ τα γράμματα που εικονίζονται ανάποδα κάτω από τη γραμμή αντιστοιχούν στα αντίστοιχα αμινοξέα της βλαστικής σειράς. Η σχετική συχνότητα της κάθε αμινοξικής αλλαγής ανά θέση αποδίδεται με το μέγεθος των γραμμάτων. Τα κενά αντιστοιχούν σε αμινοξέα που παραμένουν ως είχαν στη βλαστική σειρά.

Συζήτηση

Γενικά, η CLL-like MBL θεωρείται προγενέστερη φάση της CLL, κατ' αναλογία με τη σχέση της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας αδιευκρίνιστης σημασίας και το πολλαπλό μυέλωμα. Πράγματι, μια προοπτική μελέτη κοορτής έδειξε ότι η CLL-like MBL προηγείται πάντοτε της CLL.¹⁵⁰ Ωστόσο, η συχνότητα της CLL-like MBL στο γενικό πληθυσμό είναι εξαιρετικά υψηλή, φτάνοντας έως και 12% όταν εφαρμόζονται εξειδικευμένα πρωτόκολλα κυτταρομετρίας ροής,¹⁴⁵ συνεπώς 100 υψηλότερη από τη συχνότητα της CLL, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο κίνδυνος μετάπτωσης σε CLL δεν είναι ίδιος για όλες τις περιπτώσεις MBL.¹⁵⁵ Συνεπώς, είναι ζωτικής σημασίας να μπορούμε να διακρίνουμε εκείνες τις περιπτώσεις που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εξελιχθούν σε CLL κι επομένως χρειάζονται κλινική παρακολούθηση. Η μελέτη των βιολογικών χαρακτηριστικών της MBL μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση προγνωστικών δεικτών που σχετίζονται με πρόοδο σε CLL κι έτσι να απαλλάξει τη μεγάλη πλειονότητα των

ατόμων με MBL από περιττή ψυχολογική επιβάρυνση και ιατρική παρακολούθηση, με προφανή κοινωνικοοικονομικά οφέλη.

Μέχρι στιγμής, ο μοναδικός παράγοντας που φάνηκε να έχει κάποια προγνωστική αξία για την πιθανότητα προόδου της MBL σε CLL που απαιτεί θεραπεία είναι ο απόλυτος αριθμός των κλωνικών B κυττάρων.¹⁵³ Με βάση τις καμπύλες επιβίωσης, προτάθηκε ότι η MBL μπορεί να διακριθεί σε δύο υποκατηγορίες, LC και HC-MBL, με κριτήριο το αν ο κλωνικός πληθυσμός είναι μικρότερος ή μεγαλύτερος από 0.5×10^9 κύτταρα/l, αντίστοιχα.^{154,156} Πρόσφατα, η ομάδα μας έδειξε ότι η LC-MBL έχει ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά, μεταξύ άλλων και το ρεπερτόριο των γονιδίων IG, σε σχέση με τη CLL (είτε με μεταλλαγμένες είτε με αμετάλλακτες κλωνοτυπικές BcR IG), ένδειξη ότι η συγκεκριμένη οντότητα μπορεί να μην αποτελεί πάντα μια προκαρκινική κατάσταση.¹⁴⁴

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε μια μεγάλη, πολυκεντρική ομάδα περιπτώσεων CLL-like MBL, τόσο LC όσο και HC, ώστε να επιχειρήσουμε πληροφοριακές συγκρίσεις του ρεπερτορίου IG μεταξύ LC-MBL, HC-MBL, CLL-o και CLL-all. Για όλες τις συγκρίσεις ακολουθήσαμε το κατώφλι των 0.5×10^9 κλωνικών κυττάρων/l προκειμένου να διαχωρίσουμε τη LC από τη HC-MBL. Αυτό το αριθμητικό όριο αφενός προτείνεται από τη βιβλιογραφία, αφετέρου αξιολογήθηκε και στο πλαίσιο της ίδιας της μελέτης. Συγκεκριμένα, η χρήση άλλων αριθμητικών ορίων (1.0 και 1.5×10^9 κλωνικά κύτταρα/l) δεν επηρέασε τα αποτελέσματά μας, καθότι η κατανομή των περιπτώσεων MBL ήταν πολωμένη είτε προς πολύ μικρά μεγέθη κλωνικών εκπτώξεων είτε προς κλώνους με $>1.5 \times 10^9$ κύτταρα MBL/l, και οι περιπτώσεις με ενδιάμεσο μέγεθος κλώνου ($0.5 - 1.5 \times 10^9$ /l) ήταν πολύ λίγες ($n=17$) (Εικόνα 12).

Η ανάλυση των γονιδίων IGHV αποκάλυψε σημαντικές διαφορές της LC-MBL σε σχέση με τη HC-MBL και με τη CLL-all, τόσο ως προς τη συχνότητα χρήσης γονιδίων, αλλά κυρίως ως προς τη συχνότητα της στερεοτυπίας των BcR IG. Από την άλλη, η HC-MBL παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα με τη CLL, ιδίως με τη CLL σταδίου Rai ο. Συγκεκριμένα, στη LC-MBL υποεκπροσωπείται το γονίδιο IGHV1-69, ενώ υπερεκπροσωπείται το γονίδιο IGHV4-59/61, σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές.¹⁴⁴ Η υποεκπροσώπηση του γονιδίου IGHV1-69 στη LC-MBL πιθανόν σχετίζεται με τη συνολική απουσία στερεοτυπίας σε αυτή την υποκατηγορία, καθότι αυτό το γονίδιο αξιοποιείται με αυξημένη συχνότητα σε στερεότυπες αναδιατάξεις της CLL.^{75,76}

Η στερεοτυπία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της CLL και αφορά σχεδόν το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων.^{74,75} Συνεπώς, η σπανιότητα στερεότυπων BcR IG στη LC-MBL είναι αξιοσημείωτο εύρημα και ένδειξη φυλογενετικής απόστασης της LC-MBL από τη CLL, σε αντίθεση με τη HC-MBL που χαρακτηρίζεται από σαφώς μεγαλύτερη συχνότητα στερεότυπων BcR, παρόμοια μάλιστα με αυτήν της CLL-o, με την οποία φαίνεται να έχει μεγαλύτερη βιολογική συγγένεια.

Εάν λάβουμε υπόψη ότι οι περιπτώσεις HC-MBL έχουν κίνδυνο εξέλιξης σε CLL που απαιτεί θεραπεία με συχνότητα που δεν είναι αμελητέα ($1-4\%$ /έτος),^{154,156,160} ενώ οι ασθενείς με CLL-o αναμένεται ότι θα χρειαστούν θεραπεία με ρυθμό περίπου 5% /έτος¹⁶¹, γίνεται αντιληπτό ότι και οι δύο υποκατηγορίες αποτελούν μίγμα περιπτώσεων με διαφορετική πιθανότητα κλινικής εξέλιξης. Αυτό το γεγονός αναδεικνύει την ανάγκη αναγνώρισης μοριακών ή κλινικών υπογραφών, πέρα από το αριθμητικό όριο των 5×10^9 κλωνικών B κυττάρων/l, που να μπορεί να διακρίνουν τις περιπτώσεις ανάλογα με τον κίνδυνο εξέλιξης ανεξαρτήτως διάγνωσης HC-MBL ή CLL.

Από κλινική άποψη, τα ανοσογενετικά δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη συνηγορούν με την αντιμετώπιση της HC-MBL ως CLL που δεν απαιτεί θεραπεία, δηλαδή με συστηματική παρακολούθηση. Απαιτούνται προοπτικές μελέτες για να φανεί αν η αξιολόγηση του γονιδίου IGHV ή της στερεοτυπίας του κλωνοτυπικού BcR θα μπορούσε να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες για τη διακρίβωση του μικρού ποσοστού των περιπτώσεων HC-MBL που τελικά θα εξελιχθούν σε CLL. Από αυτή την άποψη, αξίζει να αναφερθεί πως το πιο συχνό στερεότυπο υποσύνολο που αναγνωρίστηκε στη HC-MBL ήταν το υποσύνολο #2 (IGHV3-21/IGHJ6 VH CDR3; 10%, 7/72 στερεότυπους κλώνους HC-MBL). Το συγκεκριμένο υποσύνολο χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα επιθετική κλινική συμπεριφορά,^{100,162,163} επομένως θα ήταν εύλογο να υποθέσουμε πως μια περίπτωση HC-MBL που κατατάσσεται σε αυτό θα πρέπει να παρακολουθείται στενότερα.

Από την άλλη, η υπερεκπροσώπηση των γονιδίων IGHV_{4-59/61} στη LC-MBL παραπέμπει στην αύξηση της συχνότητας χρήσης αυτών των γονιδίων σε ηλικιωμένους,¹⁶⁴ άρα μπορεί απλώς να προκύπτει από τον περιορισμό του ρεπερτορίου σε υγιή άτομα με την προοδευτική αύξηση της ηλικίας.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Συνεπώς, η LC-MBL ίσως αποτελεί απλώς επιφανιόμενο της φυσιολογικής ανοσολογικής γήρανσης. Ανάλογος περιορισμός του ρεπερτορίου με την ηλικία παρατηρείται και στα T κύτταρα, ιδίως στα CD8⁺ αλλά και στα CD4^{high}CD8^{low}.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Η συχνή παρουσία κλωνικών εκπτώξεων των CD8⁺ T κυττάρων, αλλά και T κυτταρικών υποπληθυσμών που κανονικά είναι αμελητέας συχνότητας, σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, προσομοιάζει στη CLL-like MBL, η συχνότητα της οποίας επίσης προοδευτικά αυξάνει με την ηλικία.^{145,171,172} Εξάλλου, η διαπίστωση "δημόσιων ανοσογενετικών υπογραφών" στη LC-MBL αποτελεί επιπρόσθετη ένδειξη ότι δεν αντιστοιχεί απαραίτητα σε προλευχαιμική κατάσταση, αντίθετα μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα του περιορισμού/πόλωσης του ρεπερτορίου λόγω ανοσολογικής γήρανσης ή/και χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού.¹⁷³ Σε αυτό το πλαίσιο θα μπορούσε να εξηγηθεί και η αυξημένη συχνότητα πολλαπλών παραγωγικών αναδιατάξεων στη LC-MBL. Γνωρίζουμε ότι τα αυτοαντιδραστικά κύτταρα μπορεί να εκφράζουν περισσότερες BcR IG, διότι η συνεχής διέγερση από αυτοαντιγόνα μπορεί τελικά να παρακάμψει το μηχανισμό αποκλεισμού αλληλομόρφου σε μια προσπάθεια "επιδιόρθωσης" (editing) της αυτοαντιδραστικότητας ("receptor dilution").¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Αντίθετα, η συχνότητα πολλαπλών παραγωγικών αναδιατάξεων στη HC-MBL ήταν παρόμοια με ό,τι ισχύει για τη CLL.¹⁷⁷ Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν ότι η LC-MBL μπορεί να αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα όπου η κλωνικότητα δε συνεπάγεται κακοήθεια και θέτουν υπό αμφισβήτηση την οντογενετική της σχέση με τη CLL.

Παρόλ' αυτά, η φαινομενικά καλοήθης φύση της LC-MBL πρέπει κάπως να συμβιβαστεί με την ανεύρεση των ίδιων κυτταρογενετικών ανωμαλιών που χαρακτηρίζουν τη CLL (del13q, trisomy 12, del17p).¹⁵⁵ Πρόσφατη μελέτη παρακολούθησης της LC-MBL έδειξε ότι καμία περίπτωση, ακόμη και όταν αφορούσε κλώνο με κυτταρογενετικές ανωμαλίες, δεν εξελίχθηκε σε HC-MBL/CLL, με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 34 μήνες.¹⁵⁵ Εξάλλου, γνωρίζουμε ότι B λεμφοκύτταρα υγιών ατόμων μπορεί να φέρουν κλασικές γενετικές βλάβες λεμφωμάτων, π.χ. την t(14;18) του λεμφοζιδιακού λεμφώματος (σε 30%- >70% του υγιούς πληθυσμού)¹⁷⁸⁻¹⁸¹ και την t(11;14) του λεμφώματος από το κύτταρο του μανδύα (σε 1-7% του υγιούς πληθυσμού).^{182,183} Γενικά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι γενετικές βλάβες της MBL συμβαίνουν νωρίς στην οντογενετική της πορεία, ίσως ως

αποτέλεσμα παρατεταμένων σημάτων πολλαπλασιασμού μέσω αντιγονικής διέγερσης, και σχετίζονται περισσότερο με την απόκτηση παθολογικού φαινότυπου παρά με καθ αυτή κακοήθη εξαλλαγή.

Μια εύλογη επισήμανση θα ήταν ότι, εφόσον η HC-MBL/CLL κατά πάσα πιθανότητα προέρχεται από ένα προγονικό κύτταρο που πολλαπλασιάζεται κλωνικά καθώς συσσωρεύει βλάβες που του προσδίδουν κακόηθες δυναμικό, θα πρέπει να περνά και από τη φάση της μικρής κλωνικής έκπτυξης, δηλαδή της LC-MBL. Πιστεύουμε ότι στη LC-MBL ο κλωνικός πληθυσμός που προκύπτει από αντιγονικό ερεθισμό διατηρείται σταθερός, παρ' ότι τα σήματα πολλαπλασιασμού που δέχεται μπορεί να οδηγήσουν στην απόκτηση γενετικών βλαβών. Πιθανώς η HC-MBL/CLL αναπτύσσεται μόνο σε έδαφος κάποιου είδους γενετικής προδιάθεσης, όπου ο κλώνος εκπτύσσεται με διαφορετική δυναμική, ανάλογα με την προδιάθεση και το είδος των πολλαπλασιαστικών σημάτων, και περνά γρήγορα από τη φάση της LC-MBL σε HC-MBL/CLL. Αυτή η υπόθεση εξηγεί ίσως και την πολωμένη κατανομή των περιπτώσεων MBL της μελέτης: λίγες μόνο περιπτώσεις είχαν κλώνο ενδιάμεσου μεγέθους ($0.5-1.5 \times 10^9$ κύτταρα/l), ενώ η συντριπτική πλειοψηφία αφορούσε είτε πραγματικά μικρούς κλώνους (Δμ κλωνικών B κυττάρων 0.008×10^9 /l), είτε μεγάλους κλώνους ($>1.5 \times 10^9$ κύτταρα/l).

Εξαιτίας του πολύ μικρού μεγέθους του κλώνου, η LC-MBL σπανίως θα προκαλέσει κάποια διαταραχή στην απλή γενική αίματος και θα εντοπιστεί μόνο εφόσον εφαρμοστούν εξειδικευμένα πρωτόκολλα κυτταρομετρίας ροής. Συνεπώς, ο κλινικός γιατρός δεν αναμένεται να έρθει αντιμέτωπος με αυτή την οντότητα στην καθημερινή πράξη. Σε κάθε περίπτωση, τα ανοσογενετικά δεδομένα της παρούσας μελέτης συνηγορούν ότι η LC-MBL δεν έχει κλινική σημασία και δεν απαιτεί παρακολούθηση, αλλά ούτε και διερεύνηση βιολογικών προγνωστικών δεικτών (παρά μόνο στα πλαίσια της έρευνας).

Συμπερασματικά, μολονότι η LC-MBL μπορεί να προκύπτει απο επίμονο αντιγονικό ερεθισμό, φαίνεται πως ακολουθεί διαφορετική οντογενετική πορεία από τη CLL. Αντίθετα, η HC-MBL παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανοσογενετική ομοιότητα με τη CLL-ο (από τη χρήση γονιδίων IGHV έως τη συχνότητα ειδικών για τη CLL στερεότυπων BcR IG), γεγονός που υπογραμμίζει την ανοσοβιολογική τους συγγένεια και συνάδει με την κλινική τους ομοιότητα. Ο λεπτομερής μοριακός χαρακτηρισμός της στερεοτυπίας του BcR σε συνδυασμό με μελέτες μακράς κλινικής παρακολούθησης της HC-MBL μπορεί να αποσαφηνίσουν εάν τα μοριακά χαρακτηριστικά του κλωνοτυπικού BcR μπορούν να χρησιμεύσουν ως εργαλείο πρόβλεψης της εξέλιξης σε CLL.

Εισαγωγή

Η μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων CLL εκφράζουν κλωνοτυπικές IG μ και δ ισοτύπου (IgM⁺IgD⁺, MD-CLL)¹⁸⁴, ωστόσο συχνά μπορεί να συνυπάρχουν μικροί υποκλώνοι που παρουσιάζουν εναλλαγή ισοτύπου (class switch recombination, CSR)^{185,186}. Πράγματι, η CSR φαίνεται πως είναι ανεξάρτητη από τη σωματική υπερμεταλλαξιγένεση στη CLL, τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις. Παραδόξως μάλιστα, CSR διαπιστώνεται κατά κύριο λόγο στις περιπτώσεις ασθενών με αμετάλλακτες BcR IG (U-CLL)^{187,188}.

Η δεαμινάση της κυτιδίνης (activation-induced cytidine deaminase, AID), ένζυμο που κανονικά απαιτείται τόσο για τη SHM όσο και για τη CSR, εκφράζεται σ' έναν μικρό υποπληθυσμό του CLL κλώνου με αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό ανεξάρτητα από το μεταλλακτικό status των γονιδίων IGHV, και επάγεται *in vitro* υπό συνθήκες που αναπαράγουν σήματα από βοηθητικά T κύτταρα¹⁸⁹. Επιπλέον, υψηλή έκφραση της AID και συνεχιζόμενη CSR έχουν περιγραφεί για μια υποομάδα της U-CLL με ιδιαίτερα δυσμενή πρόγνωση, υπογραμμίζοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον για τη βιολογική συμπεριφορά του κλώνου και, τελικά, την κλινική έκβαση¹⁹⁰. Ωστόσο, τα ακριβή σήματα που επάγουν τη CSR στη CLL δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

Οι περιπτώσεις CLL όπου ο κύριος κλώνος εμφανίζει εναλλαγή ισοτύπου είναι σχετικά σπάνιες (6-10%)¹⁹¹. Η μεγάλη πλειονότητα αυτών των περιπτώσεων παρουσιάζουν γάμμα ισότυπο (G-CLL), ωστόσο δεν υπάρχουν πολλά δημοσιευμένα δεδομένα για τη συγκεκριμένη υποκατηγορία. Μια πρόσφατη μελέτη όπου επιχειρήθηκε φαινοτυπικός, μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός 14 μη επιλεγμένων περιπτώσεων G-CLL, πρότεινε ότι η συγκεκριμένη υποκατηγορία σχετίζεται οντογενετικά με τη M-CLL και προέρχεται από B κύτταρα που έχουν διέλθει από το βλαστικό κέντρο¹⁹². Όμως, αυτή η υπόθεση δε μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη U-CLL με γάμμα ισότυπο.

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να διευκρινίσουμε την προέλευση της G-CLL μέσω ενδελχούς χαρακτηρισμού του ρεπερτορίου των γονιδίων IG στη μεγαλύτερη σειρά ασθενών που μελετήθηκε ως τώρα γι' αυτό το σκοπό. Επιλέξαμε να προσεγγίσουμε το θέμα από ανοσογενετική σκοπιά με βάση βιολογικά και κλινικά δεδομένα που καταδεικνύουν ότι διαφορετικοί τύποι BcR μπορεί να μεταβιβάζουν διαφορετικού είδους σήματα, ιδίως υπό το πρίσμα νέων βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του BcR^{117,193-198}. Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι η G-CLL επιδεικνύει διαφορετικό ανοσογενετικό προφίλ από την κλασική MD-CLL, ακόμη και όταν εστιάζουμε τη σύγκριση μεταξύ περιπτώσεων με μεταλλαγμένες BcR IG. Αυτό υπαινίσσεται ότι μπορεί να έχει διαφορετική οντογενετική προέλευση ή/και να προκύπτει μέσω διαφορετικών άνοσων επιδράσεων.

Υλικά και μέθοδοι

Ομάδα ασθενών

Πραγματοποιήσαμε ενδεδειγμένη ανοσογενετικό χαρακτηρισμό μιας μεγάλης σειράς ασθενών με CLL (n=1256) από συνεργαζόμενα κέντρα στην Ελλάδα, την Ιταλία και την Σουηδία. Οι ασθενείς επιλέχθηκαν με βάση τη διαθεσιμότητα καταγεγραμμένης πληροφορίας για τον ισότυπο της κλωνοτυπικής IG με έλεγχο που έγινε σε περιφερικό αίμα είτε με κυτταρομετρία ροής (n=1030) είτε με RT-PCR για κλωνοτυπικές μ , δ και γ γάμμα αναδιατάξεις (n=226). Μεταξύ αυτών των ασθενών, 1087 εξέφραζαν βαριές αλυσίδες με μ/δ ισότυπο και 169 με γ γάμμα ισότυπο, αντιστοίχως. Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2. Η διάγνωση της CLL έγινε σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια iwCLL/NCI¹⁹⁹. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής κάθε συνεργαζόμενου κέντρου.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	MD-CLL	G-CLL	p-value
Ηλικία (έτη, Δμ)	65	61	<0.001
Φύλο			
Άρρεν	581 (65%)	100 (60%)	
Θήλυ	320 (34%)	66 (40%)	0.30
Στάδιο Binet B-C	156/744 (21%)	21/132 (26%)	0.18
CD38 >7%	339/832 (41%)	48/148 (32%)	0.06
ZAP-70 >20%	170/460 (37%)	12/67 (18%)	0.002
Μεταλλαγμένο γονίδιο IGHV (<98% GI)	614/1087 (56%)	142/169 (84%)	<0.001
Σύμπλοκος καρυότυπος*	32/362 (9%)	6/62 (10%)	0.83
Πολλαπλές τρισωμίες (+12, +18, +19)**	0/362 (0%)	8/62 (13%)	<0.001
Τρισωμία 12 (FISH)	45/356 (13%)	14/56 (25%)	0.01
del13q (FISH)	175/362 (48%)	27/57 (47%)	0.89
del11q (FISH)	44/362 (12%)	1/56 (2%)	0.02
del17p (FISH)	42/369 (11%)	3/59 (5%)	0.14
Μετάλλαξη NOTCH1 (εξόνιο 34)	18/426 (4%)	1/90 (1%)	0.15
Ανάγκη θεραπείας	327/406 (81%)	60/83 (72%)	0.09
TTFT (μήνες)	23	39.7	0.03

Πίνακας 2. Δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων MD-CLL έναντι G-CLL.

* Τρεις ή περισσότερες αριθμητικές ή/και δομικές βλάβες

** Οι περιπτώσεις με συνυπάρχουσες τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 12, 18 και 19 αναλύθηκαν χωριστά από τις περιπτώσεις με σύμπλοκο καρυότυπο με βάση προηγούμενες αναφορές ότι σχετίζονται με ιδιαίτερα ήπια κλινική πορεία, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις με σύμπλοκο καρυότυπο¹⁰⁹.

Ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ με PCR και ανάλυση των αλληλουχιών

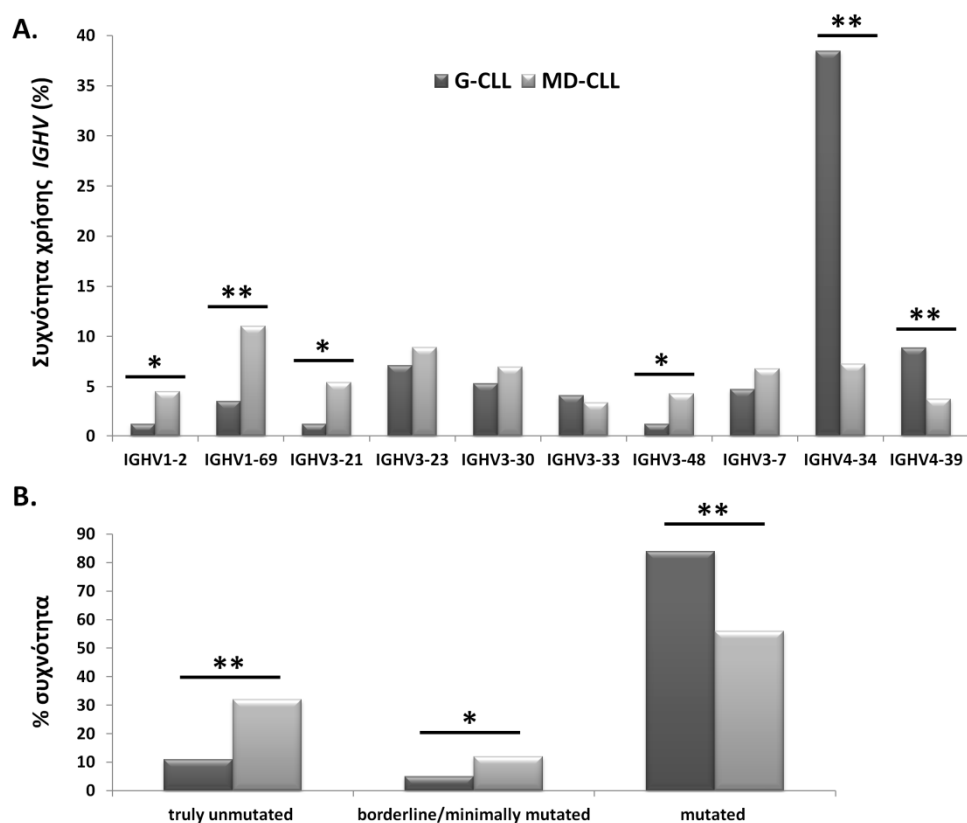
Η ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ πραγματοποιήθηκε σε γενωμικό DNA (gDNA) ή συμπληρωματικό DNA (cDNA), σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις.^{77,144} Οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με το εργαλείο IMG/QUEST (<http://www.imgt.org>).¹⁵⁷ Η κατάταξη των BcR IG σε στερεότυπα υποσύνολα έγινε σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια.⁷⁵

Αποτελέσματα

Ρεπερτόριο IG και το φορτίο SHM στη G-CLL έναντι της MD-CLL

Το ρεπερτόριο IG της G-CLL παρουσίαζε ιδιαίτερη επιλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, η υποομάδα γονιδίων IGHV₄ υπερεκπροσωπούταν (90/169, 53%), ακολουθούμενη από την υποομάδα γονιδίων IGHV₃ (60/169, 35%). Αναγνωρίστηκαν 32 λειτουργικά γονίδια IGHV, με το γονίδιο IGHV₄₋₃₄ να υπερέχει σημαντικά (38%), ακολουθούμενο από τα γονίδια IGHV₄₋₃₉ (9%), IGHV₃₋₂₃ (7%) και IGHV₃₋₃₀ (5%). Συνολικά, αυτά τα 4 γονίδια αντιστοιχούσαν περίπου στο 60% του ρεπερτορίου της G-CLL.

Η σύγκριση της G-CLL με την MD-CLL αποκάλυψε σημαντικές διαφορές, με τα γονίδια IGHV₄₋₃₄ και IGHV₄₋₃₉ να υπερεκπροσωπούνται σημαντικά ($p < 0.001$) στη G-CLL. Αντίστροφα, τα γονίδια IGHV₁₋₆₉, IGHV₃₋₂₁, IGHV₁₋₂ και IGHV₃₋₄₈ ήταν πολύ σπανιότερα ($p < 0.05$) σε σχέση με την MD-CLL (Εικόνα 17A). Η σημαντική υποεκπροσώπηση του γονιδίου IGHV₁₋₆₉ στη G-CLL σε σχέση με την MD-CLL είναι αξιοσημείωτη, λαμβάνοντας υπόψη ότι είναι το συχνότερο γονίδιο στη CLL^{74,139,200}.

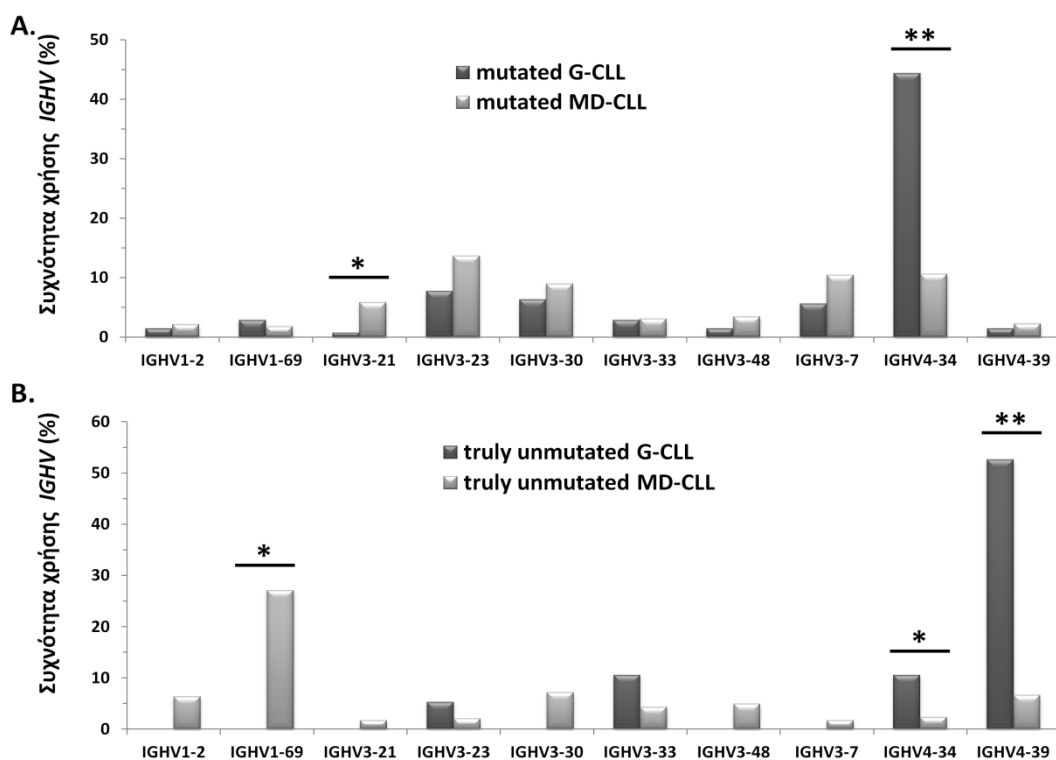


Εικόνα 17. Το ρεπερτόριο των γονιδίων IG και το φορτίο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στη G-CLL έναντι της MD-CLL. A) Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη G-CLL έναντι MD-CLL. B) Σχετική κατανομή της G-CLL σε σχέση με την MD-CLL σε τρεις κατηγορίες με βάση το φορτίο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης: (i) πλήρως αμετάλλακτα γονίδια IGHV (truly unmutated, 100% GI), (ii) οριακά μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (borderline/minimally mutated, 98-99.9% GI), και (iii) μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (mutated, <98% GI). Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$ και $p < 0.001$ επισημαίνονται με [*] and [**], αντιστοίχως.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το φορτίο της SHM στη G-CLL σε σύγκριση με την MD-CLL. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ακόμη και ελάχιστες σωματικές υπερμεταλλάξεις μπορεί να

επιφέρουν σημαντικές λειτουργικές μεταβολές, διακρίναμε τις περιπτώσεις σε τρεις κατηγορίες: (i) πλήρως αμετάλλακτα γονίδια IGHV (truly unmutated, 100% GI), (ii) οριακά μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (borderline/minimally mutated, 98-99.9% GI), και (iii) μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (mutated, <98% GI)^{77,201}. Παρατηρήσαμε σημαντικά ανισότιμη κατανομή των περιπτώσεων G-CLL και MD-CLL ($p < 0.05$) σε αυτές τις τρεις κατηγορίες. Συγκεκριμένα, μόλις 11% (19/169) των αναδιατάξεων G-CLL είχαν πλήρως αμετάλλακτα γονίδια IGHV, έναντι 32% (347/1087) των αναδιατάξεων MD-CLL. Παρομοίως, 5% (8/169) αναδιατάξεις G-CLL είχαν οριακά μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, έναντι 12% (126/1087) των αναδιατάξεων MD-CLL. Αντίθετα, 84% (142/169) των αναδιατάξεων G-CLL είχε μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, έναντι μόλις 56% (614/1087) στην MD-CLL (**Εικόνα 17B**).

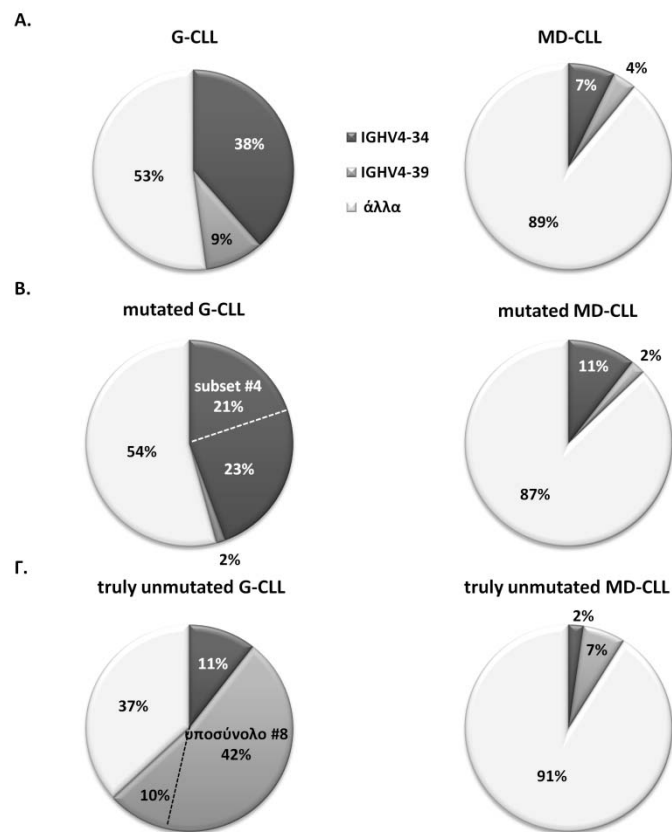
Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω διαφορές, πραγματοποιήσαμε συγκρίσεις ρεπερτορίου G-CLL έναντι MD-CLL στις επιμέρους κατηγορίες SHM. Διαπιστώσαμε σημαντική υπερεκπροσώπηση: (i) του γονιδίου *IGHV4-34* μεταξύ των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων της G-CLL έναντι της MD-CLL (63/142 έναντι 65/614 περιπτώσεων, αντιστοίχως/ $p < 0.0001$), και (ii) του γονιδίου *IGHV4-39* μεταξύ πλήρως αμετάλλακτων αναδιατάξεων της G-CLL έναντι της MD-CLL (10/19 έναντι 23/347 περιπτώσεων, αντιστοίχως/ $p < 0.0001$). Για την ενδιάμεση κατηγορία με οριακά μεταλλαγμένες αναδιατάξεις δεν προχωρήσαμε σε συγκρίσεις, επειδή περιλάμβανε πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων G-CLL ($n=8$) (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18. Σύγκριση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV μεταξύ G-CLL και MD-CLL ανάλογα με το φορτίο SHM. Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$ και $p < 0.001$ επισημαίνονται με [*] and [**], αντίστοιχα.

Στερεοτυπία του BcR στη G-CLL έναντι της MD-CLL

Αναζητώντας πρότυπα που θα μπορούσε να ερμηνεύσουν τις διαφορές του ρεπερτορίου IG μεταξύ G-CLL και MD-CLL, μελετήσαμε τη συχνότητα της στερεοτυπίας του BcR στις δύο ομάδες. Πράγματι, ανάλυση ομαδοποίησης των αλληλουχιών VH CDR3 αποκάλυψε ότι η εξαιρετική επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου της G-CLL προκύπτει από το γεγονός ότι σχεδόν το ένα τρίτο των περιπτώσεων κατατάσσονται σε τρία στερεότυπα υποσύνολα: (i) μεταλλαγμένο υποσύνολο #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*), 31/169 περιπτώσεις (18%), (ii) αμετάλλακτο υποσύνολο #8 (*IGHV4-39/IGKV1(D)-39*), 11/169 περιπτώσεις (7%), και (iii) αμεταλλαγμένο υποσύνολο #16 (*IGHV4-34/IGKV3-20*), 7/169 περιπτώσεις (4%). Τα στερεότυπα υποσύνολα #4 και #8 μπορεί να θεωρηθούν ως παραδειγματικοί εκπρόσωποι της μεταλλαγμένης και πλήρως αμετάλλακτης G-CLL, αντιστοίχως, καθώς αντισπροσωπεύουν το 22% και 42% αυτών των κατηγοριών (Εικόνα 19). Εξάλλου, στη μεγάλη πώλωση του ρεπερτορίου IG της G-CLL συνεισφέρει και το γεγονός ότι όλα τα μείζονα στερεότυπα υποσύνολα της CLL που χρησιμοποιούν τα γονίδια *IGHV1-69*, *IGHV3-21*, *IGHV1-2* και *IGHV3-48* αφορούν αποκλειστικά στην MD-CLL.



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση των σχετικών συχνοτήτων των δύο πιο συχνών γονιδίων IGHV στη G-CLL (*IGHV4-34* και *IGHV4-39*). Α) G-CLL έναντι MD-CLL. Β) Μεταλλαγμένη G-CLL έναντι μεταλλαγμένης MD-CLL. Γ) Πλήρως αμετάλλακτη G-CLL έναντι πλήρως αμετάλλακτης MD-CLL. Απεικονίζεται επίσης το ποσοστό που αντιστοιχεί στα στερεότυπα υποσύνολα #4 και #8.

Με την εξαίρεση των υποσυνόλων #4, #8 and #16, οι υπόλοιπες κλωνοτυπικές BcR IG της G-CLL παρουσίαζαν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη χρήση των γονιδίων IGHV και τη

σύνθεση των VH CDR3. Μια υποομάδα ασθενών παρουσίαζε συνυπάρχουσες τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 12, 18 and 19 (n=8/169, 5% της G-CLL). Αυτές οι περιπτώσεις εξέφραζαν μεταλλαγμένες BcR IG, ωστόσο με ποικίλα γονίδια IGHV και χαρακτηριστικά VH CDR3, σε συμφωνία με δημοσιευμένα δεδομένα¹⁰⁹.

Τα στερεότυπα υποσύνολα #4 και #8 παρουσιάζουν διαφορετικά κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά

Το γεγονός ότι τα υποσύνολα #4 και #8 αναδεικνύονται ως οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι της G-CLL φαίνεται εκ πρώτης όψεως παράδοξο, λαμβάνοντας υπόψη τις μεγάλες διαφορές τους ως προς την κλινική εικόνα και έκβαση. Έτσι, μελετήσαμε τα κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά των αντίστοιχων ασθενών (Πίνακας 3). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες^{76,202}, οι ασθενείς του υποσυνόλου #4 ήταν σημαντικά νεότεροι και σε πιο πρώιμο κλινικό στάδιο κατά τη διάγνωση σε σύγκριση με τους ασθενείς του υποσυνόλου #8. Επιπλέον, με παρόμοιο διάστημα παρακολούθησης, οι ασθενείς του υποσυνόλου #4 χρειάστηκαν σπανιότερα θεραπεία από τους ασθενείς του υποσυνόλου #8

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	Υποσύνολο #4	Υποσύνολο #8	p value
Ηλικία (έτη, Δμ)	52	66	0.02
Φύλο			
Άρρεν	19 (61%)	6 (55%)	
Θήλυ	12 (39%)	5 (45%)	0.70
Στάδιο Binet B-C	4/26 (15%)	3/6 (50%)	0.06
CD38 >7%	1/27 (4%)	5/6 (83%)	<0.001
ZAP-70 >20%	1/12 (8%)	2/2 (100%)	0.003
Μεταλλαγμένο γονίδιο IGHV (<98% GI)	31/31 (100%)	0/11 (0%)	<0.001
Σύμπλοκος καρυότυπος*	0/12 (0%)	0/3 (0%)	-
Πολλαπλές τρισωμίες (+12, +18, +19)**	0/12 (0%)	0/3 (0%)	-
trisomy 12 (FISH)	0/16 (0%)	3/5 (60%)	<0.001
del13q (FISH)	11/16 (69%)	2/5 (40%)	0.25
del11q (FISH)	1/16 (6%)	0/5 (0%)	0.57
del17p (FISH)	0/16 (0%)	0/5 (0%)	-
Μετάλλαξη TP53	0/7 (0%)	0/2 (0%)	-
Ανάγκη θεραπείας	11/25 (44%)	6/6 (100%)	0.01
TTFT (μήνες)	79.4	50.4	0.28
Εκτροπή σε σύνδρομο Richter	0/31 (0%)	1/11 (9%)	0.09

Πίνακας 3. Δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων του υποσυνόλου #4 έναντι του υποσυνόλου #8.

* Τρεις ή περισσότερες αριθμητικές ή/και δομικές βλάβες

** Οι περιπτώσεις με συνυπάρχουσες τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 12, 18 και 19 αναλύθηκαν χωριστά από τις περιπτώσεις με σύμπλοκο καρυότυπο με βάση προηγούμενες αναφορές ότι σχετίζονται με ιδιαίτερα ήπια κλινική πορεία, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις με σύμπλοκο καρυότυπο¹⁰⁹.

Σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία^{74,76}, όλοι οι ασθενείς του υποσύνολου #4 είχαν μεταλλαγμένες BcR IG, ενώ όλοι οι ασθενείς του υποσύνολου #8 εξέφραζαν BcR IG με πλήρως αμετάλλακτο γονίδιο IGHV. Επιπλέον, τα δύο υποσύνολα χαρακτηρίζονταν από διαφορετική συχνότητα έκφρασης CD38 and ZAP70 (σπάνια στο υποσύνολο #4, συχνά στο υποσύνολο #8). Τέλος, παρουσίαζαν διαφορετικό προφίλ γενετικών βλαβών, ιδίως όσον αφορά την τρισωμία 12 (0% στο υποσύνολο #4 έναντι 60% στο υποσύνολο #8, $p < 0.001$).

Συζήτηση

Πραγματοποιήσαμε ενδελεχή ανοσογενετική ανάλυση της μεγαλύτερης σειράς CLL με εναλλαγή ιστού (G-CLL) που μελετήθηκε μέχρι σήμερα γι' αυτό το σκοπό, αναζητώντας παράλληλα κλινικοβιολογικές συσχετίσεις. Τα αποτελέσματα της μελέτης στοιχειοθετούν μια ιδιαίτερη ανοσογενετική υπογραφή γι' αυτή τη σχετικά σπάνια υποκατηγορία CLL, η οποία διαφέρει από την κλασική MD-CLL και χαρακτηρίζεται από την υπερεκπροσώπηση των στερεότυπων υποσυνόλων #4 και #8.

Οι κλώνοι του στερεότυπου υποσύνολου #4 είναι δυνητικά αυτοαντιδραστικοί και μόνο εξαιτίας της έκφρασης του γονιδίου *IGHV4-34*. Τα φυσιολογικά B κύτταρα που εκφράζουν αυτό το γονίδιο αποτελούν *in vivo* μοντέλο αυτοαντιδραστικότητας, καθώς έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τον επίτοπο N-ακετυλλακτοζαμίνη που εκφράζεται τόσο σε εξωγενή αντιγόνα όσο και σε αυτοαντιγόνα²⁰³. Η αναγνώριση γίνεται μέσω ενός μοτίβου που κωδικοποιείται από τη βλαστική σειρά του γονιδίου *IGHV4-34*, στην περιοχή VH FR1. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όλες οι περιπτώσεις του υποσύνολου #4 που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη διατηρούσαν άθικτο αυτό το μοτίβο⁷⁷.

Επιπρόσθετα στοιχεία που συνδέουν το υποσύνολο #4 με αυτοαντιδραστικότητα, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και στην παρούσα μελέτη, είναι: (i) η έντονη ηλεκτροθετικότητα της VH CDR3, καθότι είναι εμπλουτισμένη σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, παραπέμποντας σε αντι-DNA αντισώματα, και (ii) η παρουσία τυπικών σωματικών υπερμεταλλάξεων που εισάγουν όξινα αμινοξικά κατάλοιπα στις μεταβλητές περιοχές τόσο της βαριάς (VH) όσο και της ελαφριάς κάππα (VK) αλυσίδας, κατ' αντιστοιχία με γνωστούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης της αυτοαντιδραστικότητας των αντι-DNA αντισωμάτων^{77,101}. Στο ίδιο πλαίσιο, παρά την έντονη και παρατεινόμενη σωματική υπερμεταλλαξιγένεση στην οποία υπόκεινται οι BcR IG του συγκεκριμένου υποσύνολου που οδηγεί σε σημαντική ενδοκλωνική ετερογένεια, οι υποκλώνοι φαίνεται να διατηρούν εκείνες τις σωματικές υπερμεταλλάξεις που αφορούν σε εισαγωγή όξινων αμινοξικών καταλοίπων, ένδειξη λειτουργικών περιορισμών στο πλαίσιο ελέγχου της αυτοαντιδραστικότητας^{76,113,114}. Πράγματι, ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα από ασθενείς του υποσύνολου #4 δεν αναγνωρίζουν DNA, αλλά αποκτούν αυτή την ικανότητα εάν η αλληλουχία αναστραφεί στη βλαστική σειρά²⁰⁴.

Αναζητώντας επιπρόσθετα ανοσογενετικά στοιχεία για την οντογένεση του υποσύνολου #4, πραγματοποιήσαμε μετα-ανάλυση των αλληλουχιών IG που προέκυψαν από μια πρόσφατη μελέτη μαζικής κλίμακας, όπου επιχειρήθηκε χαρακτηρισμός του ρεπερτορίου συνδυασμών βαριάς-ελαφριάς αλυσίδας σε φυσιολογικά B κύτταρα γάμμα ιστού με χρήση τεχνικών αλληλούχησης νέας γενιάς (next-generation sequencing, NGS)²⁰⁵. Παρά το μεγάλο πλήθος αλληλουχιών BcR IG (1.4×10^5 ζεύγη IGH/IGK,) μόνο μία

βρέθηκε να εκφράζει το συνδυασμό *IGHV4-34/IGKV2-30* και μάλιστα με VH και VK CDR3 που διέφεραν δραστικά από τις αντίστοιχες που χαρακτηρίζουν το υποσύνολο #4.

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το προγονικό κύτταρο του υποσυνόλου #4 είναι ένας ιδιαίτερος, σπάνιος τύπος αυτοαντιδραστικού B κυττάρου που υποβάλλεται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης της αυτοαντιδραστικότητάς του μέσω SHM ώστε να αποφύγει την απαλοιφή (deletion). Ερωτήματα σχετικά με το πότε, πού και υπό ποιες συνθήκες αυτό το κύτταρο υποβάλλεται σε εναλλαγή ισοτύπου μένουν προς το παρόν αναπάντητα και πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Στο άλλο άκρο του φάσματος της G-CLL, το πλήρως αμετάλλακτο και κλινικά επιθετικό υποσύνολο #8 χαρακτηρίζεται από έντονη πολυαντιδραστικότητα²⁰⁶. Είναι πιθανό ότι αυτός ο ιδιαίτερα πολυ/αυτοαντιδραστικός κλώνος δεν υφίσταται SHM επειδή η αμετάλλακτη διαμόρφωση του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με πληθώρα αντιγονικών επιτόπων στο μικροπεριβάλλον, εξασφαλίζοντας έτσι άφθονα σήματα επιβίωσης. Συνολικά, το υποσύνολο #8 μπορεί να θεωρηθεί χαρακτηριστικό παράδειγμα κλώνων CLL όπου η CSR συμβαίνει ανεξάρτητα της SHM. Τι μπορεί να σημαίνει αυτό για την οντογενετική προέλευσή του; Με δεδομένο ότι η CSR θεωρείται διεργασία του βλαστικού κέντρου, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι κλώνοι του υποσυνόλου #8, ή και όλης της G-CLL, προέρχονται από κύτταρα του βλαστικού κέντρου. Ωστόσο, δε μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να προέρχονται από B κύτταρα μνήμης με εναλλαγή ισοτύπου που δημιουργούνται κατά την εξέλιξη άνοσων απαντήσεων εκτός βλαστικού κέντρου^{126,207}.

Τα διαθέσιμα ανοσογενετικά και λειτουργικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο αντιγονικός ερεθισμός εμπλέκεται στην οντογένεση και των δύο υποσυνόλων, #4 και #8, μέσω BcR-εξαρτώμενων ή BcR-ανεξάρτητων μηχανισμών¹²⁵. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις ότι ανεργικά αυτοαντιδραστικά B κύτταρα μπορεί να πραγματοποιήσουν CSR *ex vivo* και να παράξουν αυτοαντισώματα υπό συνθήκες που αναπαράγουν βοήθεια από T κύτταρα ή μέσω διέγερσης υποδοχέων έφυτης ανοσίας (TLRs)²⁰⁸. Σε αυτό το πλαίσιο, επισημαίνεται ότι οι κλώνοι των στερεότυπων υποσυνόλων #4 και #16 (και τα δύο με μεταλλαγμένα γονίδια *IGHV4-34*) επιδεικνύουν διαφορετικές λειτουργικές απαντήσεις στη διέγερση μέσω TLR: οι μεν κλώνοι του υποσυνόλου #4 χαρακτηρίζονται από ανοχή στη διέγερση μέσω TLR7, και οι κλώνοι του υποσυνόλου #16 από έντονη απόκριση στη διέγερση μέσω TLR1/2 και TLR2/6⁸⁷. Επιπλέον, οι κλώνοι του υποσυνόλου #8 χαρακτηρίζονται από έντονη απόκριση σε πληθώρα συνδεδών TLR, σε σαφή αντίθεση με τους κλώνους άλλων στερεότυπων υποσυνόλων που επιδεικνύουν επιλεκτικότητα²⁰⁶. Η συσχέτιση αυτών των βιολογικών χαρακτηριστικών με τη φυσιολογία και την κλινική συμπεριφορά των υποσυνόλων #4 και #8, ιδίως σε ό,τι αφορά την εναλλαγή ισοτύπου, παραμένει αδιευκρίνιστη.

Συμπερασματικά, η G-CLL χαρακτηρίζεται από μια ανοσογενετική υπογραφή που διαφέρει από την κλασική MD-CLL, παραπέμποντας σε υποθέσεις για διακριτή οντογενετική προέλευση ή/και διαφορετικού τύπου άνοσες επιδράσεις. Πολλά ενδιαφέροντα ερωτήματα που αφορούν τη ρύθμιση της SHM στις περιπτώσεις G-CLL παραμένουν αναπάντητα. Περαιτέρω λειτουργικές αναλύσεις των δύο παραδειγματικών αντίθετων πόλων της G-CLL, δηλαδή των υποσυνόλων #4 και #8, μπορεί να μας διαφωτίσουν σχετικά με την επίδραση της SHM στην κλινική συμπεριφορά του κλώνου και, τελικά, την κλινική έκβαση.

Εισαγωγή

Το μικροπεριβάλλον διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσική ιστορία της CLL, όπως προκύπτει από σειρά ενδείξεων: (i) σημαντική επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των κλωνοτυπικών IG^{62,211}, (ii) διάκριση της CLL σε δύο κατηγορίες, ασθενείς με αμετάλλακτες ή οριακά μεταλλαγμένες IG (U-CLL), που παρουσιάζουν δυσμενή πρόγνωση και ασθενείς με σημαντικό φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων στο γονίδιο IGHV των κλωνοτυπικών IG (M-CLL), που εμφανίζουν σημαντικά ηπιότερη κλινική πορεία^{63,64,212}, (iii) ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με ταυτόσημες, στερεότυπες BcR IG, που παραπέμπουν σε κλωνική επιλογή από περιορισμό αριθμό αντιγονικών επιτόπων^{74,76,100,118,213}, και (iv) κλινική αποτελεσματικότητα φαρμάκων που παρεμβαίνουν στη σηματοδοτική οδό CLL^{69,214-216}. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί σε ποια φάση εξέλιξης του κλώνου και για πόσο διάστημα δρουν τα εμπλεκόμενα αντιγόνα. Παράλληλα, είναι αδιευκρίνιστος ο πιθανός ρόλος τους στην επιλογή και ενεργοποίηση των αντιδραστικών T λεμφοκυττάρων, ζήτημα κείμενο, ιδίως υπό το πρίσμα πρόσφατων δεδομένων για τις αλληλεπιδράσεις νεοπλασματικών B λεμφοκυττάρων και T λεμφοκυττάρων και το φαινόμενο της επαγόμενης ανοχής (induced tolerance) στα T λεμφοκύτταρα²¹⁷⁻²²³.

Η CLL προσφέρεται για την εφαρμογή ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων, επειδή αφενός εκφράζει γνωστό ειδικό ογκοαντιγόνο, τον ιδιοτυπικό BcR, αφετέρου εξελίσσεται σχετικά αργά, δίνοντας έτσι το χρονικό περιθώριο για την ανάπτυξη κυτταροτοξικών απαντήσεων εναντίον του νεοπλασματικού κλώνου. Ωστόσο, τα μεν κλωνικά B λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από χαμηλή ανοσογονικότητα, τα δε T λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν διάφορες φαινοτυπικές και λειτουργικές διαταραχές. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί αύξηση του απόλυτου αριθμού τους²²⁴, αναστροφή του λόγου CD4⁺/CD8⁺²²⁵, διαταραχή του προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών και της έκφρασης υποδοχέων χημειοκινών²²⁶, ελαττωμένη έκφραση συνδιεγερτικών μορίων²²⁷, καθώς και ολιγοκλωνικότητα²²⁸⁻²³⁰, χωρίς ωστόσο να έχουν διευκρινιστεί οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί.

Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι τα κλωνικά B κύτταρα της CLL επάγουν μέσω απευθείας επαφής μια σειρά αλλαγών στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης υγιών T λεμφοκυττάρων, που οδηγεί στην αναστολή των Th1 και των κυτταροτοξικών T απαντήσεων²¹⁷. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η άμεση επαφή υγιών T λεμφοκυττάρων με κύτταρα CLL προκαλεί δυσλειτουργία της άνοσης σύναψης μέσω διαταραχής του πολυμερισμού της^{218,220}. Παρόλ' αυτά, βρέθηκε ότι T κύτταρα ασθενών με CLL μπορούν να πολλαπλασιαστούν και κυρίως να εκδηλώσουν ικανές κυτταροτοξικές απαντήσεις εναντίον αλλογενών αλλά όχι αυτόλογων B κυττάρων CLL, γεγονός που συνάδει με την επαγωγή κάποιου είδους περιφερικής ανοχής, ειδικής για τα αυτόλογα νεοπλασματικά κύτταρα και όχι με μια οικουμενική δυσλειτουργία των κυτταροτοξικών T

λεμφοκυττάρων^{220,221}. Μάλιστα, ανοσοτροποποιητικά φάρμακα που δρουν στο επίπεδο της άνοσης σύναψης (όπως η λεναλιδομίδη) μπορούν να αναστρέψουν αυτή την ανοχή και δοκιμάζονται σήμερα σε κλινικές μελέτες με υποσχόμενα αποτελέσματα.²³¹ Συνεπώς, παρουσιάζει ενδιαφέρον να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί με τους οποίους ευνοείται η επαγωγή ανοχής των T κυττάρων αντί ικανής αντινεοπλασματικής κυτταροτοξικής απάντησης. Παράλληλα, δεδομένα από ζωικά μοντέλα υποστηρίζουν ότι τα T λεμφοκύτταρα μπορεί να παρέχουν τροφικά σήματα για τον πολλαπλασιασμό των κλωνικών B λεμφοκυττάρων T cells²¹⁹.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο αντιγόνων στη διαμόρφωση του ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων στη CLL. Αρχικά, αναλύσαμε με τεχνικές κλασικής υποκλωνοποίησης ακολουθούμενης από αλληλούχηση κατά Sanger μια μεγάλη σειρά ασθενών, εστιάζοντας σε ασθενείς που κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα με το σκεπτικό ότι η στερεοτυπία του BcR αποτελεί την πιο σαφή ένδειξη αντιγονικής επιλογής²¹⁰. Διαπιστώσαμε επιλεκτικότητα του T ρεπερτορίου και ολιγοκλωνικότητα, που παραπέμπουν πράγματι σε επιλογή από αντιγόνο(-α). Ωστόσο, λόγω των εγγενών αδυναμιών της ανάλυσης χαμηλής κλίμακας, δε μπορέσαμε να εξάγουμε οριστικά συμπεράσματα.

Επεκτείνουμε τη μελέτη αξιοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης μαζικής κλίμακας (next-generation sequencing, NGS) προκειμένου να αναλύσουμε σε βάθος το ρεπερτόριο των T λεμφοκυττάρων στη CLL. Συμπεριλάβαμε στη μελέτη και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα, ώστε να μη διαφύγουν ανοσογενετικά χαρακτηριστικά που ίσως είναι κοινά για όλη τη CLL. Διαπιστώσαμε σημαντική ολιγοκλωνικότητα του ρεπερτορίου, κυρίως εκπορευόμενη από τον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, με επικρατείς κλωνοτύπους που παραμένουν και εκπτύσσονται περαιτέρω στο χρόνο, και κοινούς κλωνοτύπους μεταξύ διαφορετικών ασθενών, ιδίως μάλιστα ασθενών που ανήκουν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο, και οι οποίοι φαίνεται να είναι ειδικοί για τη CLL. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν επιλογή των T λεμφοκυττάρων από αντιγονικούς επιτόπους που μπορεί να είναι ειδικοί για κάθε στερεότυπο υποσύνολο. Μένει να διευκρινιστεί αν πρόκειται για τα ίδια αντιγονικά στοιχεία που εμπλέκονται στην οντογένεση του κακοήθους B κλώνου, ή/και αν αποτελούν νεοαντιγόνα.

Υλικά και μέθοδοι

Ομάδα ασθενών

Αναλύθηκαν 73 δείγματα αίματος από 58 ασθενείς με CLL που δεν είχαν λάβει θεραπεία (ηλικίας 45-85 ετών, Δμ 68 έτη), και 2 δείγματα από υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας (70 και 80 ετών, αντίστοιχα). Πενήντα-δύο από τους 58 ασθενείς επιλέχθηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής BcR IG ώστε να κατατάσσονται σε μείζονα, καλά χαρακτηρισμένα στερεότυπα υποσύνολα⁷⁴. Συγκεκριμένα, η ομάδα μελέτης συμπεριέλαβε ασθενείς των υποσυνόλων #4 (n=20), #1 (n=16) και #2 (n=16), καθώς και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο (n=6). Πέντε ασθενείς του υποσυνόλου #4 αναλύθηκαν διαχρονικά [συνολικά 19 δείγματα, με διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 28 μήνες (18-42), κατά τη διάρκεια των οποίων κανείς δεν έλαβε θεραπεία]. Για έναν ασθενή του υποσυνόλου #1 μελετήθηκαν παράλληλα δείγμα περιφερικού αίματος και λεμφαδένα από το ίδιο χρονικό στιγμιότυπο. Κανείς ασθενής δεν είχε συμπτώματα ή σημεία λοίμωξης κατά τη δειγματοληψία. Η μελέτη εγκρίθηκε από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής κάθε κέντρου.

Ενίσχυση των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ με PCR

Η ενίσχυση των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ πραγματοποιήθηκε σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) από μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) ή, σε μία περίπτωση, φρέσκο λεμφαδενικό ιστό. Η ανάστροφη μεταγραφή του RNA έγινε χρησιμοποιώντας το SuperScript II RT kit (Invitrogen Life technologies, USA), και ακολούθησε multiplex PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED-2²³². Τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό (DNA purification columns, QIAGEN, Hilden, Germany), εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pCR2.1 (Invitrogen Life technologies, USA) και κλωνοποιήθηκαν σε βακτήρια E.Coli/TOP10F' (Invitrogen Life technologies, USA). Ακολούθησε τυχαία επιλογή αποικιών και αλληλούχηση χρησιμοποιώντας τον οικουμενικό εκκινητή -20 ή εκκινητές M13.

Ανάλυση και ερμηνεία αλληλουχιών, ορισμοί

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν υποβλήθηκαν στο εργαλείο IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>)¹⁵⁷. Αξιολογήθηκαν μόνο οι παραγωγικές αναδιατάξεις.

Ως μοναδικός κλωνοτύπος θεωρήθηκε το σύνολο των αναδιατάξεων με ίδιο γονίδιο TRBV και πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία TRB CDR3. Ως εκπτυγμένοι θεωρήθηκαν οι κλωνοτύποι που αντιστοιχούσαν σε ≥ 2 αλληλουχίες (expanded clonotypes), και ο πιο εκπτυγμένος κλωνοτύπος κάθε δείγματος αναφέρεται ως επικρατής (dominant clonotype). Οι κλωνοτύποι που αντιστοιχούσαν σε μια μόνο αναδιάταξη αναφέρονται ως μονήρεις (single clonotypes, singletons). Η σχετική συχνότητα κάθε κλωνοτύπου/δείγμα υπολογίστηκε ως το σύνολο των αναδιατάξεων που αντιστοιχούν στον κάθε κλωνοτύπο

δια του συνολικού αριθμού των υποκλωνοποιημένων παραγωγικών αναδιατάξεων του συγκεκριμένου δείγματος. Ανάλυση κλωνικότητας έγινε μόνο για τα δείγματα με >10 παραγωγικές αναδιατάξεις. Για τις αναλύσεις του ρεπερτορίου των γονιδίων της β αλυσίδας του T-κυτταρικού υποδοχέα (TRB) αξιολογήθηκαν οι κλωνοτύποι αντί των αναδιατάξεων για να αποφύγουμε πιθανές στρεβλώσεις λόγω έκπτυξης μετά από αντιγονικό ερεθισμό.

Όλες οι αλληλουχίες TRB των ασθενών με CLL στοιχήθηκαν και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες των υγιών μαρτύρων, καθώς και με 5717 μοναδικές, καλά χαρακτηρισμένες, παραγωγικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ από ποικίλες κλινικές οντότητες (από φυσιολογικούς, αυτοαντιδραστικούς και κακοήθεις T-κυτταρικούς κλώνους), οι οποίες ήταν διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (n=1715) ή ανασύρθηκαν από τη δημόσια βάση αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB (<http://www.imgt.org/IMGTindex>) (n=4002).

Τυποποίηση HLA

Πραγματοποιήθηκε τυποποίηση χαμηλής ανάλυσης (σε επίπεδο αντιγόνου) των γενετικών τόπων HLA-A, -B, -C και υψηλής ανάλυσης (σε επίπεδο αλληλομόρφου) του γενετικού τύπου HLA-DRB1 για τους δύο υγείς μάρτυρες και 8 ασθενείς με CLL. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα 4 ζεύγη ασθενών που βρέθηκαν να φέρουν κοινούς κλωνοτύπους, όπως περιγράφεται παρακάτω στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Η τυποποίηση έγινε με ανάστροφη PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probe) χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμο kit (LABtype® RSSO, One Lambda, Canoga Park, CA).

Στατιστική ανάλυση και εργαλεία οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων

Τα περιγραφικά στατιστικά δεδομένα διακριτών παραμέτρων αφορούν απόλυτους αριθμούς και κατανομές συχνότητας. Για ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν μέσοι όροι, διάμεσες τιμές, ανώτατα και κατώτατα όρια. Η σημαντικότητα των δι/πολυπαραγοντικών σχέσεων μεταξύ μεταβλητών εκτιμήθηκε με τεστ χ^2 . Ως όριο σημαντικότητας για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το $p=0.05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Τα γραφήματα Circos δημιουργήθηκαν με χρήση ελεύθερα διαθέσιμου λογισμικού (<http://circos.ca>)²³³.

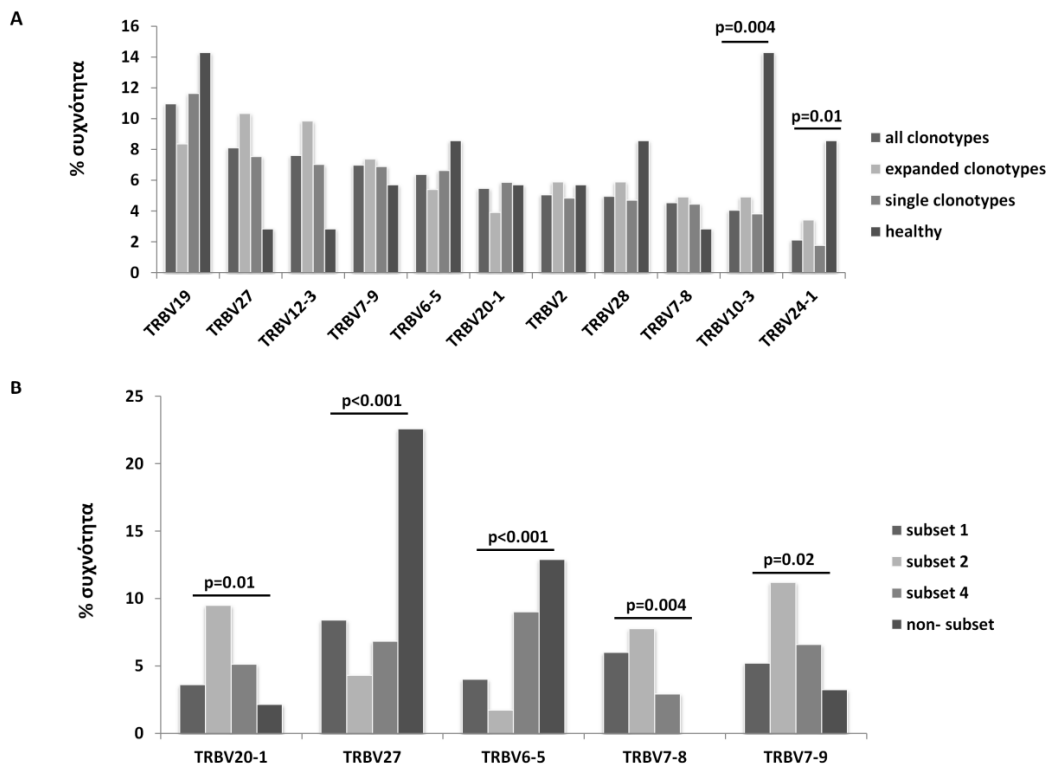
Αποτελέσματα

Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRB παρουσιάζει επιλεκτικότητα

Συνολικά αναλύθηκαν 1378 παραγωγικές CLL αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ, που αντιστοιχούσαν σε 985 μοναδικούς κλωνοτύπους. Αναγνωρίστηκαν 39 λειτουργικά γονίδια TRBV, με συχνότερο το γονίδιο TRBV19, που συνεισέφερε σε 108 κλωνοτύπους (11.0%), και ακολούθως τα γονίδια TRBV27 (8.1%), TRBV12-3 (7.6%), TRBV7-9 (7.0%), TRBV6-5 (6.4%) και TRBV20-1 (5.1%). Συνεπώς, 6 μόλις γονίδια 6 TRBV εκπροσωπούσαν περίπου το ήμισυ των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων, υποδεικνύοντας σημαντική επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου. Η ανάλυση των υγιών μαρτύρων ανέδειξε διαφορετικό

πρότυπο χρήσης των γονιδίων TRBV, με σαφή υπερεκπροσώπηση των γονιδίων TRBV10-3 και TRBV24-1 ($p=0.004$ and $p=0.01$, αντίστοιχα), και υποεκπροσώπηση των γονιδίων TRBV27 και TRBV12-3 (παρότι οι τιμές p δεν άγγιξαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, πιθανόν λόγω του συνολικά μικρού αριθμού αλληλουχιών των υγιών μαρτύρων) (Εικόνα 20A). Αναλυτικές πληροφορίες για τις συχνότητες γονιδίων TRBV και TRBJ παρατίθενται στους **Συμπληρωματικούς Πίνακες 6-7**.

Όταν συγκρίθηκαν οι συχνότητες των γονιδίων TRBV μεταξύ των τεσσάρων υπομάδων της μελέτης (δηλαδή υποσύνολο #1, #2, #4 και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε στερεότυπο υποσύνολο), διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορές. Συγκεκριμένα: (i) οι κλωνοτυπικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ των ασθενών με ετερογενείς, μη-στερεότυπες BcR IG χρησιμοποιούσαν σημαντικά συχνότερα τα γονίδια TRBV27 και TRBV6-5, ενώ τα γονίδια TRBV7-8, TRBV20-1 και TRBV7-9 υποεκπροσωπούσαν, και (ii) οι κλωνοτυπικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ των ασθενών του υποσυνόλου #2 χρησιμοποιούσαν σημαντικά συχνότερα τα γονίδια TRBV20-1, TRBV7-9 και TRBV7-8 (Εικόνα 20B). Αναλυτικές πληροφορίες για τις συχνότητες γονιδίων TRBV ανά υποομάδα μελέτης παρατίθενται στο **Συμπληρωματικό Πίνακα 8**.



Εικόνα 20. Ρεπερτόριο γονιδίων TRBV. (A) Ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV στο σύνολο των ασθενών με CLL και σύγκριση των συχνοτήτων μεταξύ των εκπτυγμένων κλωνοτύπων και του πολυκλωνικού υπόβαθρου (δηλαδή των μονήρων κλωνοτύπων). Η τέταρτη στήλη αντιστοιχεί στους δύο υγιείς μάρτυρες. Εικονίζονται τα 10 συχνότερα γονίδια TRBV στη CLL συν το γονίδιο TRBV24-1, που προστέθηκε για λόγους σύγκρισης του ρεπερτορίου στη CLL έναντι των υγιών μαρτύρων. Οι τιμές p αναφέρονται στη σύγκριση της CLL με τους υγιείς μάρτυρες. (B) Σύγκριση του ρεπερτορίου γονιδίων TRBV μεταξύ των 4 υποομάδων που αναλύθηκαν (υποσύνολα #1, #2, #4 και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε στερεότυπο υποσύνολο).

Συνολικά, αναλύθηκαν 73 δείγματα από 58 ασθενείς με CLL. Στη μεγάλη πλειονότητά τους, οι ασθενείς παρουσίαζαν ολιγοκλωνικότητα των T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, εξαιρώντας τα δείγματα με ≤ 10 αλληλουχημένες παραγωγικές αναδιατάξεις, 52 από τα εναπομείναντα 57 δείγματα (91%), που αντιστοιχούσαν σε 40/45 ασθενείς (89%), βρέθηκαν να περιέχουν ομάδες πανομοιότυπων αναδιατάξεων (≥ 2), δηλαδή εκπτυγμένους κλωνοτύπους. Όσον αφορά τους υπόλοιπους 5 ασθενείς, η αδυναμία ανίχνευσης εκπτυγμένων κλωνοτύπων πιθανόν αποδίδεται στο σημαντικά μικρότερο αριθμό των αντίστοιχων υποκλωνοποιημένων παραγωγικών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ ($p=0.02$).

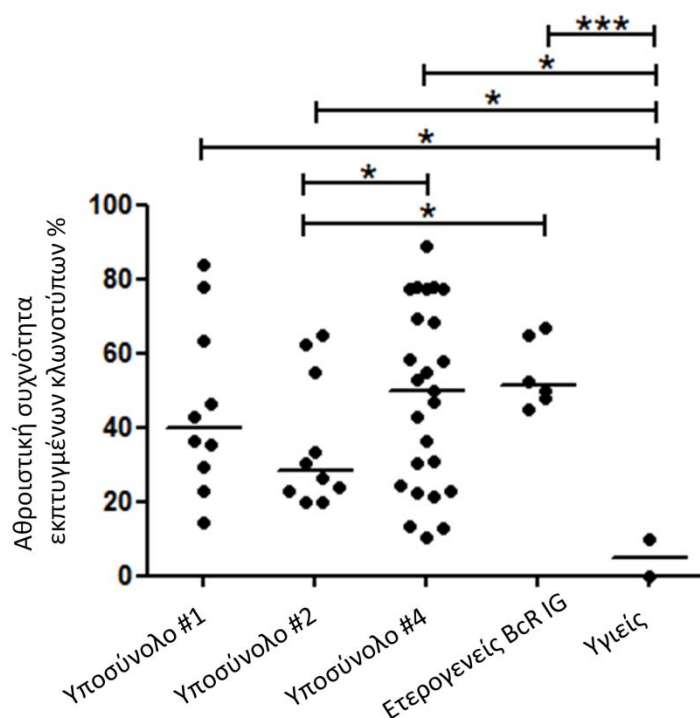
Στα 52 δείγματα ασθενών με CLL που βρέθηκε να περιέχουν εκπτυγμένους T κλωνοτύπους, ο αριθμός των εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα κυμαινόταν από 1-11 ($\Delta\mu=3$), ενώ η σχετική συχνότητα κάθε κλωνοτύπου/δείγμα κυμαινόταν από 2.7-70.4% ($\Delta\mu=10\%$). Η σχετική συχνότητα του επικρατέστερου κλωνοτύπου/δείγμα κυμαινόταν από 4.9-70.4% ($\Delta\mu=16.2\%$) και η αθροιστική συχνότητα όλων των εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα από 10.5-88.9% ($\Delta\mu=44.8\%$). Οι αντίστοιχες τιμές για το σύνολο των 57 δειγμάτων CLL παρατίθενται στον **Πίνακα 4**. Στην περίπτωση που αναλύθηκε σύγχρονο δείγμα περιφερικού αίματος και λεμφαδένα, μόνο το δεύτερο βρέθηκε να περιέχει εκπτυγμένους κλωνοτύπους (αθροιστική συχνότητα εκπτυγμένων κλωνοτύπων 42.0%). Κατ' αντιστοιχία, δε μπορούμε να αποκλείσουμε ότι οι 5 ασθενείς στον οποίων τα αίμα δε διαπιστώθηκε ολιγοκλωνικότητα μπορεί να φέρουν T κλωνικές εκπτώξεις σε άλλο ιστικό διαμέρισμα.

Στη συνέχεια, αναλύσαμε την κλωνικότητα ξεχωριστά για κάθε υποομάδα ασθενών. Το υποσύνολο #2 βρέθηκε σημαντικά λιγότερο ολιγοκλωνικό από το υποσύνολο #4, καθώς και από τους ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο (διάμεση αθροιστική συχνότητα εκπτυγμένων κλωνοτύπων 23.8% έναντι 48.3%, $p=0.03$ και 51.1%, $p=0.01$, αντίστοιχα) (**Πίνακας 4, Εικόνες 21-22**).

	Ασθενείς	Δείγματα	Αλληλουχίες/δείγμα [Δμ (εύρος)]	Εκπτυγμένοι κλωνοτύποι [Δμ (εύρος)]	Σχετική συχνότητα επικρατούς κλωνοτύπου (%)
Υποσύνολο #1	12	12	23 (14-41)	4 (0-11)	13.3 (0-21.4)
Υποσύνολο #2	13	13	20 (12-36)	2 (0-3)	13.6 (0-50)
Υποσύνολο #4	17	26	21 (11-36)	3 (0-8)	18.2 (0-70.4)
Ετερογενείς BcR IG	6	6	23 (14-30)	5 (3-7)	16.7 (13-30)
Σύνολο	48	57	22 (11-41)	3 (0-11)	14.8 (0-70.4)

Πίνακας 4. Ανάλυση κλωνικότητας για το σύνολο των δειγμάτων

Αντίθετα, τα δείγματα των υγιών μαρτύρων δεν παρουσίαζαν ολιγοκλωνικότητα. Συνολικά, από τους 35 κλωνοτύπους που ταυτοποιήθηκαν, οι 34 ήταν μονήρεις και μόλις ένας κλωνοτύπος ανιχνεύθηκε 2 φορές (διάμεση αθροιστική συχνότητα 5.0%) (**Εικόνα 21**).



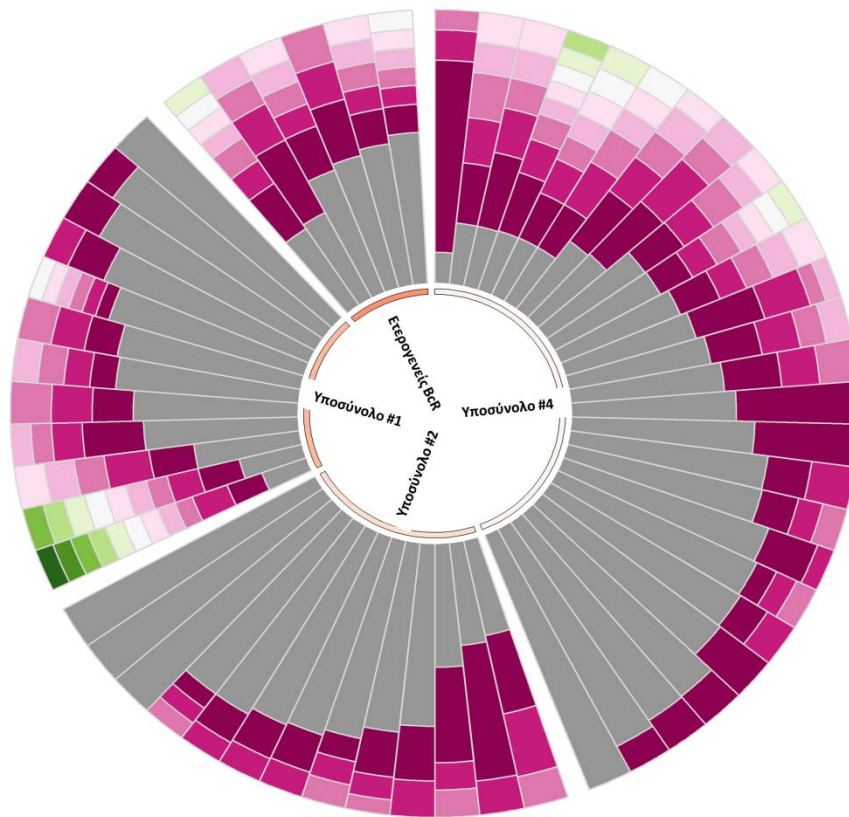
Εικόνα 21. Ποσοστιαία αθροιστική συχνότητα των εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα χωριστά για κάθε υποομάδα ασθενών με CLL, δηλαδή ασθενείς που κατατάσσονται στα υποσύνολα #1, #2, #4 και ασθενείς με ετερογενείς κλωνοτυπικές BcR IG, και για τους υγιείς μάρτυρες. Κάθε κύκλος αντιστοιχεί σ' ένα δείγμα με >10 υποκλωνοποιημένες παραγωγικές αναδιατάξεις και οι οριζόντιες γραμμές σημαίνουν τη διάμεση τιμή για κάθε υποομάδα. Το T ρεπερτόριο των ασθενών του υποσυνόλου #2 ήταν σημαντικά λιγότερο ολιγοκλωνικό σε σύγκριση με το υποσύνολο #4 και τους ασθενείς με ετερογενείς BcR IG. Οι υγιείς μάρτυρες είχαν ουσιαστικά πολυκλωνικό ρεπερτόριο.

Οι διαφορές των διάμεσων τιμών με στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$ και $p < 0.01$ επισημαίνονται με [*] και [***], αντιστοίχως.

Το T ρεπερτόριο παρουσιάζει διακυμάνσεις, ωστόσο υποκλώνοι παραμένουν στο χρόνο

Για να εκτιμήσουμε τη δυναμική των T κλώνων διαχρονικά, αναλύσαμε δείγματα ασθενών από διαδοχικά χρονικά στιγμιότυπα. Η διαχρονική ανάλυση αφορούσε 5 ασθενείς του υποσυνόλου #4 (2-6 δείγματα/ασθενή, $\Delta\mu=3$), και το διάστημα μεταξύ των δειγματοληψιών κυμαινόταν από 18-42 μήνες ($\Delta\mu=28$ μήνες). Με την εξαίρεση ενός ασθενούς όπου το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV παρέμενε σχετικά σταθερό στο χρόνο, οι υπόλοιποι 4 παρουσίαζαν διακυμάνσεις των συχνοτήτων των γονιδίων TRBV ανά χρονικό στιγμιότυπο (Εικόνα 32A). Ωστόσο, σε 4/5 περιπτώσεις (80%), τουλάχιστον ένας κλωνοτύπος παρέμενε σε τουλάχιστον δύο χρονικά στιγμιότυπα (Εικόνα 32B). Παρόλ' αυτά, ο επικρατέστερος κλωνοτύπος ήταν διαφορετικός σε κάθε στιγμιότυπο.

Στην περίπτωση όπου μελετήθηκαν σύγχρονα δείγματα αίματος και λεμφαδένα, το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV διέφερε στους δύο ιστούς.



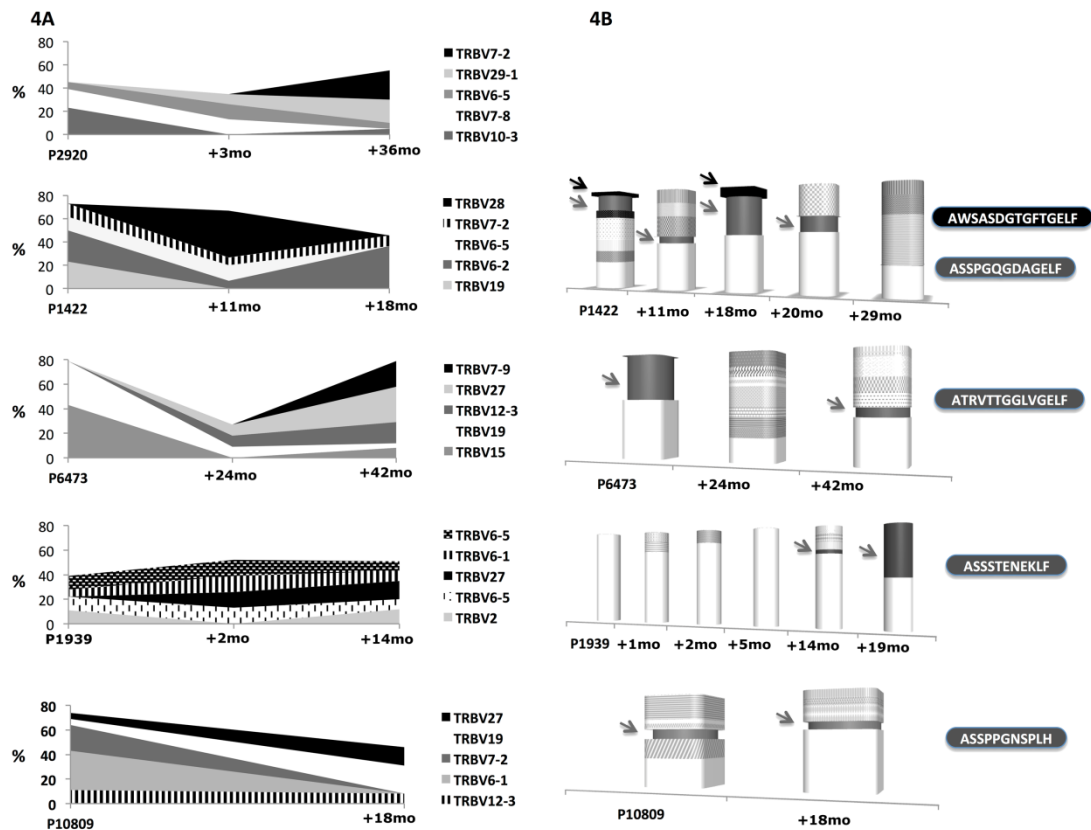
Εικόνα 22. Ανάλυση κλωνικότητας των Τ λεμφοκυττάρων για κάθε υποομάδα ασθενών με CLL (υποσύνολα #1, #2, #4 και ασθενείς με ετερογενείς BcR IG). Κάθε λωρίδα αντιστοιχεί σ' ένα δείγμα με ≥ 10 υποκλωνοποιημένες παραγωγικές αναδιατάξεις και κάθε τουβλάκι αποδίδει το σχετικό μέγεθος των διαφορετικών εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα. Το εσωτερικό τουβλάκι (γκρι) αντιστοιχεί στο πολυκλωνικό background, δηλαδή την αθροιστική συχνότητα των μονήρων κλωνοτύπων/δείγμα. Το υποσύνολο #2 χαρακτηρίζεται από μικρότερο βαθμό κλωνικότητας, τόσο ως προς το σχετικό μέγεθος του πολυκλωνικού background, όσο και ως προς τον αριθμό των εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα.

Κοινοί κλωνοτύποι μεταξύ ασθενών

Η ανάλυση ομαδοποίησης των αμινοξικών αλληλουχιών TRB CDR₃ όλων των ασθενών με CLL αποκάλυψε 4 διακριτές αμινοξικές αλληλουχίες TRB CDR₃ που ήταν κοινές ανά ζεύγη ασθενών. Σε 2/4 ζεύγη ασθενών, το γονίδιο TRBV ήταν επίσης το ίδιο, συνεπώς επρόκειτο για κοινό ("στερεότυπο") κλωνοτύπο. Και τα δύο αυτά ζεύγη αφορούσαν αποκλειστικά ασθενείς του υποσυνόλου #4. Στα άλλα 2 ζεύγη ασθενών το γονίδιο TRBV των κοινών TRB CDR₃ ήταν διαφορετικό. Το ένα από αυτά τα 2 ζεύγη αφορούσε έναν ασθενή του υποσυνόλου #1 κι έναν ασθενή του υποσυνόλου #4, ενώ το άλλο ζεύγος αφορούσε έναν ασθενή του υποσυνόλου #2 κι έναν ασθενή που δεν κατατασσόταν σε στερεότυπο υποσύνολο (Πίνακας 5).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι Τ-κυτταρικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν το αντιγόνο στα πλαίσια πρωτεϊνών του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας, προχωρήσαμε σε τυποποίηση των αντίστοιχων γενετικών τόπων (HLA) στοχευμένα στους 8 ασθενείς των προαναφερθέντων ζευγών. Πράγματι, οι ασθενείς κάθε ζεύγους είχαν τουλάχιστον ένα κοινό αντιγόνο HLA (Συμπληρωματικός Πίνακας 9). Το εμπλεκόμενο αντιγόνο HLA για

2/4 ζεύγη ασθενών εκφραζόταν και από τους υγιείς μάρτυρες, ωστόσο οι κοινοί κλωνοτύποι δε βρέθηκαν στους τελευταίους (Συμπληρωματικός Πίνακας 9).



Εικόνα 23. Ρεπερτόριο γονιδίων TRBV και δυναμική των T-κλώνων στο χρόνο. (Α) Διαχρονική διακύμανση των συχνοτήτων των γονιδίων TRBV στους 5 ασθενείς του υποσυνόλου #4 για τους οποίους αναλύθηκαν διαδοχικά χρονικά στιγμιότυπα. Εικονίζονται μόνο τα 5 συχνότερα γονίδια και τα στιγμιότυπα για τα οποία υπήρχαν ≥ 10 υποκλωνοποιημένες παραγωγικές αναδιατάξεις. Με συμπαγή χρώματα αποδίδονται τα γονίδια TRBV με συχνότητα που μεταβάλλεται $\geq 10\%$ στο χρόνο, ενώ με χρωματικά μοτίβα αποδίδονται τα γονίδια TRBV των οποίων η συχνότητα παραμένει σχετικά σταθερή (διακύμανση $< 10\%$). (Β) Δυναμική των T-κλώνων. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε διακριτό χρονικό στιγμιότυπο και κάθε τουβλάκι σ' έναν συγκεκριμένο κλωνοτύπο. Τα κατωφερέστερα τουβλάκια (με λευκό χρώμα) αντιστοιχούν στο πολυκλωνικό background κάθε στιγμιότυπου. Παρά τη διακύμανση του ρεπερτορίου TRB, ορισμένοι κλωνοτύποι (που σημαίνονται με βέλη) παραμένουν στο χρόνο.

Κοινοί κλωνοτύποι μεταξύ διαφορετικών κλινικών οντοτήτων

Στη συνέχεια, συγκρίναμε όλες τις παραγωγικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ των ασθενών της μελέτης ($n=1378$) με τις αναδιατάξεις των δύο υγιών μαρτύρων ($n=36$), αλλά και μια σειρά 5717 μοναδικών, παραγωγικών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ από διάφορες κλινικές οντότητες. Μόνο μια αλληλουχία TRB CDR3 βρέθηκε να ταιριάζει με άλλη μία κατατεθειμένη στη δημόσια βάση. Η συγκεκριμένη αλληλουχία συμμετείχε σ' ένα από τα 4 ζεύγη ασθενών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Πρόκειται για μια κοινή αλληλουχία TRB CDR3 μεταξύ δύο ασθενών με CLL (P1812 και Swe-1025) της ομάδας μελέτης (στον ασθενή P1812 η αναδιάταξη χρησιμοποιούσε το γονίδιο TRBV10-3, ενώ στον ασθενή Swe-1025 το γονίδιο TRBV19) και μια μοναδική καταχώρηση στη δημόσια

βάση αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB (Accession number AM041155), όπου χρησιμοποιούνταν το γονίδιο TRBV19. Η καταχωρημένη αλληλουχία αφορούσε σε έναν CD8⁺ T-κυτταρικό κλώνο που αναγνωρίζει έναν ιδιαίτερα ανοσογόνο επίτοπο του ιού Epstein-Barr (EBV) (TRB CDR₃ : EPLPQGQLTAY). Αυτός ο κλώνος αναγνωρίζει τον επίτοπο στο πλαίσιο της πρωτεΐνης HLA-B*35:01²³⁴, και πράγματι, οι δύο ασθενείς με CLL που έφεραν αυτόν τον κλωνοτύπο εξέφραζαν το αντιγόνο HLA-B*35.

Όταν εφαρμόστηκαν λιγότερο αυστηρά κριτήρια (>85% αμινοξική ταυτότητα), διαπιστώθηκαν κάποιες αλληλουχίες TRB CDR₃ της δημόσιας βάσης παρόμοιες με ασθενών της μελέτης, όπως φαίνεται στο Συμπληρωματικό Πίνακα 10.

Κωδικός ασθενούς	Ανοσογενετική ομάδα	TRBV	TRBD	TRBJ	Κοινή αμινοξική αλληλουχία CDR ₃
P1626	#4	TRBV15	TRBD1	TRBJ2-2	ATRVTTGGLVGFELF
P1939	#4				
P1422	#4	TRBV30	TRBD1	TRBJ2-2	AWSASDGTGFTGELFF
P2920	#4				
Swe-1065	#1	TRBV7-2	TRBD2	TRBJ1-5	ASSLGTNQPQH
P3870	#4	TRBV7-9	TRBD1		
P1812	Ετερογενής BcR IG	TRBV10-3	TRBD1	TRBJ1-5	ASSTGDSNQPQH
Swe-1025	#2	TRBV19			

Πίνακας 5. Ζεύγη ασθενών που φέρουν κλωνοτύπους με πανομοιότυπες αμινοξικές αλληλουχίες TRB CDR₃.

Συζήτηση

Αναλύσαμε το ρεπερτόριο των T-κυτταρικών υποδοχέων στη μεγαλύτερη σειρά ασθενών με CLL που μελετήθηκε ως σήμερα γι' αυτό το σκοπό. Εστίασαμε σε ασθενείς που κατατάσσονται σε μείζονα, καλά χαρακτηρισμένα στερεότυπα υποσύνολα της νόσου, και συγκεκριμένα το υποσύνολο #1 (το πολυπληθέστερο για την U-CLL, χαρακτηρίζεται από κλινική επιθετικότητα), το υποσύνολο #2 (το πολυπληθέστερο για όλη τη CLL, περιέχει M-CLL και U-CLL, χαρακτηρίζεται από δυσμενή πρόγνωση) και το υποσύνολο #4 (το πολυπληθέστερο για τη M-CLL, εξαιρετικά ευνοϊκής πρόγνωσης)^{74,76,235}. Ωστόσο, συμπεριλάβαμε και ασθενείς με CLL που δεν κατατάσσονται σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο, ώστε να μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε τυχόν ανοσογενετικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά για όλη τη CLL, ανεξαρτήτως των μοριακών χαρακτηριστικών της κλωνοτυπικής BcR IG. Η ομάδα ασθενών ηθελημμένα παρουσίαζε υπερεκπροσώπηση του υποσυνόλου #4, επειδή για το συγκεκριμένο υποσύνολο υπάρχουν άφθονες ενδείξεις συνεχιζόμενης αλληλεπίδρασης με αντιγόνο^{113-115,236}. Για τον ίδιο λόγο, η διαχρονική ανάλυση δειγμάτων εστιάστηκε επίσης σε αυτό το υποσύνολο. Οι κλωνοτύποι θεωρήθηκαν εκπτυγμένοι όταν αντιστοιχούσαν σε ≥ 2 αλληλουχίες και παρότι αυτός ο ορισμός είναι εν μέρει αυθαίρετος δικαιολογείται στα πλαίσια μιας τεχνικής χαμηλής κλίμακας, όπως η κλασική υποκλωνοποίηση.

Τα ευρήματα της μελέτης αποτελούν σαφείς ενδείξεις επιλεκτικότητας του ρεπερτορίου TRB και ολιγοκλωνικότητας στη μεγάλη πλειονότητα των ασθενών που αναλύθηκαν, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες ωστόσο βασίστηκαν αποκλειστικά σε τεχνικές κυτταρομετρίας ροής και spectratyping, ενώ η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μοριακή τεκμηρίωση του φαινομένου²²⁸⁻²³⁰. Μια σημαντική διαπίστωση της

μελέτης αφορούσε στην ανεύρεση ολιγοκλωνικότητας πρακτικά σε όλη την CLL, ανεξαρτήτως μοριακών χαρακτηριστικών της BcR IG. Οι διαφορές στη συχνότητα των γονιδίων TRBV μεταξύ CLL και υγιών μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας υποδεικνύει πως αυτή η επιλεκτικότητα του T ρεπερτορίου είναι ειδική για τη CLL και όχι αποτέλεσμα περιορισμού του ρεπερτορίου στα πλαίσια της γήρανσης. Μολονότι ο μικρός αριθμός των υγιών μαρτύρων που αναλύθηκαν δεν επιτρέπει την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων, η πολυκλωνικότητα του αντίστοιχου ρεπερτορίου (τουλάχιστον με μεθόδους ανάλυσης χαμηλού βάθους) έρχεται σε σαφή αντίθεση με την ολιγοκλωνικότητα που χαρακτηρίζει τα δείγματα της CLL και επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για φαινόμενο που σχετίζεται με την ίδια τη νόσο.

Παρόλ' αυτά, η ανάλυση του ρεπερτορίου TRB ξεχωριστά για κάθε υποομάδα ασθενών με CLL, δηλαδή για τα υποσύνολα #1, #2, #4 και τους ασθενείς με ετερογενείς BcR IG, ανέδειξε διαφορές, τόσο ως προς τη συχνότητα των γονιδίων TRBV όσο και ως προς την έκταση της ολιγοκλωνικότητας, ένδειξη ότι τα T λεμφοκύτταρα μπορεί να επιλέγονται από διαφορετικά αντιγόνα κατά περίπτωση. Εξάλλου, αυτή η υπόθεση έρχεται σε συμφωνία με πληθώρα δημοσιευμένων μελετών που υποστηρίζουν ότι ο νεοπλασματικός B κλώνος επιλέγεται και εκπτύσσεται υπό την επίδραση διαφορετικών αντιγονικών ερεθισμάτων για κάθε στερεότυπο υποσύνολο^{74,76,77,100,113,114,118,162,213,237}.

Από την άλλη πλευρά, αν η επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου TRB οφειλόταν στην επίδραση συγκεκριμένων αντιγόνων, θα περιμέναμε να παραμένει σταθερή στο χρόνο. Αντ' αυτού, με μια μόνο εξαίρεση, όλες οι περιπτώσεις που αναλύθηκαν διαχρονικά παρουσίαζαν διακύμανση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV, μολονότι κάποιοι κλωνοτύποι παρέμεναν στο χρόνο.

Η ανάλυση κατά υποομάδες έδειξε ότι το υποσύνολο #2 χαρακτηρίζεται από μικρότερο βαθμό ολιγοκλωνικότητας. Η υποκείμενη αιτία δεν είναι σαφής, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο υποσύνολο χαρακτηρίζεται από επιθετική κλινική πορεία, ακόμη και αν φέρει μεταλλαγμένες BcR IG, καθώς και από ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *SF3B1*, που θα μπορούσε ίσως να καθιστούν τα κλωνικά κύτταρα λιγότερο εξαρτώμενα από το μικροπεριβάλλον, με κάποιον άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό^{105,106,162,163}. Οποσδήποτε, τυχόν συσχέτιση της ολιγοκλωνικότητας των T κυττάρων με την κλινική πορεία και έκβαση θα πρέπει να διευρευνηθεί σε μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες.

Ένα αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η διαπίστωση κοινών κλωνοτύπων μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Σύμφωνα με εκτιμήσεις της φυσιολογικής ετερογένειας του T ρεπερτορίου, η πιθανότητα αυτό να συμβαίνει κατά τύχη είναι πρακτικά αμελητέα^{238,239}. Εξάλλου, η πιθανότητα να προκύπτει από επιμόλυνση ενός δείγματος από άλλο επίσης αποκλείστηκε, καθότι οι κοινοί κλωνοτύποι διαπιστώθηκαν σε δείγματα που κλωνοποιήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους. Συνεπώς, οι κοινοί κλωνοτύποι μεταξύ ασθενών πρέπει να επιλέγονται από κοινά αντιγονικά στοιχεία. Άραγε πρόκειται για τα ίδια αντιγόνα που επιλέγουν και το B κλώνο;

Αν ίσχυε αυτή η υπόθεση, τότε θα περιμέναμε ότι κοινοί κλωνοτύποι θα βρίσκονταν μόνο μεταξύ ασθενών του ίδιου στερεότυπου υποσυνόλου (εφόσον εξέφραζαν και το κατάλληλο αλληλόμορφο HLA). Πράγματι, κοινοί κλωνοτύποι διαπιστώθηκαν μόνο μεταξύ ασθενών του υποσυνόλου #4 που είχαν τουλάχιστον ένα κοινό αντιγόνο HLA. Ωστόσο, υιοθετώντας ένα λιγότερο αυστηρό ορισμό "κλωνοτύπου", π.χ. λαμβάνοντας

υπόψη μόνο την αμινοξική αλληλουχία της TRB CDR₃ ανεξαρτήτως γονιδίου TRBV, βρέθηκαν κοινές αλληλουχίες και μεταξύ ασθενών διαφορετικών υποομάδων. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι ο κοινός αντιγονικός ερεθισμός αφορά νεοαντιγόνα, δηλαδή επιτόπους που εκφράζονται από τα ίδια τα νεοπλασματικά Β κύτταρα. Βεβαίως, δε μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο οι κοινοί κλωνοτύποι να προκύπτουν από κοινές, εμμένουσες υποκλινικές λοιμώξεις.

Επιδιώκοντας να διευκρινίσουμε τη φύση των αντιγονικών στοιχείων που εμπλέκονται στην επιλογή των Τ λεμφοκυττάρων στη CLL, πραγματοποιήσαμε εκτεταμένες συγκρίσεις με ποικίλες άλλες οντότητες. Είναι αξιοσημείωτο ότι, συγκρίνοντας τις αλληλουχίες CLL της μελέτης με μια σειρά 5717 παραγωγικών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ, μόνο μια βρέθηκε κοινή. Επρόκειτο για μια αλληλουχία TRB CDR₃ που διαπιστώθηκε σε δύο ασθενείς της μελέτης και αντιστοιχούσε σ' έναν CD8⁺ Τ-κυτταρικό κλώνο που αναγνωρίζει έναν ανοσογονικό επίτοπο του αντιγόνου BZLF1 του ιού EBV²³⁴. Ο συγκεκριμένος κλώνος ανήκει σ' ένα "δημόσιο" Τ ρεπερτόριο, δηλαδή ένα ρεπερτόριο περιορισμένων αντιγονικών ειδικοτήτων στα πλαίσια έκφρασης ειδικών αντιγόνων HLA που αναπτύσσεται σε απάντηση ογκωδών ιικών πεπτιδίων σε άτομα που εκφράζουν το αλληλόμορφο HLA-B*35:01^{234,240}. Με δεδομένο ότι και οι δύο ασθενείς επίσης εξέφραζαν το αντιγόνο HLA-B*35, είναι εύλογο να θεωρήσουμε ότι, τουλάχιστον στην προκειμένη περίπτωση, ο κοινός κλωνοτύπος προέκυψε από κοινό EBV αντιγονικό ερεθισμό. Εξάλλου, κάτι τέτοιο είναι έως ένα βαθμό αναμενόμενο, μιας και η ανοσοκαταστολή που επιφέρει η CLL προδιαθέτει σε αναζωπυρώσεις ερπητοϊών²⁴¹. Επίσης, προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι συγκεκριμένοι ασθενείς με CLL, ιδίως εκείνοι των οποίων η κλωνοτυπική BcR IG χρησιμοποιεί το γονίδιοIGHV4-34, έχουν εμμένουσες υποκλινικές λοιμώξεις από EBV, ένδειξη ότι ιϊκά (υπερ)αντιγόνα μπορεί να επάγουν κλωνική έκπτυξη των Β κυττάρων²⁴².

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη τεκμηριώνει την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των Τ λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με CLL, είτε κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα είτε όχι, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω το ρόλο της επιλογής από αντιγόνο(-α) στην παθογένεση της νόσου. Η διαπίστωση κοινών ή πολύ παρόμοιων κλωνοτύπων μεταξύ διαφορετικών ασθενών αποτελεί ένδειξη κλωνικής επιλογής και των Τ λεμφοκυττάρων από κοινούς αντιγονικούς επιτόπους. Μένει να διευκρινιστεί εάν πρόκειται για τα ίδια αντιγόνα που εμπλέκονται στην επιλογή των κλωνικών Β κυττάρων.

Υλικά και Μέθοδοι

Ομάδα ασθενών

Αναλύθηκαν 57 δείγματα από 32 ασθενείς με CLL που δεν είχαν λάβει θεραπεία (**Συμπληρωματικός Πίνακας 11**) και δύο υγιείς μάρτυρες (ηλικίας 70 και 80 ετών, αντίστοιχα). Εικοσιτέσσερις από τους 32 ασθενείς επιλέχθηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής BcR IG, ώστε να κατατάσσονται σε καλά χαρακτηρισμένα στερεότυπα υποσύνολα, συγκεκριμένα τα υποσύνολα #4 (n=12), #1 (n=8), και #2 (n=4). Οι υπόλοιποι 8 ασθενείς δεν κατατάσσονταν σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο και εξέφραζαν είτε μεταλλαγμένες (<98% IGHV GI, n=5) είτε πλήρως αμετάλλακτες (100% IGHV GI, n=3) BcR IG. Δύο ασθενείς του υποσυνόλου #4 και ένας ασθενής του υποσυνόλου #2 αναλύθηκαν σε 2 διαδοχικά χρονικά στιγμιότυπα (διάμεσος χρόνος μεταξύ των δειγματοληψιών 23 μήνες, χωρίς να λάβουν ενδιάμεσα θεραπεία). Κανένας ασθενής δεν είχε συμπτώματα ή σημεία λοίμωξης κατά τη δειγματοληψία. Η μεγάλη πλειονότητα των ασθενών και οι 2 υγιείς μάρτυρες ήταν οροθετικοί για CMV και EBV (**Συμπληρωματικός Πίνακας 12**). Η μελέτη εγκρίθηκε από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση πριν τη δειγματοληψία.

Ενίσχυση των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ και προετοιμασία βιβλιοθήκης NGS

Απομονώθηκε ολικό RNA από μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος (PBMCs, n=40), διαχωρισμένους CD4⁺ και CD8⁺ T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς (n=9 και n=7, αντιστοίχως), μυελό των οστών (BM, n=2) ή φρέσκο λεμφαδενικό ιστό (LN, n=1). Η απομόνωση των CD4⁺ και CD8⁺ T-κυτταρικών υποπληθυσμών έγινε με αρνητική επιλογή (RosetteSep™ Human CD4⁺/CD8⁺ T-Cell Enrichment Cocktail, Stemcell Technologies), καταλήγωντας σε >95% καθαρότητα σύμφωνα με κυτταρομετρία ροής. Σε όλα τα δείγματα, ο αρχικός απόλυτος αριθμός των T κυττάρων ξεπερνούσε τα 0.5x10⁶ κύτταρα, ώστε να είμαστε σε θέση να εκτιμήσουμε την πραγματική ετερογένεια του ρεπερτορίου και να μην υπερενισχύουμε τις ίδιες αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ. Στις αναλύσεις ρεπερτορίου, κάθε κατηγορία δειγμάτων μελετήθηκε χωριστά (PBMCs, BM, LN, CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα).

Με την εξαίρεση 2 δειγμάτων όπου δοκιμάστηκαν βαθμιαία αυξανόμενες ποσότητες RNA, για όλα τα άλλα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάστροφη μεταγραφή 1 μg RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με χρήση του SuperScript II RT kit (Invitrogen Life technologies, USA). Οι αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ ενισχύθηκαν με RT-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED-2²³². Τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό (QIAGEN DNA purification columns, Hilden, Germany) και χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης NGS (TruSeq LT, Illumina) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη βιβλιοθήκη συμπεριλήφθηκε 20% PhiX για βελτιστοποίηση της ετερογένειας των

αλληλουχιών. Πραγματοποιήθηκαν 4 πειράματα αλληλούχησης στην πλατφόρμα Illumina χρησιμοποιώντας το MiSeq Reagent Kit v2 (2x250bp).

Το πρωτόκολλο paired-end αλληλούχησης που εφαρμόζει η Illumina επέτρεψε την αλληλούχηση της TRB CDR₃ εις διπλούν ανά αναδιάταξη, αυξάνοντας έτσι την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τις εγγενείς αδυναμίες της αλληλούχησης νέας γενιάς προϊόντων PCR, συμπεριλάβαμε στη μελέτη πολλών ειδών εσωτερικά controls: (i) υποδιαιρεμένες ποσότητες του αρχικού υλικού (PBMCs, CD4⁺ ή CD8⁺ T-κυτταρικοί υποπληθυσμοί) που περιείχαν τον ίδιο ή προοδευτικά αυξανόμενο αριθμό T κυττάρων [2 δείγματα εις διπλούν, με ίδιο αριθμό T κυττάρων, και ένα δείγμα εις τετραπλούν, με προοδευτική βαθμίδωση από 0.5-18x10⁶ T κύτταρα, ("sample replicates")], (ii) πολλαπλές αντιδράσεις PCR που ξεκινούσαν από το ίδιο δείγμα RNA [2 περιπτώσεις εις διπλούν (με προοδευτικά αυξανόμενη ποσότητα RNA, 1.0-5.8 μg) και 1 εις τετραπλούν, ("PCR replicates")], και, (iii) πολλαπλές αντιδράσεις αλληλούχησης, ξεκινώντας από το ίδιο δείγμα PCR, το οποίο όμως χρησιμοποιούνταν σε διαφορετική βιβλιοθήκη και διαφορετικό πείραμα αλληλούχησης, στο ίδιο ή σε διαφορετικό μηχάνημα MiSeq [5 περιπτώσεις εις διπλούν, ("sequencing replicates")].

Βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων, ορισμοί και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η αρχική αξιολόγηση (filtering) των δεδομένων έγινε μέσω του λογισμικού ανάλυσης σήματος της Illumina, καταλήγοντας στην απόρριψη αλληλουχιών χαμηλής ποιότητας και λοιπών προϊόντων σφάλματος. Οι παραγόμενες αλληλουχίες (reads) αντιστοιχήθηκαν στα δείγματα από τα οποία προήλθαν με βάση τους ενσωματωμένους δείκτες (indexes), και τα τμήματα που αντιστοιχούσαν στους προσαρμογείς (adapters) αφαιρέθηκαν. Στη συνέχεια, για τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων, τα προϊόντα αλληλούχησης αναλύθηκαν με έναν ειδικά σχεδιασμένο αλγόριθμο βιοπληροφορικής που πραγματοποιεί: (i) αξιολόγηση και filtering των παραχθέντων αλληλουχιών με κριτήρια μήκους και ποιότητας αλληλούχησης, (ii) σύνθεση των paired reads μέσω στοίχισης (local alignment), (iii) αξιολόγηση και filtering των συντεθειμένων πλέον αλληλουχιών. Οι κανόνες σχετικά με το μήκος, την ποιότητα και τη σύνθεση των αλληλουχιών παρατίθενται αναλυτικά στο **Συμπληρωματικό Πίνακα 13**. Στη συγκεκριμένη ανάλυση συμπεριλήφθηκαν αποκλειστικά αλληλουχίες που δεν είχαν κανένα νουκλεοτίδιο με Q-score<30 κατά μήκος 75 νουκλεοτιδίων πριν από το μοτίβο FGXG στην αρχή του TRB FR₄, ώστε να διασφαλιστεί όσο γίνεται μεγαλύτερη αξιοπιστία ανάγνωσης της περιοχής TRB CDR₃.

Οι αλληλουχίες που πέρασαν από τα παραπάνω φίλτρα (filtered-in) υποβλήθηκαν στο εργαλείο IMGT/HighV-QUEST (<http://www.imgt.org>). Ακολούθησε επεξεργασία των μετα-δεδομένων σε μια εξειδικευμένη πλατφόρμα βιοπληροφορικής που αναπτύχθηκε κι εγκαταστάθηκε στο Ινστιτούτο γι' αυτό το σκοπό και πραγματοποιεί αναγνώριση κλωνοτύπων και ανάλυση ρεπερτορίου. Στην τελική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο παραγωγικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ. Επίσης, απορρίφθηκαν οι αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ όπου το γονίδιο TRBV παρουσίαζε <95% GI, οπότε εξ' ορισμού χαρακτηρίζονταν από υψηλή συχνότητα λάθους με δεδομένη την απουσία SHM στα T κύτταρα.

Σε κάθε δείγμα, ως μοναδικοί κλωνοτύποι θεωρήθηκαν οι αναδιατάξεις με

πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία TRB CDR₃ και ίδιο γονίδιο TRBV. Ως εκπτυγμένοι θεωρήθηκαν οι κλωνοτύποι που αντιστοιχούσαν σε ≥ 2 αναδιατάξεις, με τους 10 επικρατέστερους κάθε δείγματος να αναφέρονται ως μείζονες (major), ενώ όλοι οι υπόλοιποι αναφέρονται ως μονήρεις (singletons). Η σχετική συχνότητα κάθε κλωνοτύπου/δείγμα υπολογίστηκε ως το σύνολο των αναδιατάξεων που αντιστοιχούν στον κάθε κλωνοτύπο δια του συνολικού αριθμού των filtered-in αναδιατάξεων του συγκεκριμένου δείγματος. Για τις αναλύσεις του ρεπερτορίου των γονιδίων TRB αξιολογήθηκαν οι κλωνοτύποι αντί των αναδιατάξεων, ώστε να αποφύγουμε πιθανές στρεβλώσεις λόγω έκπτυξης μετά από αντιγονικό ερεθισμό. Με άλλα λόγια, η συχνότητα κάθε γονιδίου TRB ανά δείγμα υπολογίστηκε ως το σύνολο των κλωνοτύπων που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο γονίδιο δια του συνόλου των μοναδικών κλωνοτύπων του δείγματος.

Σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και με δημόσιες βάσεις δεδομένων

Πραγματοποιήσαμε σύγκριση κλωνοτύπων μεταξύ των 32 ασθενών με CLL που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, αλλά και σε σχέση με τους 2 υγιείς μάρτυρες. Η σύγκριση αφορούσε αρχικά το σύνολο των κλωνοτύπων και στη συνέχεια το σύνολο των εκπτυγμένων κλωνοτύπων. Οι κλωνοτύποι των επαναληπτικών δειγμάτων (replicates), καθώς και οι κλωνοτύποι που αναγνωρίστηκαν σε CD4⁺ και CD8⁺ T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς του ίδιου ασθενούς, συναθροίστηκαν προκειμένου να συμπεριληφθεί στη σύγκριση το σύνολο των κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε ασθενή. Οι μείζονες κλωνοτύποι κάθε δείγματος CLL συγκρίθηκαν με το σύνολο των κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν στους δύο υγιείς μάρτυρες (n=248,593), καθώς και με μια σειρά 6,318 μοναδικών, καλά χαρακτηρισμένων αναδιατάξεων από ποικίλες οντότητες (από φυσιολογικούς, αυτοαντιδραστικούς και κακοήθεις T-κυτταρικούς κλώνους), οι οποίες ήταν διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (n=2,316) ή ανασύρθηκαν από τη δημόσια βάση αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB (<http://www.imgt.org/IMGTindex>) (n=4,002).

Τυποποίηση HLA

Για την τυποποίηση των γενετικών τόπων HLA-A, -B, -C και -DRB1 εφαρμόστηκε ανάστροφη PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probe) χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμο kit (LABtype® RSSO, One Lambda, Canoga Park, CA). Πραγματοποιήθηκε τυποποίηση χαμηλής ανάλυσης (σε επίπεδο αντιγόνου) των γενετικών τόπων HLA-A, -B, -C και υψηλής ανάλυσης (σε επίπεδο αλληλομόρφου) του γενετικού τύπου HLA-DRB1.

Στατιστική ανάλυση και εργαλεία οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων

Τα περιγραφικά στατιστικά δεδομένα διακριτών παραμέτρων αφορούσαν σε απόλυτους αριθμούς και κατανομές συχνοτήτων. Για ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν μέσοι όροι, διάμεσες τιμές, ανώτατα και κατώτατα όρια. Η σημαντικότητα των δι/πολυπαραγοντικών σχέσεων μεταξύ μεταβλητών εκτιμήθηκε με unpaired t-test, και τα μη-παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis και Mann-Whitney. Για την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας της κλωνικότητας των T λεμφοκυττάρων σε σχέση με το διάστημα έως την πρώτη θεραπεία (time-to-first-treatment, TTFT) εφαρμόστηκαν έλεγχοι με Cox-

regression και hazard ratio. Ο TTFT αντιστοιχούσε στο χρονικό διάστημα από τη δειγματοληψία, οπότε και εκτιμήθηκε η κλινικότητα, έως την ημερομηνία έναρξης της πρώτης θεραπείας. Οι περιπτώσεις ασθενών που δεν έλαβαν θεραπεία περικλύθηκαν (censored) στην τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης (last follow-up). Ως όριο σημαντικότητας για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το $p=0.05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Πρόσβαση δεδομένων

Οι αλληλουχίες που παράχθηκαν έχουν κατατεθεί στη δημόσια βάση αλληλουχιών GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) με κωδικό πρόσβασης SRR3737053.

Αποτελέσματα

Το ρεπερτόριο των T κυττάρων, και ιδιαίτερα του CD8⁺ T-κυτταρικού υποπληθυσμού, παρουσιάζει επιλεκτικότητα

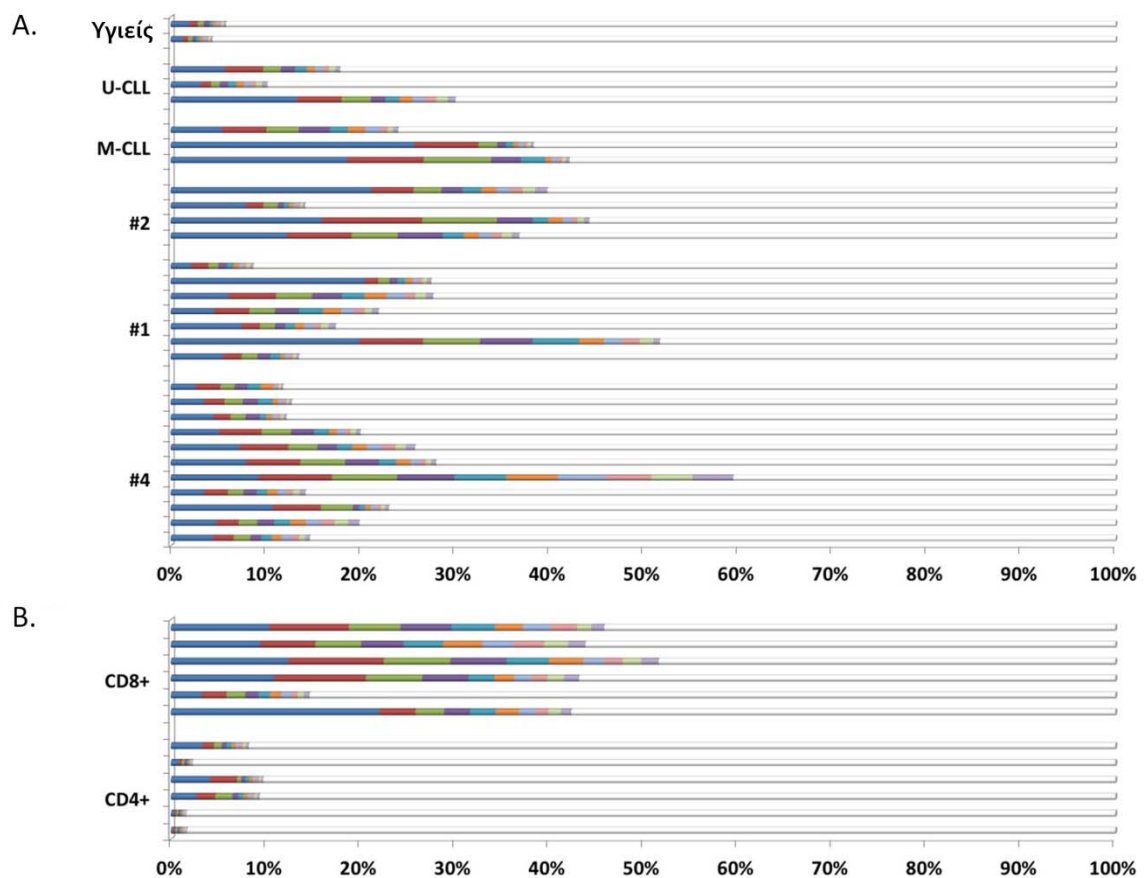
Συνολικά παράχθηκαν 19,513,078 filtered-in αλληλουχίες. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο παραγωγικές αναδιατάξεις TRBV-TRBD-TRBJ (85.7% των filtered-in αλληλουχιών, Δμ 324,058/δείγμα). Για τις αναλύσεις ρεπερτορίου αξιολογήθηκαν οι κλωνοτύποι (δηλαδή ομάδες αναδιατάξεων με πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία TRB CDR3 και ίδιο γονίδιο TRBV. Ο διάμεσος αριθμός κλωνοτύπων/δείγμα ήταν 34,554 (2,193-166,078). Ο διάμεσος αριθμός εκπτυγμένων και μονήρων κλωνοτύπων/δείγμα ήταν 12,507 (812-57,035) και 21,778 (1,381-122,586), αντίστοιχα.

Μόλις 6 γονίδια [TRBV12-3/12-4 (8.4%), TRBV29-1 (6.9%), TRBV27 (6.7%), TRBV19 (6.2%), TRBV7-9 (5.4%), και TRBV6-5 (5.1%)] αντιστοιχούσαν σε περισσότερο από το ένα τρίτο του συνολικού ρεπερτορίου. Δε διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές συχνότητας γονιδίων TRBV μεταξύ U-CLL και M-CLL ή μεταξύ διαφορετικών στερεότυπων υποσυνόλων. Ωστόσο, η συχνότητα χρήσης συγκεκριμένων γονιδίων TRBV διέφερε σημαντικά μεταξύ του CD8⁺ έναντι του CD4⁺ T-κυτταρικού υποπληθυσμού της CLL. Συγκεκριμένα, τα γονίδια TRBV27 και TRBV7-9 επικρατούσαν στον CD8⁺ έναντι του CD4⁺ T-κυτταρικού υποπληθυσμού (6.4% έναντι 3.9%, $p=0.001$ και 4.6% έναντι 2.6%, $p=0.001$, αντιστοίχως), ενώ το αντίθετο ίσχυε για τα γονίδια TRBV5-1 και TRBV7-2 (4.0% έναντι 6.8%, $p=0.001$ και 3.1% έναντι 6.0%, $p=0.002$, αντιστοίχως) (**Συμπληρωματικοί Πίνακες 14-15**).

Τα δείγματα των υγιών μαρτύρων χαρακτηρίζονταν επίσης από ασύμμετρη κατανομή συχνότητας των γονιδίων TRBV, παρότι ο μικρός αριθμός τους δεν επιτρέπει την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων (**Συμπληρωματικός Πίνακας 16**). Παρόλ' αυτά, το ρεπερτόριο TRB της CLL ήταν σημαντικά πιο ολιγοκλωνικό σε σχέση με τα δείγματα των υγιών μαρτύρων, με διάμεση αθροιστική συχνότητα των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα 23.6% έναντι 5.1%, αντιστοίχως ($p<0.05$) (**Εικόνα 24A, Συμπληρωματικός Πίνακας 17**).

Για να διερευνήσουμε εάν η κλινικότητα των T λεμφοκυττάρων σχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου, υπολογίσαμε το διάστημα TTFT σε 22/24 ασθενείς για τους οποίους αναλύθηκαν δείγματα PBMCs (μετρώντας από την ημερομηνία της δειγματοληψίας, οπότε κι εκτιμήθηκε η κλινικότητα, έως την ημερομηνία της πρώτης

θεραπείας ή την ημερομηνία τελευταίας παρακολούθησης για όσους δεν έλαβαν θεραπεία). Η αθροιστική συχνότητα των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων/ασθενή δεν άγγιξε τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το διάστημα TTFT όταν θεωρήθηκε ως συνεχής ποσοτική μεταβλητή ($p=0.54$). Όταν διαιρέσαμε τους ασθενείς σε 2 κατηγορίες κλωνικότητας, πάνω ($n=11$) ή κάτω ($n=11$) από τη διάμεση αθροιστική συχνότητα των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων (22.3%), διαπιστώσαμε ότι η πρώτη κατηγορία εμφάνιζε μεγαλύτερη πιθανότητα να λάβει θεραπεία, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα (Hazard ratio 1.7, $p=0.34$).



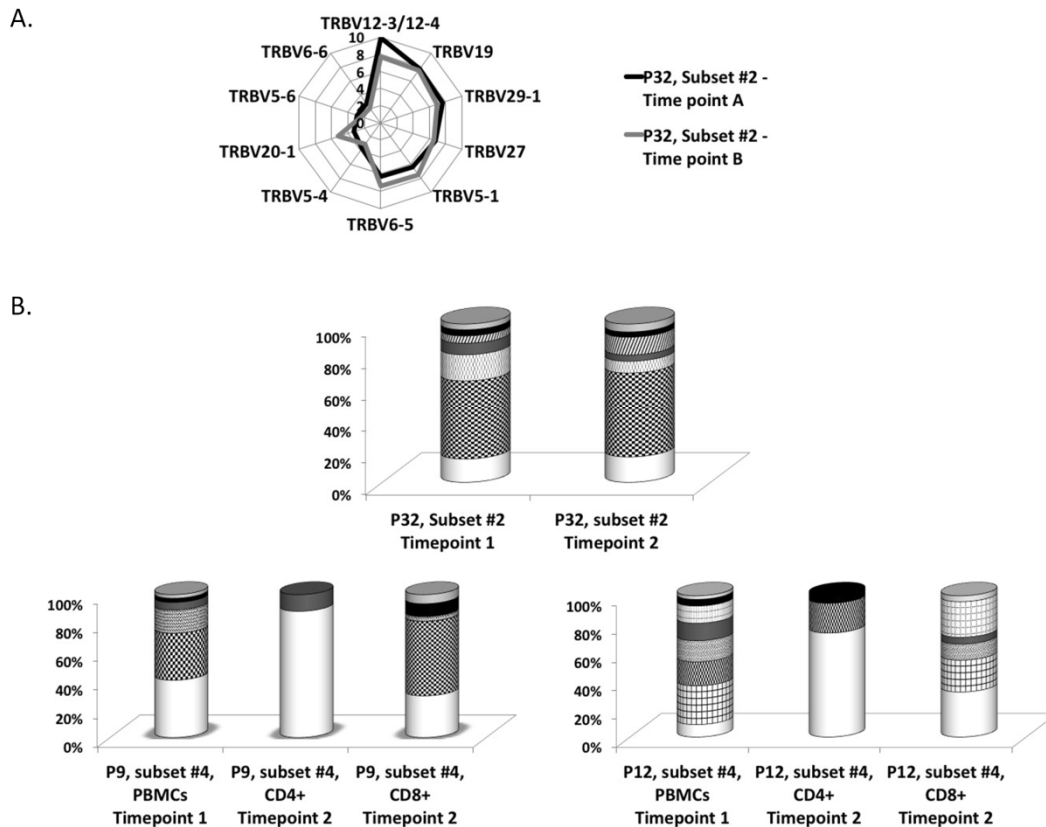
Εικόνα 24. Το ρεπερτόριο των T λεμφοκυττάρων στη CLL είναι ολιγοκλωνικό, με την κλωνικότητα να εκπορεύεται κυρίως από τον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό. Α. Ανάλυση κλωνικότητας T λεμφοκυττάρων για κάθε ανοσογενετική υποομάδα της CLL [υποσύνολα #1, #2, #4 και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο με μεταλλαγμένες (M) ή αμετάλλακτες (UM) BcR IG] έναντι των υγιών μαρτύρων. Κάθε λωρίδα αντιστοιχεί σ' ένα δείγμα PBMC (τα επαναληπτικά δείγματα έχουν εξαιρεθεί). Ανάλυση κλωνικότητας στον CD8⁺ και τον CD4⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό. Εδώ, κάθε λωρίδα αντιστοιχεί σ' ένα δείγμα CD4⁺ ή CD8⁺ T κυττάρων των ασθενών με CLL.

Τα έγχρωμα τουθλάκια κάθε λωρίδας αποδίδουν το σχετικό μέγεθος των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων στο αντίστοιχο δείγμα. Το εξωτερικό τμήμα (με λευκό χρώμα) αποδίδει το πολυκλωνικό background, δηλαδή την αθροιστική συχνότητα όλων των υπολοίπων κλωνοτύπων του δείγματος.

Οι ξεχωριστές ανοσογενετικές υποομάδες της CLL δεν παρουσίαζαν ιδιαίτερες διαφορές ως προς την κλωνικότητα. Η κλωνικότητα εκπορευόταν κυρίως από τον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, με διάμεση αθροιστική συχνότητα των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων 43.6% έναντι μόλις 5.3% για τον CD4⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, αντίστοιχα ($p < 0.001$) (Εικόνα 24B, Συμπληρωματικός Πίνακας 17).

Η διαχρονική ανάλυση αποκαλύπτει παραμονή T-κλώνων

Για να εκτιμήσουμε τη δυναμική των T-κλώνων διαχρονικά, ένας ασθενής του υποσυνόλου #2 και δύο ασθενείς του υποσυνόλου #4 μελετήθηκαν σε δύο διαδοχικά χρονικά στιγμιότυπα (με διάμεσο διάστημα μεταξύ των δειγματοληψιών 23 μήνες). Στον ασθενή του υποσυνόλου #2, και στα δύο στιγμιότυπα αναλύθηκαν PBMCs. Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV παρέμεινε αξιοσημείωτα σταθερό στο χρόνο (Εικόνα 25 A). Στους δύο ασθενείς του υποσυνόλου #4, στο πρώτο στιγμιότυπο αναλύθηκαν PBMCs, ενώ στο δεύτερο μελετήθηκαν ξεχωριστά οι υποπληθυσμοί CD4⁺ και CD8⁺, και γι' αυτό δεν επιχειρήθηκε σύγκριση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV.



Εικόνα 25. Διαχρονική ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV και δυναμική των T-κλώνων. A. Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV ενός ασθενή του υποσυνόλου #2 παραμένει σταθερό στο χρόνο. Εικονίζονται τα 10 συχνότερα γονίδια TRBV. B. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στους μείζονες κλωνοτύπους του αντίστοιχου δείγματος. Αυτοί που παραμένουν στο χρόνο αποδίδονται με το ίδιο χρώμα/μοτίβο. Το κατώτερο τμήμα κάθε στήλης (λευκό) αντιστοιχεί στους μείζονες κλωνοτύπους που δε βρέθηκαν μεταξύ των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων στο επόμενο χρονικό στιγμιότυπο. Μείζονες κλωνοτύποι παραμένουν στο χρόνο και στις 3 περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

Μείζονες κλωνοτύποι (δηλαδή μεταξύ των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα) βρέθηκαν να παραμένουν και στις τρεις περιπτώσεις που μελετήθηκαν διαχρονικά. Στον ασθενή του υποσυνόλου #2, 10.4% (3970/38054) όλων των κλωνοτύπων και 17.4% (2286/13134) όλων των εκπτυγμένων κλωνοτύπων του πρώτου στιγμιότυπου παρέμεναν στο χρόνο. Μάλιστα, στο δεύτερο στιγμιότυπο αντιστοιχούσαν σε μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού ρεπερτορίου (31.9% όλων των κλωνοτύπων και 40.9% όλων των εκπτυγμένων κλωνοτύπων, αντιστοίχως). Στους ασθενείς του υποσυνόλου #4, 14.9% (2576/17250) και 27.6% (9918/35962) όλων των κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα PBMCs παρέμεναν και στο επόμενο στιγμιότυπο (11.8% και 21.0% περιέχονταν στον CD4⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, και 3.1% και 6.6% στον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, αντιστοίχως). Παρομοίως, 16.7% (1247/7455) και 35.3% (4984/14125) όλων των εκπτυγμένων κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα PBMCs παρέμεναν και στο επόμενο στιγμιότυπο (13.1% και 26.8% στον CD4⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, και 3.6% και 8.5% στον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό, αντιστοίχως). Οι περισσότεροι μείζονες κλωνοτύποι που παρέμεναν στο χρόνο περιέχονταν στο CD8⁺ διαμέρισμα (Εικόνα 25B).

Κοινοί T-κλωνοτύποι στη CLL: κατά βάση είναι ειδικοί για τη νόσο

Συγκρίσεις μεταξύ των ασθενών με CLL και σε σχέση με τους δύο υγιείς μάρτυρες έδειξε ότι 162,179/2,464,321 (6.6%) των CLL κλωνοτύπων ήταν κοινοί για 2 ή περισσότερους ασθενείς, και το 96.8% απ' αυτούς δε βρέθηκε στο ρεπερτόριο των υγιών μαρτύρων. Οι περισσότεροι (79.2%) από τους κοινούς CLL κλωνοτύπους αφορούσαν σε ζεύγη ασθενών και λιγότεροι βρέθηκαν σε τρεις (13.3%) ή ≥4 (7.5%) ασθενείς. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν όταν εξαιρέθηκαν οι μονήρεις κλωνοτύποι.

Στις περισσότερες περιπτώσεις οι κοινοί CLL κλωνοτύποι ήταν χαμηλής συχνότητας. Έτσι, πραγματοποιήσαμε τις αντίστοιχες συγκρίσεις μόνο για τους μείζονες κλωνοτύπους κάθε δείγματος, οπότε βρέθηκαν: (i) 2 μείζονες κλωνοτύποι κοινοί μεταξύ 2 ζευγών ασθενών του υποσυνόλου #4, (ii) 1 μείζων κλωνοτύπος κοινός μεταξύ ενός ζεύγους ασθενών του υποσυνόλου #1, (iii) 1 μείζων κλωνοτύπος κοινός μεταξύ ενός ασθενούς του υποσυνόλου #1 και ενός ασθενούς του υποσυνόλου #2, και (iv) 2 μείζονες κλωνοτύποι κοινοί μεταξύ 2 ζευγών ασθενών που κατατάσσονταν σε διαφορετικές ανοσογενετικές υποομάδες - ένας από αυτούς βρέθηκε και στο ρεπερτόριο των δύο υγιών μαρτύρων, αν και σε πολύ χαμηλές συχνότητες (0.04% and 0.0005%, αντιστοίχως). Σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών στερεότυπων υποσυνόλων με κοινούς μείζονες κλωνοτύπους η τυποποίηση HLA αποκάλυψε το πιθανό εμπλεκόμενο αντιγόνο HLA (Πίνακας 6, Συμπληρωματικός Πίνακας 18).

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε συγκρίσεις των μείζονων CLL κλωνοτύπων με μια σειρά 6,318 μοναδικών, παραγωγικών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ από διάφορες κλινικές οντότητες, κατατεθειμένες στην τράπεζα αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB ή διαθέσιμες στην ομάδα μας από προηγούμενες μελέτες. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6, μόνο ένας κοινός μείζων κλωνοτύπος βρέθηκε να ταιριάζει με κάποια "δημόσια" αλληλουχία, η οποία προερχόταν από ασθενή με T-λευχαιμία από μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα (T-large granular lymphocytic leukemia, LGL). Αυτός ο κλωνοτύπος δεν ήταν κοινός μεταξύ ασθενών του ίδιου υποσυνόλου, αλλά μεταξύ ενός ασθενούς του υποσυνόλου #4 κι ενός ασθενούς με μεταλλαγμένη BcR IG που δεν κατατασσόταν σε

κάποιο στερεότυπο υποσύνολο. Όσον αφορά τους μείζονες κλωνοτύπους που βρέθηκαν αποκλειστικά σε κάθε ασθενή ("ιδιωτικοί" μείζονες κλωνοτύποι), κάποιοι βρέθηκαν να ταιριάζουν με: (i) 2 T-κλώνους ειδικούς έναντι του EBV, (ii) 1 T-κλώνο από ασθενή με T-LGL, και (iii) 1 T-κλώνο από άτομο με CLL-like MBL. Επιπλέον, βρέθηκε ένας κοινός κλωνοτύπος μεταξύ ενός ασθενούς (P17) του υποσυνόλου #1 (προερχόμενος από το CD4⁺ T-κυτταρικό διαμέρισμα) κι ενός ασθενούς επίσης του υποσυνόλου #1 που αναλύθηκε με μεθόδους κλασικής υποκλωνοποίησης στην προηγούμενη μελέτη²¹⁰ (Πίνακας 7). Αυτό το ζεύγος ασθενών είχαν κοινό το αλληλόμορφο HLA-DRB*13:03. Συνεπώς, συνολικά, οι μείζονες κοινοί κλωνοτύποι μεταξύ ασθενών με CLL ήταν κατά κύριο λόγο ειδικοί για τη νόσο, καθότι δε βρέθηκαν σε άλλες κλινικές οντότητες.

Κωδικός ασθενούς	Ανοσογενετική υποομάδα	Είδος δείγματος	TRBV	TRB CDR ₃ (AA)	Αντιστοιχία με δημόσια βάση ή υγιείς	Κοινό HLA
P8	υποσύνολο #4	PBMCs	TRBV7-2	ASSLSGRGPLGSNQPOH	-	HLA-A*02
P9	υποσύνολο #4	CD8+				
P8	υποσύνολο #4	PBMCs	TRBV19	ASTROGTGELF	-	HLA-A*02 ή HLA-B*51
P3	υποσύνολο #4	PBMCs				
P15	υποσύνολο #1	BM	TRBV12-3	ASSSTGGTGELF	-	HLA-A*24
P13	υποσύνολο #1	LN				
P16	υποσύνολο #1	PBMCs	TRBV19	ASSQGAGNTIY	-	HLA-A*02
P32	υποσύνολο #2	PBMCs				
P18	M-CLL, IGHV4-34	CD8+	TRBV29-1	SVGTGGTNEKLF	T-LGL	ND
P3	υποσύνολο #4	PBMCs				
P16	υποσύνολο #1	PBMCs	TRBV5-1	ASRGGEKLF	Υγιείς μάρτυρες	ND
P22	υποσύνολο #2	BM				
P25	UM-CLL, IGHV4-34	PBMCs				
P30	UM-CLL, IGHV3-21	PBMCs				

Πίνακας 6. Κοινοί μείζονες κλωνοτύποι μεταξύ ασθενών με CLL.

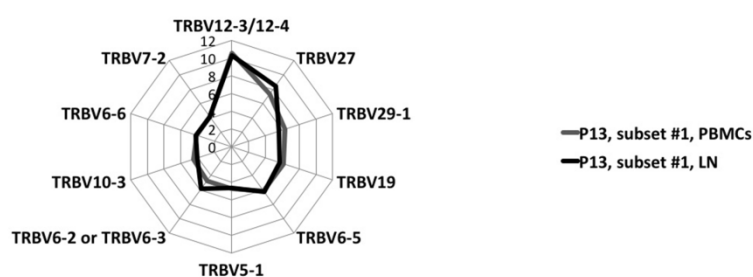
Κωδικός ασθενούς	Ανοσογενετική υποομάδα	TRBV	TRB CDR ₃ (AA)	Κλινική οντότητα	Κωδικός πρόσβασης αλληλουχίας
P23	M-CLL, IGHV4-34	TRBV10-3	AIGTGDSNQPOH	EBV	AM041168, AM041175
P31	M-CLL, IGHV3-21	TRBV10-3	ASGTGDSNQPOH	EBV	AM041172
P11	υποσύνολο #4	TRBV19	ASSIGTGELF	LGL	
P32	υποσύνολο #2	TRBV12-3	ASSPNYSNQPOH	MBL	
P17	υποσύνολο #1	TRBV6-5	ASSRAGQPQH	CLL, υποσύνολο #1	

Πίνακας 7. Μείζονες κλωνοτύποι ασθενών με CLL που βρέθηκαν στη δημόσια βάση δεδομένων.

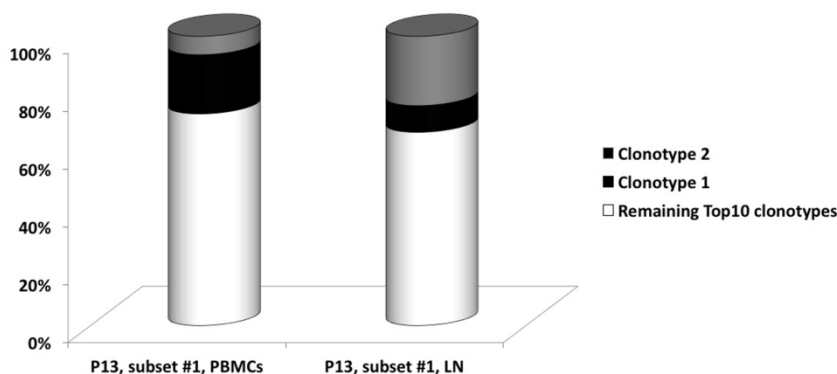
Κοινοί κλωνοτύποι σε διαφορετικούς ιστούς

Για έναν ασθενή του υποσυνόλου #1 αναλύθηκαν σύγχρονα δείγματα αίματος και λεμφαδένα. Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV ήταν σχεδόν πανομοιότυπο στα δύο δείγματα (Εικόνα 26A). Ο βαθμός κλωνικότητας ήταν επίσης παρόμοιος. Συγκεκριμένα, η διάμεση αθροιστική συχνότητα των 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων/δείγμα ήταν 8.8% στα PBMCs έναντι 7.3% στο λεμφαδένα και το ποσοστό των εκπτυγμένων κλωνοτύπων στο σύνολο του ρεπερτορίου κάθε δείγματος ήταν 37.2% (15072/40503) έναντι 38.1% (15639/41010), αντιστοίχως. Συνολικά, 18.7% (7576/40503) κλωνοτύποι και 24.5% (3696/15072) εκπτυγμένοι κλωνοτύποι που βρέθηκαν στο δείγμα PBMCs βρέθηκαν επίσης και στο δείγμα λεμφαδένα. Μεταξύ αυτών υπήρχαν και 2 κοινοί μείζονες κλωνοτύποι (Εικόνα 26B).

A.



B.



Εικόνα 26. Σύγκριση ρεπερτορίου σε σύγχρονα δείγματα αίματος και λεμφαδένα ενός ασθενή του υποσυνόλου #1. A. Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV είναι πρακτικά το ίδιο στους δύο ιστούς. Εικονίζονται τα 10 συχνότερα γονίδια TRBV. B. Δύο μείζονες κλωνοτύποι είναι κοινοί στους δύο ιστούς (με γκρι και μαύρο). Το κατώτερο τμήμα των στηλών (λευκό χρώμα) περιλαμβάνει τους υπόλοιπους 8 μείζονες κλωνοτύπους κάθε δείγματος.

Επαναληπτικά δείγματα

Αρχικά εξετάσαμε "sample replicates", δηλαδή υποδιαιρέσεις του αρχικού δείγματος που περιείχαν ίδιο ή διαδοχικά αυξανόμενο αριθμό T κυττάρων (1 δείγμα εις τετραπλούν και 2 δείγματα εις διπλούν). Συνολικά, παρατηρήθηκε μια μικρή διακύμανση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV, αλλά μεγάλη επαναληψιμότητα όσο αφορά στους μείζονες κλωνοτύπους, απόδειξη ότι η ποσότητα του αρχικού δείγματος επαρκούσε για ικανοποιητικό βάθος ανάλυσης, τουλάχιστον για το εύρος του αριθμού T κυττάρων που δοκιμάστηκε ($0.5-18 \times 10^6$ cells), (Συμπληρωματικές Εικόνες 1-2).

Στη συνέχεια εξετάσαμε "PCR replicates", ξεκινώντας δηλαδή από το ίδιο δείγμα RNA (ίσες ή προοδευτικές αυξανόμενες ποσότητες, 1 δείγμα εις τετραπλούν και 2 δείγματα εις διπλούν). Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε μια ήπια διακύμανση του ρεπερτορίου των γονιδίων TRBV, αλλά μεγάλη επαναληψιμότητα όσο αφορά στους μείζονες κλωνοτύπους, απόδειξη ότι τόσο η σύνθεση του cDNA όσο και η διαδικασία προετοιμασίας της βιβλιοθήκης αποδίδουν επαναλήψιμα αποτελέσματα, τουλάχιστον για το εύρος της ποσότητας RNA που δοκιμάστηκε (1.0-5.8 μg) (**Συμπληρωματικές Εικόνες 3-4**).

Τέλος, εξετάσαμε "sequencing replicates", χρησιμοποιώντας το ίδιο προϊόν PCR σε διαφορετικά πειράματα αλληλούχησης, που μάλιστα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά μηχανήματα MiSeq (5 δείγματα εις διπλούν). Τόσο το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV όσο και οι μείζονες κλωνοτύποι ήταν πρακτικά τα ίδια, απόδειξη ότι η τεχνική αλληλούχησης αποδίδει πραγματικά επαναλήψιμα αποτελέσματα (**Συμπληρωματικές Εικόνες 5-6**).

Συζήτηση

Μολονότι η τεχνολογία NGS παρέχει τη δυνατότητα να μελετήσουμε την αρχιτεκτονική περίπλοκων άνοσων ρεπερτορίων, ωστόσο, παρουσιάζει εγγενείς περιορισμούς που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε κάθε περίπτωση. Στην παρούσα μελέτη του ρεπερτορίου TRB στη CLL ακολουθήσαμε μια συστηματική, αυστηρή προσέγγιση που περιλάμβανε πολλαπλά εσωτερικά και εξωτερικά controls και εστιάσαμε σε περιπτώσεις ασθενών που κατατάσσονται σε μείζονα, καλά χαρακτηρισμένα στερεότυπα υποσύνολα της νόσου, τα οποία έχουν διακριτή κλινική πορεία και έκβαση⁹⁷. Επίσης, συμπεριλάβαμε ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε κάποιο γνωστό στερεότυπο υποσύνολο ώστε να μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε πιθανά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά του T ρεπερτορίου που είναι κοινά για όλη τη CLL, ανεξάρτητα από τα μοριακά χαρακτηριστικά της κλωνοτυπικής BcR IG.

Τα ευρήματα της μελέτης τεκμηριώνουν ολιγοκλωνικότητα του T ρεπερτορίου σε όλους τους ασθενείς που αναλύθηκαν, η οποία εκπορεύεται κυρίως από τον CD8⁺ T-κυτταρικό υποπληθυσμό. Ο βαθμός ολιγοκλωνικότητας δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ανοσογενετικών υποομάδων της CLL, αλλά διέφερε σαφώς από το πολυκλωνικό προφίλ που χαρακτήριζε τους υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας, ένδειξη επιλογής από αντιγόνο(-α). Η συχνότητα των γονιδίων TRBV δε διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, γεγονός που μπορεί να προκύπτει είτε λόγω διαφορικής αποτελεσματικότητας (differential efficiency) των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ, είτε λόγω επιλεκτικότητας που συμβαίνει φυσιολογικά κατά τον ανασυνδυασμό των γονιδίων TRBV^{243,244}. Ωστόσο, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές του ρεπερτορίου γονιδίων TRBV στα CD4⁺ έναντι των CD8⁺ T κυττάρων συνηγορούν υπέρ της δεύτερης υπόθεσης.

Βασικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι μείζονες T κλώνοι παραμένουν στο χρόνο σε ασθενείς διαφορετικών ανοσογενετικών ομάδων της CLL (συγκεκριμένα των υποσυνόλων #2 και #4). Μάλιστα, οι παραμένοντες κλώνοι, που βρέθηκαν τόσο στον CD4⁺ όσο και στον CD8⁺ υποπληθυσμό, αντιπροσώπευαν μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού ρεπερτορίου με το χρόνο σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Οι περισσότεροι παραμένοντες κλωνοτύποι προέρχονταν από τον CD8⁺ T-κυτταρικό

υποπληθυσμό, ωστόσο αυτό μπορεί να σχετίζεται με το μεγαλύτερο βαθμό κλωνικότητας που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο κυτταρικό υποπληθυσμό. Με βάση τα παραπάνω, μπορούσε να υποθέσουμε ότι τα αντίστοιχα αντιγόνα παραμένουν επίσης στο χρόνο, υποκινώντας την περαιτέρω έκπτυξη των συγκεκριμένων κλώνων. Παρά το σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν, παραμονή μειζόνων T κλώνων παρατηρήθηκε σε δύο ανοσογενετικές κατηγορίες της CLL με αντίθετα κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά (δηλαδή το υποσύνολο #2 και το υποσύνολο #4), ένδειξη ότι πρόκειται για οικογενετικό χαρακτηριστικό της CLL. Θα ήταν ωστόσο ενδιαφέρον να επιβεβαιώσουμε αυτή την υπόθεση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, περιλαμβάνοντας και ασθενείς που δεν κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα.

Όπως ήταν αναμενόμενο για άτομα που δεν επιλέχθηκαν με βάση τη συμβατότητα HLA, οι περισσότεροι από τους κλωνοτύπους που αναγνωρίστηκαν ήταν ειδικοί για τον κάθε ασθενή ("private"), ενώ λίγοι ήταν "δημόσιοι" ("public"), δηλαδή κοινοί για ≥ 2 ασθενείς. Εξάλλου, οι περισσότεροι από τους δημόσιους κλωνοτύπους ήταν χαμηλής συχνότητας και συνεπώς αμφίβολης βιολογικής σημασίας. Ωστόσο, δε μπορεί να παραγνωριστεί η ύπαρξη μειζόνων κλωνοτύπων κοινών μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Αυτοί οι κοινοί μείζονες κλωνοτύποι συνήθως αφορούσαν ασθενείς που κατατάσσονταν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο, όπου ο B κλώνος κατά πάσα πιθανότητα επιλέγεται από το ίδιο αντιγόνο^{77,237}. Μάλιστα, δεν αναγνωρίστηκαν στους υγιείς μάρτυρες που εξετάστηκαν, παρότι και οι δύο εξέφραζαν το αντιγόνο HLA-A*24 και συνεπώς πληρούσαν τον περιορισμό HLA που βρέθηκε να ισχύει για τουλάχιστον 1 μείζονα κλωνοτύπο, κοινό μεταξύ δύο ασθενών του υποσυνόλου #1. Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν επιλογή του T ρεπερτορίου από περιορισμένο αριθμό αντιγονικών επιτόπων, πιθανώς σε ειδικό πλαίσιο για τα στερεότυπα υποσύνολα. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα εμπλεκόμενα αντιγόνα είναι τα ίδια που επιλέγουν τον κακοήγη B κλώνο, ή εναλλακτικά θα μπορούσε να αντιστοιχούν σε μοριακές δομές της ίδιας της κλωνοτυπικής BcR IG που λειτουργούν ως ιδιοτυπικά νεοαντιγόνα⁷². Πρόσφατες έρευνες που συνδυάζουν κρυσταλλογραφικές και λειτουργικές μελέτες απέδωσαν εξαιρετικά ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με τη φύση των επιτόπων που εμπλέκονται στις ομότυπες αλληλεπιδράσεις των κλωνοτυπικών BcR⁷³. Φαίνεται πως αυτοί οι επίτοποι είναι πράγματι ειδικοί για κάθε στερεότυπο υποσύνολο: η συγκεκριμένη έρευνα διευκρίνισε τον τρόπο αυτόνομης ενεργοποίησης των κυττάρων CLL και συμβίβασε τα διακριτά κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά των στερεότυπων υποσυνόλων με τη λειτουργία ενός οικογενετικού παθογενετικού μηχανισμού⁷². Υπό το πρίσμα αυτών των ευρημάτων, θα ήταν ενδιαφέρον να εξετάσουμε αν οι ειδικοί για κάθε υποσύνολο επίτοποι αναγνωρίζονται από τα αυτόλογα T κύτταρα, και τι λειτουργικό αντίκτυπο μπορεί να επιφέρει η πρόσδεσή τους.

Συμπερασματικά, η μαζική αλληλούχηση τεκμηριώνει την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων στη CLL, υποδεικνύοντας επιλογή από περιορισμένο εύρος αντιγόνων. Αυτά τα αντιγόνα φαίνεται να λειτουργούν διαχρονικά, οδηγώντας τους αντίστοιχους T κλώνους σε περαιτέρω έκπτυξη. Τέτοιοι εκπτυγμένοι κλώνοι παρατηρούνται σε διαφορετικούς ασθενείς, ιδίως μεταξύ ασθενών που κατατάσσονται στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο. Παραμένει αδιευκρίνιστο εάν αναγνωρίζουν τα ίδια αντιγόνα που επιλέγουν τον κλωνικό B πληθυσμό ή νεοαντιγόνα, πιθανώς προερχόμενα από την ίδια την κλωνοτυπική BcR IG. Η διαλεύκανση του συγκεκριμένου ζητήματος θα

προσέφερε ιδιαίτερα σημαντικές ενδείξεις στα πλαίσια των κλινικών δοκιμών φαρμάκων που επιδιώκουν να ενισχύσουν τις ενδογενείς κυτταροτοξικές απαντήσεις των Τ κυττάρων κατά του όγκου^{231,245,246}.

Η CLL είναι η συχνότερη λευχαιμία των ενηλίκων στη Δύση. Πρόκειται για ανίατη πάθηση, ωστόσο πολύ ετερογενή ως προς την κλινική πορεία και την απάντηση στη θεραπεία. Αυτή η κλινική ετερογένεια φαίνεται να συνδέεται με ετερογένεια σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

Η έρευνα των τελευταίων ετών αποκάλυψε ότι η CLL διακρίνεται σε υποκατηγορίες με ξεχωριστά βιολογικά χαρακτηριστικά που αφορούν στο γενωμικό και επιγενωμικό προφίλ (χωρίς ωστόσο να υπάρχουν συγκεκριμένες βλάβες που χαρακτηρίζουν μεγάλο ποσοστό ασθενών), αλλά και σε δομικές/σηματοδοτικές ιδιαιτερότητες του κλωνοτυπικού B-κυτταρικού υποδοχέα (B-cell receptor, BcR)²⁴⁷.

Η ανοσογενετική ανάλυση των κλωνοτυπικών BcR στη CLL υπήρξε αποκαλυπτική για την παθογένεια της νόσου. Η έντονη επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών⁶², η διαφορετική πρόγνωση των ασθενών ανάλογα με την κατάσταση μεταλλάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGHV)^{63,64} και, κυρίως, η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με παρόμοιους, στερεότυπους BcR (30% του συνόλου των ασθενών με CLL)^{74,76,100}, αποτελούν ισχυρές ενδείξεις επιλογής του κλώνου από αντιγόνο(-α), χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί η φύση αυτών των αντιγόνων, ούτε το πού, πότε και για πόσο διάστημα επιδρούν. Αυτές οι παρατηρήσεις αποτέλεσαν τη βάση για την πρόσφατη ανάπτυξη και εφαρμογή στην κλινική πράξη βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του BcR, με θεαματικά αποτελέσματα^{214,216}.

Εκτός από τη σηματοδότηση μέσω του BcR, ο λευχαιμικός κλώνος της CLL φαίνεται να αλληλεπιδρά ποικιλοτρόπως με το μικροπεριβάλλον του προκειμένου να εκμεταλλευτεί σήματα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού και ταυτόχρονα να αποφύγει την ανοσοεπιτήρηση^{217,219}. Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα που δρουν στο επίπεδο της άνοσης σύναψης μεταξύ B και T λεμφοκυττάρων δοκιμάζονται σήμερα σε κλινικές μελέτες, με υποσχόμενα αποτελέσματα^{218,231}.

Η ανοσολογική προσέγγιση της CLL πρέπει να μπορεί να ερμηνεύσει και την ύπαρξη της CLL-like μονοκλωνικής B λεμφοκυττάρωσης (CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis, MBL). Ο όρος περιγράφει την παρουσία κλωνικού B λεμφοκυτταρικού πληθυσμού με τυπικό ανοσοφαινότυπο CLL στο περιφερικό αίμα, με μέγεθος μικρότερο από το απαιτούμενο για τη διάγνωση της CLL, δηλαδή <5000 κλωνικά B λεμφοκύτταρα/μL. Η CLL-like MBL είναι οντότητα συχνή στο γενικό πληθυσμό, με επίπτωση ~10% η οποία αυξάνει με την ηλικία και με την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης και θεωρείται προκαρκινική κατάσταση της CLL, επειδή μεταπίπτει σε CLL που απαιτεί θεραπεία με ρυθμό 1-2% ανά έτος¹⁵⁴. Αν όμως τα κλωνικά κύτταρα της MBL αντιστοιχούν σε πρόγονους κυττάρων CLL, γιατί δε μεταπίπτουν όλες οι περιπτώσεις MBL σε CLL;

Διερευνήσαμε την οντογένεση της CLL από ανοσογενετική σκοπιά, κινούμενοι σε τρεις άξονες: (i) ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στην MBL,

προκειμένου να διαπιστωθούν ανοσογενετικές ομοιότητες ή διαφορές με τη CLL και μάλιστα τη CLL πρώιμου σταδίου (CLL-o), (ii) ανάλυση της CLL με εναλλαγή ισοτύπου, μια ειδική υποκατηγορία CLL, προκειμένου να διερευνηθεί αν η εναλλαγή ισοτύπου συνοδεύεται κι από άλλα ειδικά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά που μπορεί να προσανατολίσουν ως προς το είδος αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο(-α), και (iii) μελέτη του ρεπερτορίου των T κυτταρικών υποδοχέων (TR) στα T λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ, προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδρασή τους με (αλλο-, αυτο-, ογκο-)αντιγόνα.

Μελετήθηκαν 333 περιπτώσεις CLL-like MBL από συνεργαζόμενα κέντρα Ελλάδας, Ευρώπης και Η.Π.Α (60 με LC-MBL και 273 με HC-MBL). Το ρεπερτόριο των γονιδίων IG διέφερε μεταξύ LC-MBL και HC-MBL. Ωστόσο, το ρεπερτόριο των γονιδίων IG της HC-MBL προσομοιάζε εκείνο της CLL πρώιμου κλινικού σταδίου (Rai o). Επιπλέον, αναζητήσαμε έκφραση στερεότυπων BcR IGs εφαρμόζοντας ανάλυση ομαδοποίησης στο σύνολο των αλληλουχιών MBL, CLL, καθώς και των αλληλουχιών που ανασύρθηκαν από τη δημόσια βάση δεδομένων IMGTL/IGM-DB. Μόλις 5.5% των αναδιατάξεων LC-MBL ομαδοποιήθηκαν με άλλες αλληλουχίες, που προέρχονταν από ασθενείς με CLL, άλλα λεμφοϋπερπλαστικά ή αυτοάνοσα νοσήματα και συνεπώς χαρακτηρίστηκαν ως "κοινές" (public) στερεότυπες BcR IG. Αντίθετα, στη HC-MBL ανιχνεύθηκε σαφώς μεγαλύτερη συχνότητα ειδικών για τη CLL στερεοτύπων BcR IGs, με 23.3% των περιπτώσεων να φέρουν ταυτόσημες BcR IGs είτε με άλλες περιπτώσεις HC-MBL είτε με περιπτώσεις CLL. Μάλιστα, αυτή η συχνότητα ήταν παρόμοια με την αντίστοιχη για τη CLL Rai-o (20.2%). Συνολικά, παρατηρήθηκε βαθμιαία αύξηση της συχνότητας στερεοτυπίας που ακολουθεί την αύξηση του απόλυτου αριθμού των κλωνικών B κυττάρων, ξεκινώντας με 5.5% στη LC-MBL, αυξανόμενη σε 23.3-20.2% στη HC-MBL/CLL Rai-o και τελικά κορυφούμενη σε 30.4% στη CLL όλων των σταδίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η LC-MBL δεν αντιστοιχεί σε πραγματική προκαρκινική κατάσταση, αντίθετα μπορεί να αποτελεί επιφαινόμενο χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού ή ανοσολογικής γήρανσης. Από την άλλη μεριά, η HC-MBL παρουσιάζει μεγάλες ανοσογενετικές ομοιότητες με τη CLL-, και πιθανώς αντιστοιχεί σ' ένα πρωιμότερο στάδιο που χρειάζεται είτε επιπρόσθετες γενετικές βλάβες είτε απλά περισσότερο χρόνο για να ξεπεράσει το αριθμητικό -και όχι βιολογικό- κατώφλι των 5000 κλωνικών B κυττάρων/μL αίματος. Η αναγνώριση μοριακών δεικτών ικανών να προβλέψουν την εξέλιξη της HC-MBL/CLL Rai-o σε CLL που απαιτεί θεραπεία θα είχε ιδιαίτερη κλινική σημασία.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ανοσογενετικό προφίλ 169 ασθενών με CLL γάμμα ισοτύπου (G-CLL) σε σχέση με 1087 ασθενείς με κλασική CLL χωρίς εναλλαγή ισοτύπου (MD-CLL). Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV διέφερε σημαντικά μεταξύ G-CLL και MD-CLL, με υπερεκπροσώπηση των γονιδίων *IGHV4-34* και *IGHV4-39*, και υποεκπροσώπηση των γονιδίων *IGHV1-69*, *IGHV3-21*, *IGHV1-2* και *IGHV3-48*, αντιστοίχως. Η G-CLL περιλάμβανε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV σε σχέση με την MD-CLL. Αντίθετα, η MD-CLL περιλάμβανε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό περιπτώσεων με πλήρως αμετάλλακτα γονίδια IGHV (100% ταυτότητα με τη βλαστική σειρά) σε σχέση με τη G-CLL. Η αναζήτηση ειδικών για τη CLL στερεοτύπων BcR IGs αποκάλυψε πως η ακραία επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου της G-CLL οφείλεται στο γεγονός ότι σχεδόν το 1/3 των περιπτώσεων αφορά σε ασθενείς που κατατάσσονται σε τρία συγκεκριμένα στερεότυπα υποσύνολα: #4 και #16, που χρησιμοποιούν το γονίδιο *IGHV4-34* με SHMs, και #8, που χρησιμοποιεί το γονίδιο *IGHV4-39* σε πλήρως

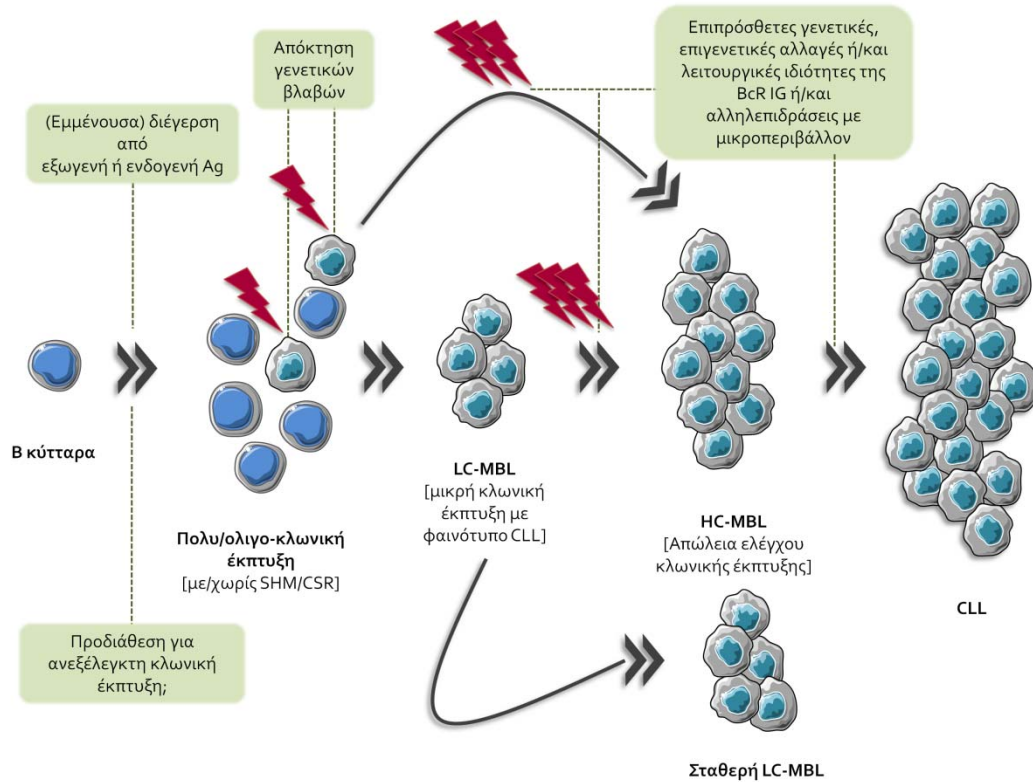
αμετάλλακτη μορφή (18.3%, 4%, και 7.3% της G-CLL, αντιστοίχως). Αυτά τα υποσύνολα, ιδίως το υποσύνολο #4 και το υποσύνολο #8, έχουν πολύ διαφορετική πρόγνωση, με τους ασθενείς του υποσυνόλου #4 να ακολουθούν εξαιρετικά ήπια κλινική πορεία και τους ασθενείς του υποσυνόλου #8 να εμφανίζουν ιδιαίτερα επιθετική νόσο που συχνά επιπλέκεται με εκτροπή σε λέμφωμα υψηλής κακοήθειας (σύνδρομο Richter). Σε σαφή αντίθεση με τα στερεότυπα υποσύνολα που χρησιμοποιούν τα γονίδια IGHV4-34 και IGHV4-39, όλα τα πολυπληθή στερεότυπα υποσύνολα που χρησιμοποιούν τα γονίδια IGHV1-69, IGHV3-21, IGHV1-2 και IGHV3-48 παρατηρήθηκαν αποκλειστικά στην MD-CLL. Η G-CLL χαρακτηρίζεται από ειδική ανοσογενετική υπογραφή σε σχέση με την MD-CLL, ακόμη και όταν η σύγκριση περιοριστεί σε περιπτώσεις με μεταλλαγμένες BcR IGs. Αυτό το γεγονός υπαινίσσεται διαφορετική οντογενετική προέλευση ή/και άνοση διέγερση της G-CLL συγκριτικά με την κοινή IgM/D ποικιλία και υποκινεί ερωτήματα σχετικά με τη χρονική ακολουθία εναλλαγής ισοτύπου και κακοήθους εξαλλαγής.²¹ Σε κάθε περίπτωση, η υποδειγματική περίπτωση του στερεότυπου υποσυνόλου #8 δείχνει πως οι διεργασίες CSR και SHM μπορεί να συμβαίνουν ανεξάρτητα στη CLL.

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη τον κρίσιμο ρόλο που φαίνεται να παίζει το αντιγόνο(-α) στη φυσική ιστορία του CLL κλώνου, διερευνήσαμε τις άνοσες επιδράσεις που διαμορφώνουν το ρεπερτόριο των T λεμφοκυττάρων στη CLL. Η αρχική, προκαταρκτική προσέγγιση αφορούσε χαρακτηρισμό του T ρεπερτορίου με μεθόδους κλασικής υποκλωνοποίησης και αλληλούχησης κατά Sanger. Αναλύθηκαν 58 ασθενείς με CLL που επιλέχθηκαν κυρίως με βάση την κατάταξή τους σε γνωστά, καλά χαρακτηρισμένα στερεότυπα υποσύνολα της CLL (υποσύνολα #1, #2 και #4), με το σκεπτικό ότι η στερεοτυπία αποτελεί την πιο ισχυρή ένδειξη επιλογής του CLL κλώνου από αντιγόνο. Η μελέτη ανέδειξε επιλεκτικότητα και ολιγοκλωνικότητα του T ρεπερτορίου στη CLL, καθώς και κοινούς T κλωνοτύπους μεταξύ διαφορετικών ασθενών, ένδειξη επιλογής από κοινό αντιγόνο. Ωστόσο, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, παρότι καθιερωμένες, αποδίδουν χαμηλής κλίμακας ανάλυση ρεπερτορίων που δεν είναι αμιγώς μονοκλωνικά, γεγονός που εμπόδιζε την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων.

Έτσι, επιχειρήσαμε να εμβαθύνουμε την ανάλυσή μας αξιοποιώντας τεχνικές μαζικής αλληλούχησης νέας γενιάς (next-generation sequencing) προκειμένου να χαρτογραφήσουμε ενδελεχώς το ρεπερτόριο των T λεμφοκυττάρων στη CLL. Επειδή η αλληλούχηση προϊόντων PCR με NGS αποτελεί καινοτόμο τεχνική στον τομέα της ανοσογενετικής με συγκεκριμένους περιορισμούς και εγγενείς αδυναμίες, επιλέξαμε μια συστηματική, αυστηρή προσέγγιση συμπεριλαμβάνοντας πολλών ειδών εσωτερικά και εξωτερικά controls, και αναπτύξαμε εξειδικευμένα βιοπληροφορικά εργαλεία για τη διαχείριση, τον ποιοτικό έλεγχο και την ερμηνεία των παραγόμενων δεδομένων. Συνολικά αναλύθηκαν 32 ασθενείς με CLL. Συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που κατατάσσονταν σε στερεότυπα υποσύνολα (υποσύνολα #1, #2 και #4), αλλά και ασθενείς με ετερογενείς BcR IG (μεταλλαγμένες ή αμετάλλακτες), ώστε να διαπιστώσουμε ανοσογενετικά χαρακτηριστικά του T ρεπερτορίου που είναι κοινά για όλη τη CLL.

Η μελέτη επιβεβαιώνει την επιλεκτικότητα του T ρεπερτορίου στη CLL, με ευρήματα ολιγοκλωνικότητας που έρχονται σε αντίθεση με το πολυκλωνικό προφίλ υγιών μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας και παραπέμπουν σε επιλογή των T λεμφοκυττάρων από αντιγόνο(-α). Η ανάλυση διαχρονικών δειγμάτων έδειξε ότι ο αντιγονικός ερεθισμός παραμένει στο χρόνο, οδηγώντας τους αντίστοιχους T-κυτταρικούς κλώνους σε

περαιτέρω έκπτυξη. Εξάλλου, η διαπίστωση κοινών T κλωνοτύπων μεταξύ ασθενών, ιδίως αυτών που κατατάσσονται στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο, αναδεικνύει μοριακές υπογραφές ειδικές για τη CLL, με προεκτάσεις για τη διερεύνηση μηχανισμών άρσης της ανοχής των T λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 27. Ένα κοινό παθογενετικό σενάριο για την οντογένεση της CLL.

Πώς συνοψίζονται όλα τα παραπάνω σ' ένα κοινό παθογενετικό σενάριο για τη CLL; Σίγουρα υπάρχουν πολλά σημεία της οντογένεσης της νόσου που παραμένουν σκοτεινά ή αμφιλεγόμενα. Θα μπορούσαμε όμως να υποθέσουμε ότι σε μια προνεοπλασματική φάση, B κύτταρα με ή χωρίς γενετική προδιάθεση για ανεξέλεγκτο κλωνικό πολλαπλασιασμό δέχονται εμμένοντα αντιγονικό ερεθισμό, είτε από εξωγενή είτε από ενδογενή αντιγόνα, και οδηγούνται σε ολιγο- ή πολυκλωνική έκπτυξη. Στα πλαίσια αυτά, μπορεί να υποβάλλονται σε SHM/CSR ανάλογα με την προέλευσή τους (κλασικά B2 κύτταρα, B1 κύτταρα, B κύτταρα οριακής ζώνης;) ή/και ανάλογα με τη φύση της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο, ενώ κατά τον κλωνικό πολλαπλασιασμό τους ίσως αποκτούν γενετικές βλάβες που σχετίζονται με το φαινότυπο της CLL. Έτσι, μπορεί να προκύψει η LC-MBL, που παραμένει σταθερή στο χρόνο, εκτός αν επιπρόσθετες γενετικές/επιγενετικές αλλαγές ή οι ίδιες οι λειτουργικές ιδιότητες της BcR IG (π.χ. πολυαντιδραστικότητα ή/και ικανότητα ομότυπων αλληλεπιδράσεων για αυτόνομη σηματοδότηση μέσω του BcR) οδηγήσουν γρήγορα στη φάση της HC-MBL, η οποία εμφανίζει κακώθες δυναμικό και, με το πέρασμα του χρόνου και εφόσον επιδράσουν κατάλληλα σήματα μέσω του BcR ή/και από το μικροπεριβάλλον, θα μεταπέσει σε CLL που απαιτεί θεραπεία (**Εικόνα 27**).

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia in the Western world. It is an incurable disease, yet very heterogeneous in terms of clinical course and outcome, most probably reflecting underlying biological heterogeneity. Over the last decades, it became obvious that CLL is subdivided in categories with distinct biological characteristics, regarding both the genomic and epigenetic profile (however without certain defects being detected in a large proportion of patients), as well as structural and signaling features of the clonotypic B-cell receptor immunoglobulin (BcR IG)²⁴⁷.

Immunogenetic analysis of the clonotypic BcR IG has proved to be instrumental, not only for understanding the pathogenesis of CLL but also for defining clinical subgroups with strikingly different behavior and outcome. That said, the full potential of the IG molecule was not immediately realized, rather initial studies⁶²⁻⁶⁴ set in action a train of events culminating with the current notion that CLL is an antigen-driven disease^{74,76,100}. Nowadays, the successful development of drugs targeting the BcR signaling pathway is revolutionizing CLL therapeutics^{214,216}.

Besides BcR signaling, CLL clones appear to actively interact with their microenvironment, receiving prosurvival and proliferation signals while at the same time efficiently escaping immune surveillance^{217,219}. Immunomodulatory drugs acting at the level of the immune synapse between clonal B cells and their cognate T cells are currently being tested in clinical trials with promising results^{218,231}.

The immunogenetic approach of CLL pathogenesis needs to be able to also explain the existence of CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). The term describes the presence of a clonal B cell expansion with CLL immunophenotype in the peripheral blood, at a size that does not reach the consensus cut-off for CLL diagnosis (i.e. <5000 clonal B cells/ μ L). The incidence of CLL-like MBL in the general population is ~10% and rises even further with age, or when more sophisticated flow cytometry protocols are applied. It is generally perceived as a premalignant condition of CLL, as it progresses to CLL requiring treatment at a 1-2%/year rate¹⁵⁴. However, if MBL cells are CLL progenitors, why don't all MBL progress to CLL?

We investigated CLL ontogenesis from an immunogenetic point of view, at three separate directions: (i) BcR IG immunoprofiling in MBL and comparison to CLL (especially early-stage disease), (ii) BcR IG immunoprofiling of IG-switched CLL in order to examine its ontogenetic relation to the common IgM/IgD variant, and, (iii) T-cell receptor (TR) immunoprofiling in order to gain insight into the possible role of antigen in the selection and activation of cognate T cells.

We performed a detailed immunogenetic profiling of 333 CLL-like MBL cases (60 LC and 273 HC). Low-count (LC) and high-count (HC) MBL had distinct IG gene repertoires, whereas the HC-MBL IG gene repertoire exhibited clear similarities to early-stage CLL (CLL Rai stage o, CLL-o). Furthermore, we sought for the expression of stereotyped BcR IG through a cluster

analysis of the MBL sequences together with all CLL sequences from our cohort and non-CLL IG sequences retrieved from the IMGT/LIGM-DB sequence database. Overall, only 5.5% LC-MBL rearrangements could be clustered with other sequences. In contrast, HC-MBL included a significantly higher frequency of 'CLL-specific' BcR stereotypes, with 23.3% of cases clustering together with either MBL or CLL cases. This frequency was similar to that observed in CLL-o (20.2%). Collectively, the frequency of BcR IG stereotypy seemed to increase in parallel with the absolute count of CLL-like cells, starting with 5.5% in LC-MBL, raising to 23.3-20.2% in in HC MBL/CLL-o and peaking at 30.4% in the entire CLL cohort. Overall, these findings suggest that LC-MBL is not a true premalignant condition, but rather the result of chronic antigenic stimulation or immune senescence. In contrast, HC-MBL is just a step behind early-stage CLL, requiring either additional genetic hits or simply time to cross the numerical cut-off that discriminates it from CLL. Therefore, the identification of molecular biomarkers that may predict progression of HC MBL/CLL-o into CLL requiring treatment is strongly warranted.

Next, we performed a comprehensive immunogenetic comparison of 169 IgG-switched CLL patients (G-CLL) versus 1087 IgM/IgD CLL patients (classic MD-variant, MD-CLL). The IG gene repertoire was significantly different among G-CLL and MD-CLL, with overrepresentation of the *IGHV4-34* and *IGHV4-39* genes and underrepresentation of the *IGHV1-69*, *IGHV3-21*, *IGHV1-2* and *IGHV3-48* genes, respectively. G-CLL included significantly more cases with mutated IGHV genes compared to MD-CLL, and significantly more MD-CLL cases carried BcR IGs with no SHM compared to G-CLL. The extreme skewing of the G-CLL repertoire merely reflected the fact that almost one-third of all cases concerned three CLL subsets: mutated stereotyped subsets #4 and #16 utilizing the *IGHV4-34* gene, and truly unmutated subset #8, utilizing the *IGHV4-39* gene (18.3%, 4%, and 7.3% of all G-CLL, respectively). These subsets, especially subsets #4 and #8, are polar opposites in terms of prognosis, with subset #4 cases exhibiting particularly indolent disease whereas subset #8 cases experience an aggressive disease course often complicated by Richter's syndrome. In clear contrast to these 3 subsets utilizing the *IGHV4-34* and *IGHV4-39* genes, all major CLL subsets utilizing the *IGHV1-69*, *IGHV3-21*, *IGHV1-2* and *IGHV3-48* genes were exclusively represented in MD-CLL. Even when restricting the comparison solely to cases with mutated BcR IGs, G-CLL still exhibits an overall distinct immunogenetic profile from MD-CLL, thus prompting speculations about distinct cell of origin and/or distinct immune triggering and raising questions regarding the timing of CSR in regards to malignant transformation²¹. That said, the paradigmatic case of truly unmutated, G-switched subset #8 suggests that CSR and SHM may occur independently in CLL.

Finally, considering the critical role of antigenic stimulation in CLL pathogenesis, we sought to gain insight into the immune pathways shaping the T-cell repertoire in CLL. Our preliminary approach entailed classic subcloning techniques, followed by Sanger sequencing. We analysed 58 CLL patients, selected upon their clonotypic BcR IG molecular characteristics so as to represent major stereotyped CLL subsets (namely subsets #1, #2, and #4), where the CLL clone is most evidently selected by antigen. Our study revealed skewed TR repertoire and oligoclonality. Moreover, we identified common T-cell clonotypes among different patients, alluding to selection by a shared antigenic elements. However, low-throughput methods such as classic subcloning, despite widely used, are

inherently limited in describing other than monoclonal immune repertoires, thus precluding definite conclusions.

Therefore, we aimed to advance our analytical depth by employing high-throughput, next-generation sequencing techniques, in order to obtain a comprehensive profile of the T-cell repertoire in CLL. Considering PCR-based NGS limitations, we followed a strict experimental approach including multiple types of controls, and we developed in-house, purpose-built bioinformatics tools for the management, curation and interpretation of the produced (big) data. In total, 32 CLL patients were analyzed. Again, we focused on patients assigned to major stereotyped subsets (namely subsets #1, #2, and #4), but we also included patients expressing heterogeneous clonotypic BcR IGs (mutated and unmutated), in order to seek for T-cell immunogenetic signatures that may be ubiquitous in CLL. The study confirmed TR repertoire skewing, with oligoclonality that came in sharp contrast to the polyclonal profile of age-matched healthy controls, alluding to antigenic selection. Longitudinal analysis showed that T-cell clones persist and expand over time, suggesting a persistent antigenic drive. Moreover, the identification of shared clonotypes among different patients, most specially patients assigned to the same stereotyped subset, indicates common antigenic stimulation, perhaps in a CLL subset-specific context.

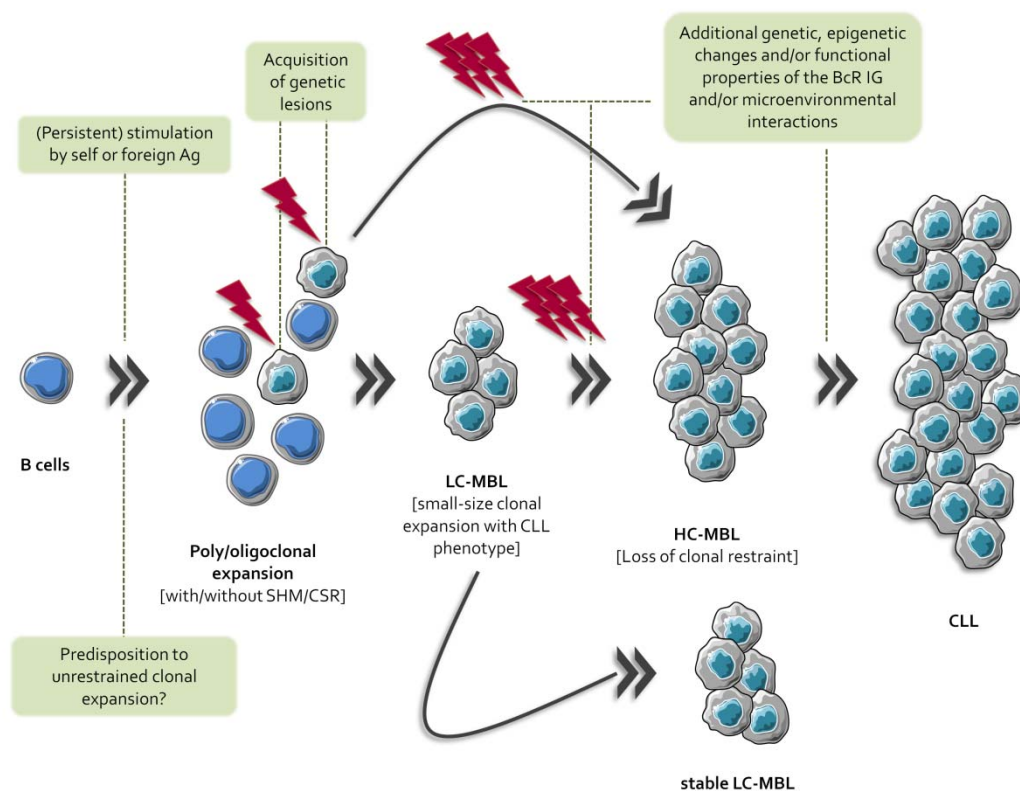


Figure 27. A common scenario for CLL ontogenesis.

How could all these pieces of information contribute in a plausible scenario for CLL ontogenesis? There is no doubt that many aspects of disease pathogenesis remain elusive or debatable. However, we could postulate that, in a premalignant phase, B cells with or without genetic predisposition for unrestrained clonal expansion are subjected to persistent

stimulation by exogenous or endogenous antigens and are driven to oligo/polyclonal expansion. In this context, they may undergo SHM/CSR depending on their origin (B₂, B₁, marginal zone B cells?) and/or the nature of antigenic triggering, and while they proliferate, they may acquire genetic lesions that translate to aberrant (i.e. CLL) phenotype. Thereby they enter the LC-MBL state, which remains stable over time unless further genetic/epigenetic hits and/or the functional properties of the clonotypic BcR IG (e.g. polyreactivity or capability of autonomous cell signaling through homotypic BcR interactions) lead to HC-MBL, which, given time and appropriate microenvironmental signals will progress to CLL requiring treatment (**Figure 27**).

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη LC και HC-MBL						
Γονίδιο IGHV	LC-MBL		HC-MBL		MBL-σύνολο	
	n	%	n	%	n	%
IGHV1-18	1	1.39	2	0.71	3	0.85
IGHV1-2	2	2.78	10	3.53	12	3.38
IGHV1-3	0	0.00	8	2.83	8	2.25
IGHV1-46	0	0.00	2	0.71	2	0.56
IGHV1-69	2	2.78	22	7.77	24	6.76
IGHV1-8	1	1.39	7	2.47	8	2.25
IGHV2-26	1	1.39	2	0.71	3	0.85
IGHV2-5	2	2.78	15	5.30	17	4.79
IGHV2-70	0	0.00	1	0.35	1	0.28
IGHV3-7	7	9.72	23	8.13	30	8.45
IGHV3-9	0	0.00	4	1.41	4	1.13
IGHV3-11	0	0.00	5	1.77	5	1.41
IGHV3-13	0	0.00	1	0.35	1	0.28
IGHV3-15	4	5.56	10	3.53	14	3.94
IGHV3-21	3	4.17	10	3.53	13	3.66
IGHV3-23	5	6.94	26	9.19	31	8.73
IGHV3-30	4	5.56	14	4.95	18	5.07
IGHV3-30-3	0	0.00	2	0.71	2	0.56
IGHV3-33	0	0.00	10	3.53	10	2.82
IGHV3-43	0	0.00	1	0.35	1	0.28
IGHV3-48	3	4.17	12	4.24	15	4.23
IGHV3-49	1	1.39	5	1.77	6	1.69
IGHV3-53	2	2.78	2	0.71	4	1.13
IGHV3-64	4	5.56	2	0.71	6	1.69
IGHV3-66	1	1.39	3	1.06	4	1.13
IGHV3-72	0	0.00	1	0.35	1	0.28
IGHV3-73	0	0.00	1	0.35	1	0.28
IGHV3-74	0	0.00	9	3.18	9	2.54
IGHV4-30-2	1	1.39	1	0.35	2	0.56
IGHV4-30-4	2	2.78	1	0.35	3	0.85
IGHV4-31	1	1.39	3	1.06	4	1.13
IGHV4-34	6	8.33	36	12.72	42	11.83
IGHV4-39	1	1.39	7	2.47	8	2.25
IGHV4-4	1	1.39	3	1.06	4	1.13
IGHV4-59	11	15.28	8	2.83	19	5.35
IGHV4-61	2	2.78	3	1.06	5	1.41
IGHV5-51	1	1.39	4	1.41	5	1.41
IGHV5-a	2	2.78	0	0.00	2	0.56
IGHV6-1	1	1.39	7	2.47	8	2.25
Σύνολο	72	100.00	283	100.00	355	100.00

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD στη LC και HC-MBL						
Γονίδιο IGHD	LC-MBL		HC-MBL		MBL-σύνολο	
	n	%	n	%	n	%
IGHD1-1	1	1.39	4	1.43	5	1.42
IGHD1-14	0	0.00	2	0.72	2	0.57
IGHD1-20	2	2.78	2	0.72	4	1.14
IGHD1-26	4	5.56	15	5.38	19	5.41
IGHD1-7	0	0.00	5	1.79	5	1.42
IGHD2-15	4	5.56	17	6.09	21	5.98
IGHD2-2	8	11.11	21	7.53	29	8.26
IGHD2-21	4	5.56	13	4.66	17	4.84
IGHD2-8	0	0.00	3	1.08	3	0.85
IGHD3-10	6	8.33	25	8.96	31	8.83
IGHD3-16	1	1.39	11	3.94	12	3.42
IGHD3-22	9	12.50	24	8.60	33	9.40
IGHD3-3	5	6.94	28	10.04	33	9.40
IGHD3-9	5	6.94	13	4.66	18	5.13
IGHD4-11	2	2.78	5	1.79	7	1.99
IGHD4-17	3	4.17	7	2.51	10	2.85
IGHD4-23	1	1.39	9	3.23	10	2.85
IGHD5-12	3	4.17	8	2.87	11	3.13
IGHD5-18	1	1.39	12	4.30	13	3.70
IGHD5-24	6	8.33	11	3.94	17	4.84
IGHD6-13	2	2.78	12	4.30	14	3.99
IGHD6-19	4	5.56	19	6.81	23	6.55
IGHD6-25	0	0.00	2	0.72	2	0.57
IGHD6-6	0	0.00	9	3.23	9	2.56
IGHD7-27	1	1.39	2	0.72	3	0.85
Σύνολο	72	100.00	279	100.00	351	100.00

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHJ στη LC και HC-MBL						
Γονίδιο IGHJ	LC-MBL		HC-MBL		MBL-σύνολο	
	n	%	n	%	n	%
IGHJ1	1	1.39	4	1.42	5	1.41
IGHJ2	8	11.11	3	1.06	11	3.11
IGHJ3	11	15.28	32	11.35	43	12.15
IGHJ4	32	44.44	123	43.62	155	43.79
IGHJ5	11	15.28	38	13.48	49	13.84
IGHJ6	9	12.50	82	29.08	91	25.71
Σύνολο	72	100.00	282	100.00	354	100.00

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Μήκος VH CDR ₃ (αμινοξέα) στη LC και HC-MBL						
VH CDR ₃ aa	LC-MBL		HC-MBL		MBL-σύνολο	
	n	%	n	%	n	%
<6	0	0.00	0	0.00	0	0.00
6	0	0.00	2	0.71	2	0.56
7	0	0.00	3	1.06	3	0.85
8	1	1.39	4	1.41	5	1.41
9	2	2.78	14	4.95	16	4.51
10	3	4.17	7	2.47	10	2.82
11	1	1.39	10	3.53	11	3.10
12	3	4.17	10	3.53	13	3.66
13	7	9.72	26	9.19	33	9.30
14	10	13.89	26	9.19	36	10.14
15	5	6.94	24	8.48	29	8.17
16	3	4.17	25	8.83	28	7.89
17	4	5.56	30	10.60	34	9.58
18	9	12.50	20	7.07	29	8.17
19	8	11.11	23	8.13	31	8.73
20	11	15.28	17	6.01	28	7.89
21	2	2.78	6	2.12	8	2.25
22	0	0.00	12	4.24	12	3.38
23	2	2.78	13	4.59	15	4.23
24	0	0.00	4	1.41	4	1.13
25	0	0.00	5	1.77	5	1.41
26	0	0.00	1	0.35	1	0.28
27	0	0.00	1	0.35	1	0.28
28	0	0.00	0	0.00	0	0.00
29	1	1.39	0	0.00	1	0.28
>29	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Σύνολο	72	100.00	283	100.00	355	100.00

Συμπληρωματικός Πίνακας 5. Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV σε όλες τις ομάδες										
Γονίδιο IGHV	LC-MBL		HC-MBL		MBL-σύνολο		RAI ο CLL		CLL-σύνολο	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IGHV1-18	1	1.39	2	0.71	3	0.85	9	1.65	109	1.43
IGHV1-2	2	2.78	10	3.53	12	3.38	25	4.60	348	4.58
IGHV1-24	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	26	0.34
IGHV1-3	0	0.00	8	2.83	8	2.25	6	1.10	158	2.08
IGHV1-45	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.03
IGHV1-46	0	0.00	2	0.71	2	0.56	6	1.10	96	1.26
IGHV1-58	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	18	0.24
IGHV1-69	2	2.78	22	7.77	24	6.76	30	5.51	973	12.81
IGHV1-8	1	1.39	7	2.47	8	2.25	8	1.47	77	1.01
IGHV2-26	1	1.39	2	0.71	3	0.85	1	0.18	24	0.32
IGHV2-5	2	2.78	15	5.30	17	4.79	10	1.84	205	2.7
IGHV2-70	0	0.00	1	0.35	1	0.28	1	0.18	26	0.34
IGHV3-7	7	9.72	23	8.13	30	8.45	54	9.93	435	5.73
IGHV3-9	0	0.00	4	1.41	4	1.13	5	0.92	135	1.78
IGHV3-11	0	0.00	5	1.77	5	1.41	4	0.74	191	2.51
IGHV3-13	0	0.00	1	0.35	1	0.28	1	0.18	25	0.33
IGHV3-15	4	5.56	10	3.53	14	3.94	18	3.31	191	2.51
IGHV3-19	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01
IGHV3-20	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.37	31	0.41
IGHV3-21	3	4.17	10	3.53	13	3.66	14	2.57	356	4.69
IGHV3-23	5	6.94	26	9.19	31	8.73	52	9.56	647	8.52
IGHV3-30	4	5.56	14	4.95	18	5.07	46	8.46	416	5.48
IGHV3-30-3	0	0.00	2	0.71	2	0.56	8	1.47	104	1.37
IGHV3-33	0	0.00	10	3.53	10	2.82	17	3.12	222	2.92
IGHV3-43	0	0.00	1	0.35	1	0.28	2	0.37	25	0.33
IGHV3-48	3	4.17	12	4.24	15	4.23	19	3.49	295	3.88
IGHV3-49	1	1.39	5	1.77	6	1.69	10	1.84	76	1
IGHV3-53	2	2.78	2	0.71	4	1.13	9	1.65	112	1.47
IGHV3-64	4	5.56	2	0.71	6	1.69	2	0.37	49	0.65
IGHV3-66	1	1.39	3	1.06	4	1.13	3	0.55	57	0.75
IGHV3-72	0	0.00	1	0.35	1	0.28	6	1.10	86	1.13
IGHV3-73	0	0.00	1	0.35	1	0.28	3	0.55	27	0.36
IGHV3-74	0	0.00	9	3.18	9	2.54	10	1.84	177	2.33
IGHV4-30-2	1	1.39	1	0.35	2	0.56	0	0.00	13	0.17
IGHV4-30-4	2	2.78	1	0.35	3	0.85	4	0.74	48	0.63
IGHV4-31	1	1.39	3	1.06	4	1.13	5	0.92	59	0.78
IGHV4-34	6	8.33	36	12.72	42	11.83	60	11.03	673	8.86
IGHV4-39	1	1.39	7	2.47	8	2.25	20	3.68	283	3.73
IGHV4-4	1	1.39	3	1.06	4	1.13	17	3.12	124	1.63
IGHV4-59	11	15.28	8	2.83	19	5.35	18	3.31	209	2.75
IGHV4-61	2	2.78	3	1.06	5	1.41	8	1.47	90	1.18
IGHV4-b	0	0.00	0	0.00	0	0.00	6	1.10	68	0.9
IGHV5-51	1	1.39	4	1.41	5	1.41	17	3.12	149	1.96
IGHV5-a	2	2.78	0	0.00	2	0.56	1	0.18	43	0.57
IGHV6-1	1	1.39	7	2.47	8	2.25	7	1.29	88	1.16
IGHV7-4-1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	29	0.38
Σύνολο	72	100.00	283	100.0	355	100.00	544	100.00	7596	100

Συμπληρωματικός Πίνακας 6. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV.

TRBV	σύνολο κλωνοτύπων		εκπτυγμένοι κλωνοτύποι		μονήρεις κλωνοτύποι	
	No	%	No	%	No	%
TRBV19	108	10.96	17	8.37	91	11.64
TRBV27	80	8.12	21	10.34	59	7.54
TRBV12-3	75	7.61	20	9.85	55	7.03
TRBV7-9	69	7.01	15	7.39	54	6.91
TRBV6-5	63	6.40	11	5.42	52	6.65
TRBV20-1	54	5.48	8	3.94	46	5.88
TRBV2	50	5.08	12	5.91	38	4.86
TRBV28	49	4.97	12	5.91	37	4.73
TRBV7-8	45	4.57	10	4.93	35	4.48
TRBV10-3	40	4.06	10	4.93	30	3.84
TRBV7-2	39	3.96	5	2.46	34	4.35
TRBV6-2	39	3.96	11	5.42	28	3.58
TRBV6-1	37	3.76	6	2.96	31	3.96
TRBV5-1	33	3.35	3	1.48	30	3.84
TRBV6-6	26	2.64	6	2.96	20	2.56
TRBV29-1	21	2.13	5	2.46	16	2.05
TRBV24-1	21	2.13	7	3.45	14	1.79
TRBV11-2	17	1.73	1	0.49	16	2.05
TRBV14	16	1.62	1	0.49	15	1.92
TRBV15	14	1.42	4	1.97	10	1.28
TRBV30	12	1.22	4	1.97	8	1.02
TRBV7-6	11	1.12	3	1.48	8	1.02
TRBV12-5	10	1.02	1	0.49	9	1.15
TRBV5-6	7	0.71	1	0.49	6	0.77
TRBV5-4	7	0.71	1	0.49	6	0.77
TRBV10-2	6	0.61	2	0.99	4	0.51
TRBV7-3	4	0.41	1	0.49	3	0.38
TRBV6-4	4	0.41	0	0.00	4	0.51
TRBV5-5	4	0.41	0	0.00	4	0.51
TRBV21-1	4	0.41	1	0.49	3	0.38
TRBV18	4	0.41	0	0.00	4	0.51
TRBV7-7	3	0.30	0	0.00	3	0.38
TRBV4-2	3	0.30	1	0.49	2	0.26
TRBV13	3	0.30	2	0.99	1	0.13
TRBV11-1	3	0.30	0	0.00	3	0.38
TRBV9	1	0.10	1	0.49	0	0.00
TRBV4-1	1	0.10	0	0.00	1	0.13
TRBV25-1	1	0.10	0	0.00	1	0.13
TRBV10-1	1	0.10	0	0.00	1	0.13
σύνολο	985		203		782	

Συμπληρωματικός Πίνακας 7. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBJ.

TRBJ	σύνολο κλωνοτύπων		εκπτυγμένοι κλωνοτύποι		μονήρεις κλωνοτύποι	
	No	%	No	%	No	%
TRBJ1-2	215	21.83	46	22.66	169	21.61
TRBJ1-5	209	21.22	42	20.69	167	21.36
TRBJ2-2	165	16.75	37	18.23	128	16.37
TRBJ1-6	93	9.44	19	9.36	74	9.46
TRBJ1-4	64	6.50	9	4.43	55	7.03
TRBJ2-6	57	5.79	18	8.87	39	4.99
TRBJ2-7	56	5.69	11	5.42	45	5.75
TRBJ1-3	51	5.18	14	6.90	37	4.73
TRBJ1-1	29	2.94	0	0.00	29	3.71
TRBJ2-3	26	2.64	3	1.48	23	2.94
TRBJ2-1	16	1.62	3	1.48	13	1.66
TRBJ2-5	4	0.41	1	0.49	3	0.38
Σύνολο	985		203		782	

Συμπληρωματικός Πίνακας 8. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV ανά ομάδα μελέτης.

TRBV	Μη στερεότυποι		TRBV	Υποσύνολο #1		TRBV	Υποσύνολο #2		TRBV	Υποσύνολο #4	
	No	%		No	%		No	%		No	%
TRBV27	21	22.58	TRBV27	21	8.40	TRBV12-3	26	11.21	TRBV19	55	13.41
TRBV6-5	12	12.90	TRBV19	21	8.40	TRBV7-9	26	11.21	TRBV6-5	37	9.02
TRBV28	9	9.68	TRBV28	16	6.40	TRBV19	24	10.34	TRBV12-3	30	7.32
TRBV19	8	8.60	TRBV12-3	16	6.40	TRBV20-1	22	9.48	TRBV27	28	6.83
TRBV24-1	8	8.60	TRBV7-2	15	6.00	TRBV7-8	18	7.76	TRBV7-9	27	6.59
TRBV10-3	6	6.45	TRBV7-8	15	6.00	TRBV2	11	4.74	TRBV2	24	5.85
TRBV2	5	5.38	TRBV6-1	14	5.60	TRBV27	10	4.31	TRBV10-3	21	5.12
TRBV6-2	5	5.38	TRBV5-1	14	5.60	TRBV5-1	10	4.31	TRBV20-1	21	5.12
TRBV6-6	4	4.30	TRBV7-9	13	5.20	TRBV28	9	3.88	TRBV6-1	19	4.63
TRBV12-3	3	3.23	TRBV6-2	12	4.80	TRBV14	9	3.88	TRBV7-2	16	3.90
TRBV6-1	3	3.23	TRBV6-5	10	4.00	TRBV11-2	8	3.45	TRBV28	15	3.66
TRBV7-9	3	3.23	TRBV2	10	4.00	TRBV7-2	8	3.45	TRBV6-2	15	3.66
TRBV20-1	2	2.15	TRBV20-1	9	3.60	TRBV6-2	7	3.02	TRBV29-1	12	2.93
TRBV15	1	1.08	TRBV10-3	8	3.20	TRBV7-6	7	3.02	TRBV7-8	12	2.93
TRBV21-1	1	1.08	TRBV6-6	8	3.20	TRBV10-3	5	2.16	TRBV6-6	10	2.44
TRBV30	1	1.08	TRBV11-2	5	2.00	TRBV6-5	4	1.72	TRBV15	10	2.44
TRBV5-4	1	1.08	TRBV29-1	5	2.00	TRBV6-6	4	1.72	TRBV5-1	9	2.20
TRBV10-1	0	0.00	TRBV24-1	4	1.60	TRBV29-1	4	1.72	TRBV30	7	1.71
TRBV10-2	0	0.00	TRBV30	4	1.60	TRBV24-1	3	1.29	TRBV24-1	6	1.46
TRBV11-1	0	0.00	TRBV12-5	4	1.60	TRBV11-1	3	1.29	TRBV12-5	6	1.46
TRBV11-2	0	0.00	TRBV14	4	1.60	TRBV10-2	2	0.86	TRBV11-2	4	0.98
TRBV12-5	0	0.00	TRBV7-6	3	1.20	TRBV5-6	2	0.86	TRBV5-5	4	0.98
TRBV13	0	0.00	TRBV15	2	0.80	TRBV7-3	2	0.86	TRBV5-4	3	0.73
TRBV14	0	0.00	TRBV5-4	2	0.80	TRBV7-7	2	0.86	TRBV14	3	0.73
TRBV18	0	0.00	TRBV10-2	2	0.80	TRBV6-1	1	0.43	TRBV5-6	3	0.73
TRBV25-1	0	0.00	TRBV13	2	0.80	TRBV15	1	0.43	TRBV21-1	2	0.49
TRBV29-1	0	0.00	TRBV18	2	0.80	TRBV5-4	1	0.43	TRBV10-2	2	0.49
TRBV4-1	0	0.00	TRBV5-6	2	0.80	TRBV25-1	1	0.43	TRBV18	2	0.49
TRBV4-2	0	0.00	TRBV7-3	2	0.80	TRBV4-1	1	0.43	TRBV4-2	2	0.49
TRBV5-1	0	0.00	TRBV21-1	1	0.40	TRBV6-4	1	0.43	TRBV6-4	2	0.49
TRBV5-5	0	0.00	TRBV10-1	1	0.40	TRBV21-1	0	0.00	TRBV13	1	0.24
TRBV5-6	0	0.00	TRBV4-2	1	0.40	TRBV30	0	0.00	TRBV7-6	1	0.24
TRBV6-4	0	0.00	TRBV6-4	1	0.40	TRBV10-1	0	0.00	TRBV9	1	0.24
TRBV7-2	0	0.00	TRBV7-7	1	0.40	TRBV12-5	0	0.00	TRBV10-1	0	0.00
TRBV7-3	0	0.00	TRBV11-1	0	0.00	TRBV13	0	0.00	TRBV11-1	0	0.00
TRBV7-6	0	0.00	TRBV25-1	0	0.00	TRBV18	0	0.00	TRBV25-1	0	0.00
TRBV7-7	0	0.00	TRBV4-1	0	0.00	TRBV4-2	0	0.00	TRBV4-1	0	0.00
TRBV7-8	0	0.00	TRBV5-5	0	0.00	TRBV5-5	0	0.00	TRBV7-3	0	0.00
TRBV9	0	0.00	TRBV9	0	0.00	TRBV9	0	0.00	TRBV7-7	0	0.00
	93			250			232			410	

Συμπληρωματικός Πίνακας 9. Τυποποίηση HLA για τους 8 ασθενείς με CLL που ανά ζεύγη μοιράζονταν έναν κοινό κλωνοτύπο, και των δύο υγιών μαρτύρων

Κωδικός δείγματος	Ζεύγος	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DRB1
1626	1	01	02	35	73	04	15	04:05	11:04
1939	1	02	23	27	49	02	07	01:01	11:01
1422	2	02	24	18	35	04	12	04:04	11:01
2920	2	02	32	38	57	07	12	04:03	13:03
Swe-1025	3	24	68	35		03	04	04:01	04:04
1812	3	03	32	35	51	04	16	01:01	04:02
Swe-1065	4	02	24	15	39	03	07	04:04	16:01
3870	4	01	03	44	57	05	06	04:02	16:01
21671	Υγιής	24	30	08	35	04	07	03:01	11:03
22014	Υγιής	01	24	07	18	07	12	11:04	15:01

Με κόκκινο: Κοινά HLA μεταξύ ζευγών ασθενών με κοινούς κλωνοτύπους

Με κόκκινο και έντονα γράμματα (bold): Κοινά HLA μεταξύ matches ζευγών ασθενών με κοινούς κλωνοτύπους ΚΑΙ υγιών μαρτύρων

Με μπλε: Κοινά HLA μεταξύ ασθενών με CLL και υγιών μαρτύρων

Συμπληρωματικός Πίνακας 10. Παρόμοιοι κλωνότυποι (>85% αμινοξική ταυτότητα) μεταξύ ασθενών με CLL και δημόσιας βάσης δεδομένων.

LIGM/DB ID- Κωδικός ασθενούς	Υποσύνολο	TRBV	TRBJ	AA JUNCTION	Αμινοξική ταυτότητα
AB306157		TRBV28	TRBJ1-1	CASSDRTEAFF	90.91%
Swe_0960	2	TRBV7-9	TRBJ1-1	CASSDRTEAVF	
AJ230082		TRBV7-9	TRBJ1-6	CASSLEISPLHF	91.67%
Swe_0106	1	TRBV5-1	TRBJ1-6	CASSENSPLHF	
1626	4	TRBV19	TRBJ1-2	CASRGQASYGYTF	92.31%
AJ389999		TRBV10-1	TRBJ1-2	CASRGQSGYGYTF	
AF189512		TRBV27	TRBJ1-2	CASSLRGGYGYTF	92.31%
Swe_1006	1	TRBV27	TRBJ1-2	CASSLRGNYGYTF	
Swe_1035	4	TRBV7-9	TRBJ1-2	CASSLTGDYGYTF	92.31%
AJ437667		TRBV27	TRBJ1-2	CASSLTGGYGYTF	
AY751843		TRBV5-1	TRBJ1-1	CASSIAGSNTEAFF	85.71%
Swe_0106	1	TRBV19	TRBJ1-1	CASSIAPPNTEAFF	
AJ230042		TRBV7-3	TRBJ1-1	CASSSQGDNTEAFF	85.71%
Swe_0166	2	TRBV5-6	TRBJ1-1	CASSSRGPNTEAFF	
AF043841		TRBV12-3	TRBJ1-2	CASSPTGGGYGYTF	85.71%
Swe_0568	2	TRBV12-3	TRBJ1-2	CASSPTGQSYGYTF	
S64084		TRBV5-6	TRBJ1-2	CASSVTDGSYGYTF	85.71%
Swe_0167	1	TRBV19	TRBJ1-2	CASSVTGPSYGYTF	
AJ305420		TRBV12-3	TRBJ2-3	CASSLAGIGDTQYF	85.71%
Swe_0090	2	TRBV7-9	TRBJ2-3	CASSLAGVTDQYF	
3916	4	TRBV18	TRBJ2-6	CASSPMAGANVLTFF	85.71%
AB305839		TRBV19	TRBJ2-6	CASSTGAGANVLTFF	
Swe_0456	1	TRBV7-9	TRBJ1-5	CASSLDGIPNQPQHF	86.67%
AB305886		TRBV27	TRBJ1-5	CASSLDGLTNQPQHF	
AJ230097		TRBV5-1	TRBJ1-5	CASSLGGTGNQPQHF	86.67%
Swe_0712	2	TRBV7-9	TRBJ1-5	CASSLGGYSNQPQHF	
AF189456		TRBV7-2	TRBJ1-5	CASSLRTGGDQPQHF	86.67%
Swe_0106	1	TRBV27	TRBJ1-5	CASSLSTGGGQPQHF	
P8204	4	TRBV29	TRBJ2-2	CSVARDRATGELFF	85.71%
CIN_40		TRBV29	TRBJ2-2	CSVARDANTGELFF	

Συμπληρωματικός Πίνακας 11. Ανοσογενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών με CLL που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Κωδικός ασθενούς	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ	IGHV	IGHD	IGHJ	IGHV % GI
P1	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	94.70
P2	4	IGHV4-34*02	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	94.40
P3	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	91.70
P4	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	91.20
P5	4	IGHV4-34*02	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	93.20
P6	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	93.50
P7	4	IGHV4-34*02	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	91.90
P8	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	90.00
P9	4	IGHV4-34*02	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	94.80
P10	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	93.33
P11	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	94.50
P12	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	95.90
P13	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100.00
P14	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100.00
P15	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99.50
P16	1	IGHV1-18*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99.70
P17	1	IGHV5-10-1*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100
P18		IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	97.20
P19	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100.00
P20	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100.00
P21	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	98.55
P22	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	97.20
P23		IGHV4-34*01	IGHD2-2*02	IGHJ4*02	96.49
P24	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99.70
P25		IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100.00
P26	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	97.22
P27		IGHV1-3*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	95.10
P28		IGHV2-5*04	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	95.53
P29		IGHV1-3*01	IGHD3-3*01	IGHJ6*02	100.00
P30		IGHV3-21*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	100.00
P31		IGHV3-21*02	IGHD3-16*02	IGHJ5*02	95.49
P32	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	97.99

Συμπληρωματικός Πίνακας 12. Ορολογικός έλεγχος των ασθενών με CLL και των υγιών μαρτύρων για EBV και CMV.

Κωδικός ασθενούς	anti-CMV IgM	anti-CMV IgG	anti-EBV IgM	anti-EBV IgG
P1	-	+	-	+
P2	-	+	-	+
P3	-	+	-	+
P4	-	+	-	+
P5	-	+	-	+
P6				
P7	-	+	-	+
P8	-	-	-	+
P9	-	+	-	+
P10				
P11	-	+	-	+
P12	-	+	-	+
P13	-	+	-	+
P14	-	-	-	+
P15	-	+	-	+
P16	-	+	-	+
P17	-	+	-	-
P18	-	+	-	+
P19	-	+	-	+
P20	-	+	-	+
P21	-	+	-	+
P22				
P23	-	+	-	+
P24	-	+	-	+
P25	-	+	-	+
P26				
P27	-	+	-	+
P28	-	-	-	+
P29	-	+	-	+
P30	-	+	-	+
P31	-	+	-	+
P32	-	+	-	+
Υγιής-70	-	+	-	+
Υγιής-80	-	+	-	+

Συμπληρωματικός Πίνακας 13. Παράμετροι για τη σύνθεση και ποιοτική αξιολόγηση των paired-end αλληλουχιών.

[CustomParameters]
#start_read
start_read=0
#end_read
end_read=5000000
#type of cell, TCR=1, BCR=2
cell_type=1
minimum length of initial sequence (unpaired read)
min_sequence_length=150
#nucleotides with lower quality are considered bad
quality_limit=14
#accepted sequence mean quality equal or higher of selected value
mean_quality=20
percentage of nts that can have low_quality
percentage_low_quality=0.15
minimum percentage of acceptable unidentified nucleotides (N)
percentage_Ns=0.01
#minimum overlap length of paired reads
minimum_overlap_length=20
#bestmatch_bestlen_ratio=0.2
mismatch_ratio=0.25
#continuousmatch
continuousmatch_thres=20
#joined_quality_mean
joined_quality_mean=25
#final_min_length of the final stitched sequence
joined_min_length=200
#percentage of nts that can have low_quality in joined sequence
joined_perc_low_quality=0.07
#nucleotides with lower quality are considered bad in joined sequence
joined_quality_limit=20
#length to look for, before CDR3-end anchor
estimated_CDR3_length=75
#nucleotides with lower quality are considered bad in selected length ahead of the CDR3 anchor
joined_CDR3_quality_limit=30
#percentage_lowq_before_cdr3_anchor
percentage_lowq_before_cdr3_anchor=0.005

Συμπληρωματικός Πίνακας 14. Ρεπερτόριο γονιδίων TRBV στα δείγματα PBMCs συνολικά και κατά ανοσογενετική ομάδα.

TRBV	PBMCs_σύνολο (μέσος όρος)	UM (μέσος όρος)	M (μέσος όρος)	Υποσύνολο #2 (μέσος όρος)	Υποσύνολο #1 (μέσος όρος)	Υποσύνολο #4 (μέσος όρος)
TRBV12-3/12-4	8.42	7.64	8.53	8.31	8.53	9.82
TRBV29-1	6.89	7.02	6.68	7.70	6.74	6.93
TRBV27	6.71	6.84	6.53	6.56	6.15	7.92
TRBV19	6.15	6.63	5.97	6.63	6.07	6.05
TRBV7-9	5.40	5.14	5.42	6.12	5.90	4.78
TRBV6-5	5.11	5.15	4.78	5.69	5.70	3.89
TRBV28	3.75	4.61	4.30	2.63	3.78	2.80
TRBV5-1	3.72	3.09	4.36	2.77	3.08	5.14
TRBV5-6	3.50	3.99	3.74	2.95	3.85	2.62
TRBV11-2	3.48	2.96	3.75	2.79	3.95	3.50
TRBV7-2	3.47	3.69	3.51	3.29	3.92	3.19
TRBV6-2 or TRBV6-3	3.11	2.72	3.13	3.75	3.04	3.06
TRBV4-1	2.98	2.47	3.05	2.83	3.10	2.47
TRBV13	2.87	2.82	2.87	2.92	2.95	2.69
TRBV4-3	2.76	2.58	2.98	2.84	2.70	2.47
TRBV5-4	2.72	2.50	2.70	3.37	2.72	2.87
TRBV6-6	2.71	2.96	2.83	2.81	2.30	2.90
TRBV10-3	2.65	2.43	2.42	3.07	2.57	2.80
TRBV7-8	2.38	2.24	1.68	2.81	2.30	2.56
TRBV20-1	2.14	2.50	2.13	2.59	2.05	2.00
TRBV15	2.13	2.21	1.48	2.40	2.76	2.14
TRBV6-1	2.13	1.93	2.47	2.02	2.21	2.03
TRBV5-5	1.80	2.72	2.43	0.84	1.47	1.98
TRBV4-2	1.64	1.57	2.29	1.22	1.76	1.36
TRBV2	1.40	0.62	2.05	0.94	1.25	2.18
TRBV24-1	1.12	1.07	1.30	0.98	1.08	1.04
TRBV18	1.07	0.89	1.13	0.82	1.18	0.89
TRBV12-5	1.01	0.89	0.67	0.65	0.89	1.03
TRBV30	0.94	1.55	0.92	0.84	0.51	0.91
TRBV14	0.81	0.89	0.37	1.09	0.56	1.04
TRBV6-4	0.74	0.73	0.42	1.21	0.91	0.59
TRBV10-2	0.71	1.07	0.63	0.72	0.62	0.51
TRBV7-3	0.69	0.63	0.67	0.57	0.63	0.90
TRBV9	0.43	0.56	0.18	0.60	0.37	0.47
TRBV11-3	0.40	0.37	0.28	0.53	0.48	0.38
TRBV7-6	0.33	0.38	0.30	0.44	0.27	0.26
TRBV25-1	0.25	0.15	0.09	0.35	0.30	0.30
TRBV5-8	0.22	0.22	0.13	0.19	0.20	0.26
TRBV11-1	0.20	0.15	0.11	0.21	0.24	0.18
TRBV10-1	0.18	0.21	0.17	0.15	0.20	0.14
TRBV5-5 or TRBV5-7	0.17	0.15	0.09	0.17	0.17	0.15
TRBV3-1	0.17	0.56	0.04	0.09	0.07	0.07
TRBV6-5 or TRBV6-6	0.16	0.17	0.20	0.18	0.16	0.10
TRBV7-7	0.15	0.11	0.08	0.16	0.15	0.20
TRBV6-8	0.10	0.08	0.05	0.10	0.06	0.30
TRBV7-4	0.08	0.07	0.06	0.03	0.04	0.05
TRBV6-9	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.02
TRBV4-2 or TRBV4-3	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
TRBV16	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
TRBV5-5 or TRBV5-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
TRBV6-5 or TRBV6-9	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00
TRBV7-6 or TRBV7-7	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01

Συμπληρωματικός Πίνακας 15. CD4⁺ και CD8⁺ ρεπερτόριο γονιδίων TRBV (15 συχνότερα γονίδια).

TRBV	CD8 (μέσος όρος)	CD4 (μέσος όρος)
TRBV12-3/12-4	9.52	10.26
TRBV29-1	8.87	8.13
TRBV27	6.35	3.90
TRBV19	6.04	7.35
TRBV7-9	4.62	2.57
TRBV6-5	4.49	4.00
TRBV28	4.49	3.42
TRBV5-1	4.00	6.77
TRBV5-6	3.57	2.75
TRBV11-2	3.49	3.23
TRBV7-2	3.14	5.96
TRBV6-2 or TRBV6-3	2.85	2.82
TRBV4-1	2.67	1.72
TRBV13	2.59	0.87
TRBV4-3	2.49	1.56
TRBV5-4	2.41	3.21
TRBV6-6	2.38	2.38
TRBV10-3	2.34	3.36
TRBV7-8	2.24	1.70
TRBV20-1	1.88	3.35
TRBV15	1.62	1.38
TRBV6-1	1.62	2.10
TRBV5-5	1.59	2.00
TRBV4-2	1.57	1.38
TRBV2	1.53	2.01

Συμπληρωματικός Πίνακας 16. Ρεπερτόριο γονιδίων TRBV στους υγιείς μάρτυρες (15 συχνότερα γονίδια).

TRBV GENE	Healthy70	Healthy80
TRBV12-3/12-4	9.3304	9.2943
TRBV5-1	7.1482	4.9617
TRBV19	5.4177	7.2506
TRBV7-2	3.2859	3.7846
TRBV27	4.3368	3.9281
TRBV6-5	5.5436	4.0722
TRBV5-6	3.3158	2.7679
TRBV28	4.2685	1.2238
TRBV29-1	6.5046	6.1952
TRBV10-3	4.3608	3.7688
TRBV6-1	3.1085	3.282
TRBV5-4	3.7472	3.3425
TRBV6-6	3.4177	2.8163
TRBV11-2	3.0606	4.0722
TRBV6-2 or TRBV6-3	2.157	3.2257
TRBV7-9	2.1846	2.295
TRBV20-1	3.5783	3.6035
TRBV18	2.4698	2.9616
TRBV7-8	1.9605	2.3252
TRBV4-1	2.4063	1.5968
TRBV5-5	2.7814	1.9201
TRBV4-2	1.2343	1.0118
TRBV2	2.3847	3.1996
TRBV4-3	0.0096	2.0128
TRBV30	2.1618	3.0543

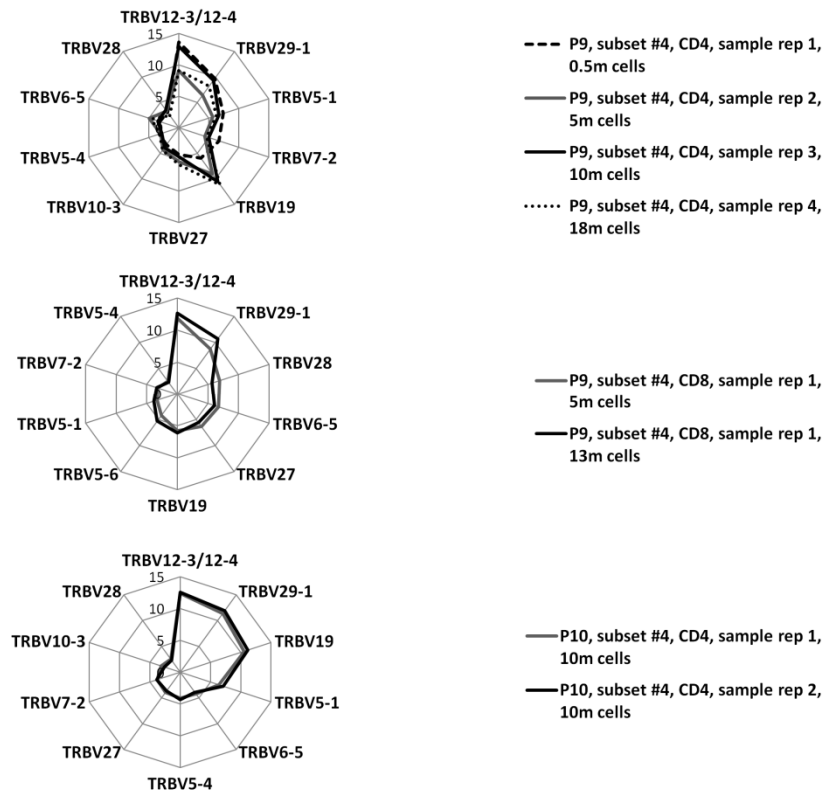
Συμπληρωματικός Πίνακας 17. Ανάλυση κλωνικότητας στο σύνολο των δειγμάτων.

Δείγμα	Γονίδιο TRBV επικρατούς κλωνοτύπου	Συμβολή (AA) επικρατούς κλωνοτύπου	Συχνότητα επικρατούς κλωνοτύπου (%)	Αθροιστική συχνότητα 10 πιο εκπτυγμένων κλωνοτύπων (%)
P1, υποσύνολο #4	TRBV12-5	CASGLGNRQACEKLFF	4.8164	19.9774
P2, υποσύνολο #4	TRBV6-5	CASSSYGQGINTGELFF	10.7791	23.1187
P3, υποσύνολο #4	TRBV6-5	CASSYGPSYGTYF	3.5194	14.2913
P4, υποσύνολο #4	TRBV19	CASSIPGQGYEKLFF	5.1248	20.1092
P5, υποσύνολο #4, PCR rep 1, 1μg RNA	TRBV12-3	CASSLSGGAGELFF	10.7387	27.6978
P6, υποσύνολο #4, PCR rep 2, 1μg RNA	TRBV5-1	CASSLSQNRRTGELFF	4.4886	14.7384
P7, υποσύνολο #4	TRBV19	CASSPGGRGQPQHF	9.3232	59.5476
P6, υποσύνολο #4, PCR rep 1, 1μg RNA	TRBV5-1	CASSLSQNRRTGELFF	4.972	14.9912
P5, υποσύνολο #4, PCR rep 2, 1μg RNA	TRBV12-3	CASSLSGGAGELFF	7.9956	28.1147
P9, υποσύνολο #4, στιγμιότυπο A, PCR rep 2, 1μg	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	4.336	13.1169
P9, υποσύνολο #4, στιγμιότυπο A, PCR rep 3, 2μg	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	4.5399	12.2738
P9, υποσύνολο #4, στιγμιότυπο A, PCR rep 4, 5.8μg	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	4.0153	12.2447
P9, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 1, 0.5m cells	TRBV29-1	CSVVWNGNYTF	0.3576	2.0867
P9, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 2, 5m cells	TRBV29-1	CSVGTGPSYGYTF	0.5031	3.2527
P9, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 3, 10m cells	TRBV7-9	CASSLDVGGELFF	0.2687	1.759
P9, υποσύνολο #4, CD8, sample rep 1, 5m cells	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	18.6151	39.2563
P9, υποσύνολο #4, CD8, sample rep 2, 13m cells	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	22.0725	42.4174
P9, υποσύνολο #4, στιγμιότυπο A, PCR rep 1, 1μg	TRBV15	CATRVTTGGLVGELFF	3.7605	10.8439
P10, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 1, 10m cells	TRBV29-1	CSVEEDYTF	0.3507	1.7922
P10, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 2, 10m cells	TRBV29-1	CSVSGGLTGELFF	0.3408	1.6753
P10, υποσύνολο #4, CD8	TRBV28	CASSLAVGHQPQHF	3.271	14.705
P11, υποσύνολο #4	TRBV12-3	CASSSTENEKLF	7.3237	25.8846
P12, υποσύνολο #4, PBMCs, στιγμιότυπο 1	TRBV24-1	CATSPGANVLT	2.7195	9.4016
P12, υποσύνολο #4, CD4, στιγμιότυπο 2	TRBV28	CASSLLGGPLYEQYF	10.918	43.2365
P12, υποσύνολο #4, CD8, στιγμιότυπο 2	TRBV10-3	CAISEFTDSYGYTF	3.516	12.8339
P8, υποσύνολο #4	TRBV6-4	CASRNRGVYSNQPHF	2.657	11.9166
P14, υποσύνολο #1	TRBV19	CAVGTGAWLYQPQHF	5.5155	13.5867
P19, υποσύνολο #1	TRBV29-1	CSVGDRGSNEKLF	19.9425	51.7816
P24, υποσύνολο #1	TRBV29-1	CSVSETANTGELFF	7.498	17.4818
P20, υποσύνολο #1, sequencing rep 1	TRBV5-1	CASSSDSQSSGNTIYF	4.64	22.027
P16, υποσύνολο #1	TRBV19	CASSQGAGNTIYF	6.107	27.7922
P15, υποσύνολο #1	TRBV12-3	CASSSTGGTGELFF	20.5617	27.5907
P17, υποσύνολο #1, CD4	TRBV6-5	CASSRAGQPQHF	4.1486	9.7816
P17, υποσύνολο #1, CD8	TRBV15	CATSRDGGSIGELFF	12.4081	51.6638
P13, υποσύνολο #1, PBMCs	TRBV7-8	CASSRDPAATNEKLF	2.2091	8.7733
P13, υποσύνολο #1, LN	TRBV29-1	CSVAKGQGYTF	1.7476	7.294
P26, υποσύνολο #2	TRBV29-1	CSVEAGDRGNTIYF	12.2918	36.9112
P21, υποσύνολο #2, sequencing rep 1	TRBV29-1	CSVEETSGGVSSELFF	15.9587	44.3167
P22, υποσύνολο #2	TRBV29-1	CSVAYPGQGTVRPQHF	7.924	14.2514
P32, υποσύνολο #2, sequencing rep 1, στιγμιότυπο 1	TRBV4-1	CASSTTGTVDEKLF	11.1583	22.498
P32, υποσύνολο #2, sequencing rep 1, στιγμιότυπο 2	TRBV4-1	CASSTTGTVDEKLF	21.2405	39.889
P23, M-CLL, IGHV4-34	TRBV7-2	CASSLEVTGYSPLHF	18.6819	42.2145
P27, M-CLL, sequencing rep 1	TRBV28	CASSPPDTGELFF	25.8244	38.4248
P31, M-CLL, IGHV3-21	TRBV11-2	CASSPGQFTGELFF	5.4258	24.099
P28, M-CLL, CD4	TRBV15	CATSRDGGSGANVLT	0.861	2.3326
P28, M-CLL, CD8	TRBV20-1	CSASLGSLAGELFF	9.4656	43.9108
P18, M-CLL, CD4	TRBV4-2	CASSHTGAGGYTF	3.3434	8.2694
P18, M-CLL, CD8	TRBV12-3	CASDRRGYTF	10.4245	45.9081
P25, UM-CLL	TRBV28	CASSLEEFGELFF	13.3477	30.1559
P29, UM-CLL	TRBV29-1	CSVAVTANTGELFF	3.1628	10.2501
P30, UM-CLL	TRBV28	CASRGGGANQPQHF	5.6937	17.951
P9, υποσύνολο #4, CD4, sample rep 4, 18m cells	TRBV29-1	CSVGTGPSYGYTF	0.4706	2.9516
P20, υποσύνολο #1, sequencing rep 2	TRBV5-1	CASSSDSQSSGNTIYF	5.7625	24.9851
P21, υποσύνολο #2, sequencing rep 2	TRBV29-1	CSVEETSGGVSSELFF	24.7607	53.3633
P32, υποσύνολο #2, sequencing rep 2, στιγμιότυπο 1	TRBV4-1	CASSTTGTVDEKLF	8.4826	21.4706
P32, υποσύνολο #2, sequencing rep 2, στιγμιότυπο 2	TRBV4-1	CASSTTGTVDEKLF	14.8369	37.4204
P27, M-CLL, sequencing rep 2	TRBV28	CASSPPDTGELFF	23.0765	40.6201
Υγής 7ο	TRBV12-3	CASSARQGGGNEKLF	1.2749	4.4342
Υγής 8ο	TRBV29-1	CSVVLQDGNQPQHF	2.0063	5.8564

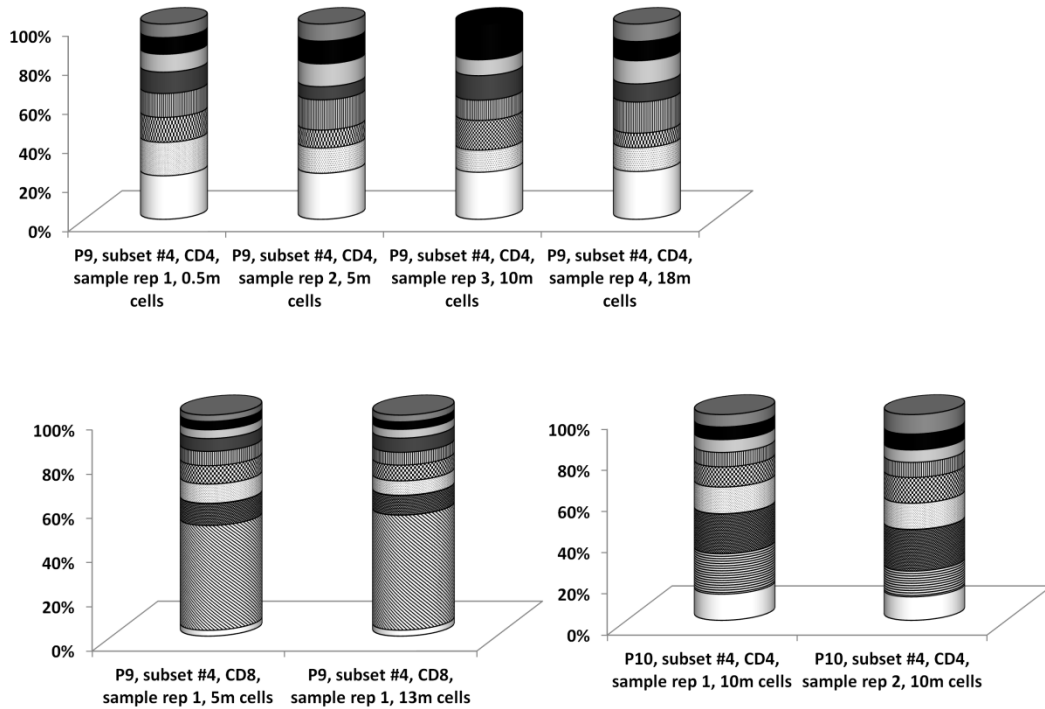
Συμπληρωματικός Πίνακας 18. Τυποποίηση HLA κατά ζεύγη ασθενών που κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα και φέρουν κοινούς μείζονες κλωνοτύπους, και τυποποίηση HLA των υγιών μαρτύρων.

Κωδικός ασθενούς	Υποσύνολο	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DRB1
P9	υποσύνολο #4	01	02	35	73	04	15	4:05	11:04
P8	υποσύνολο #4	02	32	07	51	07	14	4:01	4:04
P8	υποσύνολο #4	02	32	07	51	07	14	4:01	4:04
P3	υποσύνολο #4	02	24	35	51	04	15	9:01	11:04
P13	υποσύνολο #1	24	26	15	55	01	03	3:01	4:05
P15	υποσύνολο #1	02	24	18	18	02	07	11:04	16:01
P16	υποσύνολο #1	02	33			08	12	01:02	16:01
P32	υποσύνολο #2	02	24			07	14	03:01	11:04
PX, classic subcloning	υποσύνολο #1	02	66	13	41	06	17	7:01	13:03
P17	υποσύνολο #1	24	26	35	51	04	14	4:05	13:03
Υγιής-7ο		24	30	08	35	04	07	3:01	11:03
Υγιής-8ο		01	24	07	18	07	12	11:04	15:01

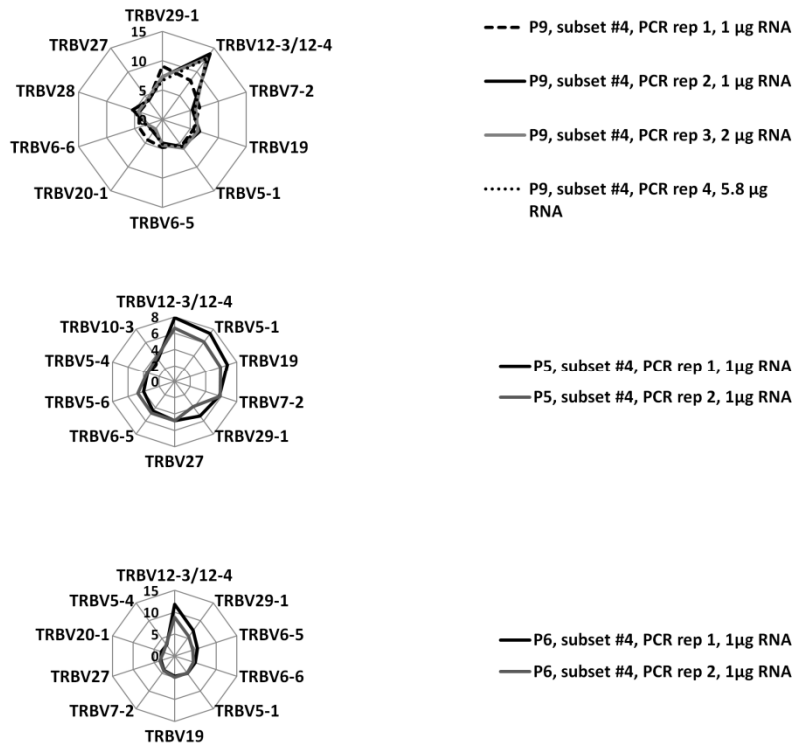
Συμπληρωματική Εικόνα 1. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV στα "sample replicates".



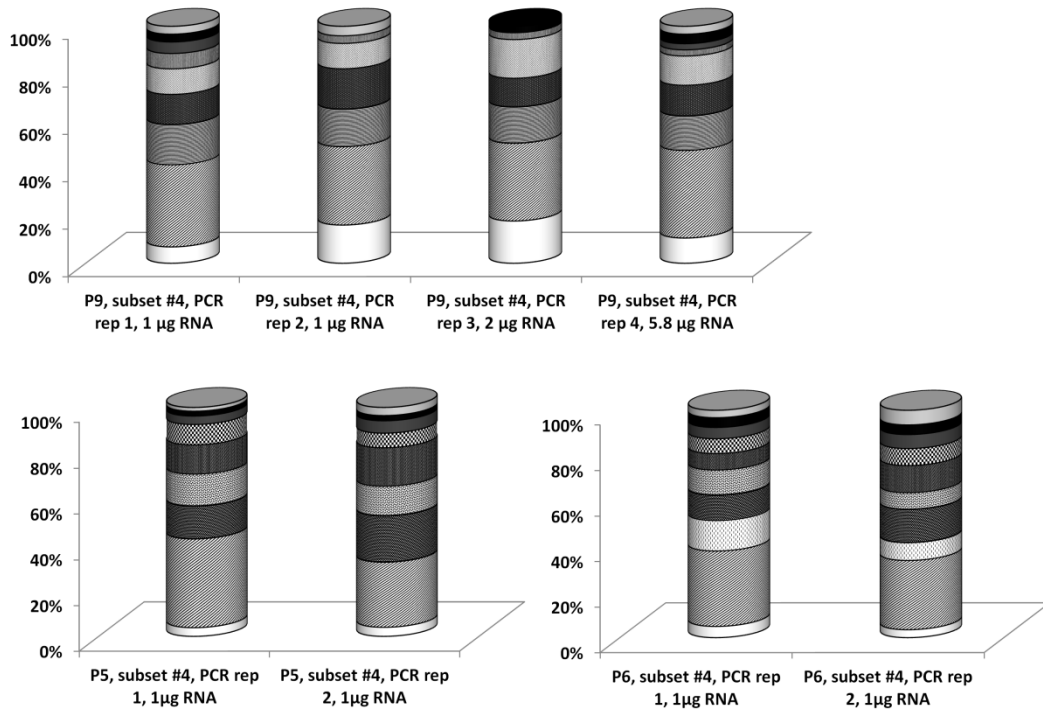
Συμπληρωματική Εικόνα 2. Οι μείζονες κλωνοτύποι στα "sample replicates".



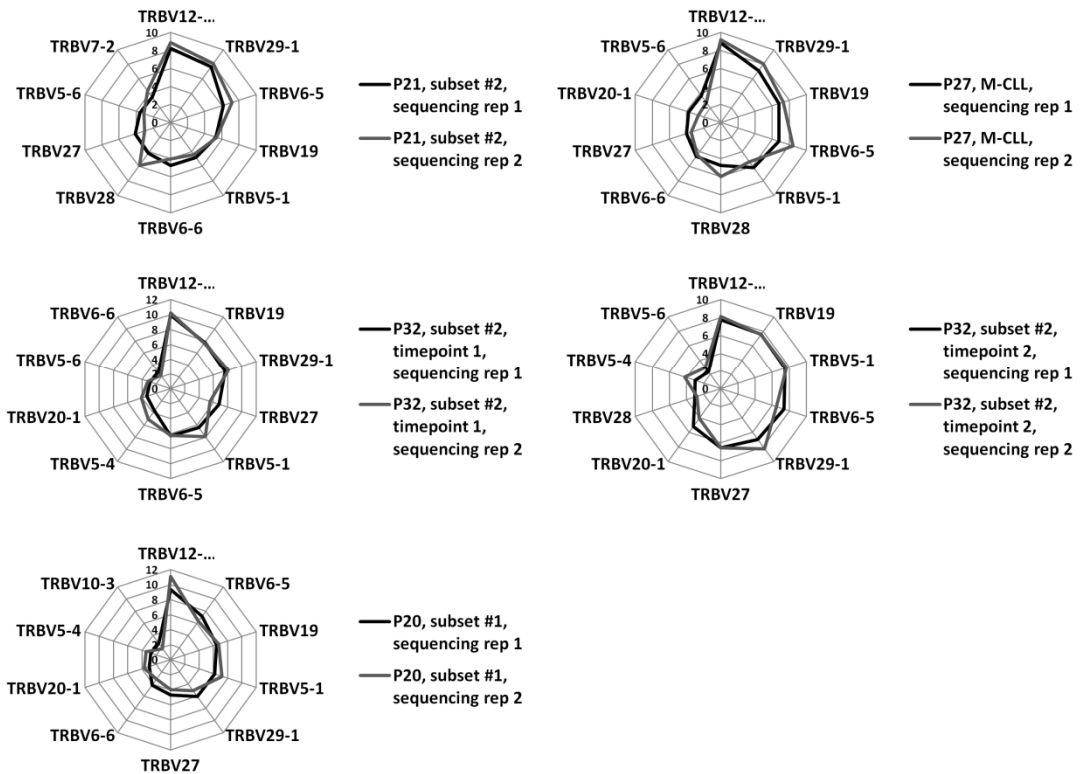
Συμπληρωματική Εικόνα 3. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV στα "PCR replicates".



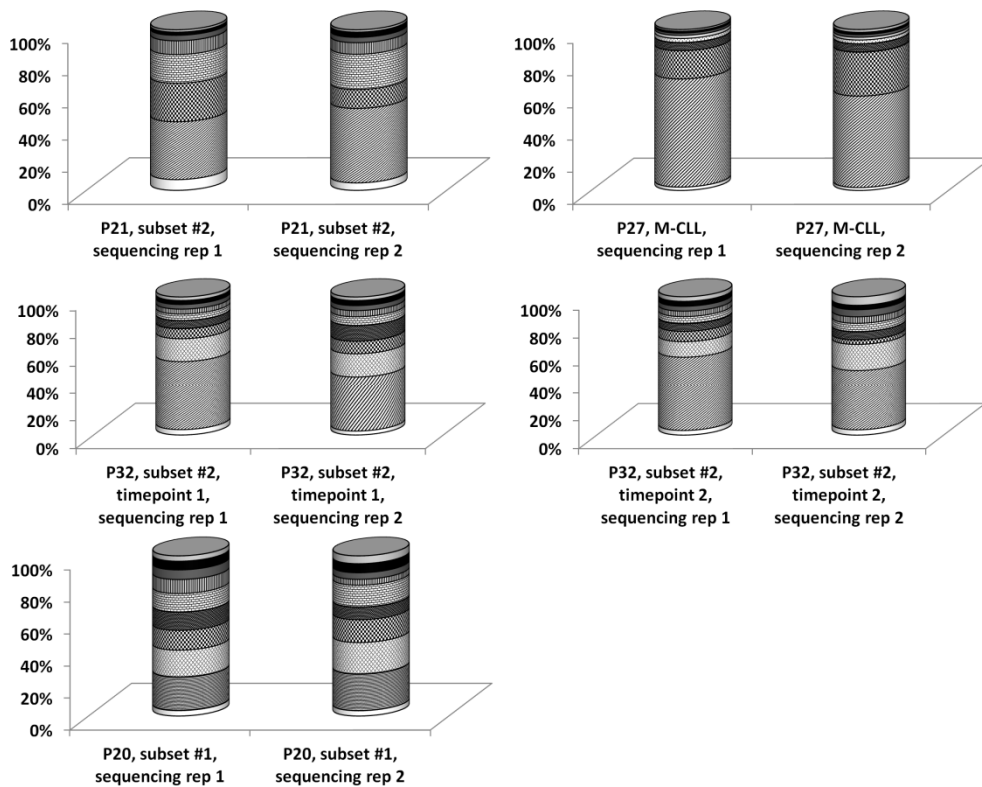
Συμπληρωματική Εικόνα 4. Οι μείζονες κλωνοτύποι στα "PCR replicates".



Συμπληρωματική Εικόνα 5. Ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV στα "sequencing replicates".



Συμπληρωματική Εικόνα 6. Οι μείζονες κλωνοτύποι στα "sequencing replicates".



1. Janeway C, T.P., Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology. The immune system in health and disease.*, (Garland Publishing Inc., 2004).
2. Lefranc MP, L.G. *The immunoglobulin FactsBook.*, (Academic Press, London, 2001).
3. Burmester GR, P.A., Wandrey SO, Ulrichs T. *Color Atlas of immunology.*, (Thieme., 2003).
4. Lefranc, M.P. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **18**, 100-116 (2001).
5. Lefranc, M.P. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **18**, 161-174 (2001).
6. Lefranc, M.P. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* **18**, 242-254 (2001).
7. Lefranc, M.P. Nomenclature of the human T cell receptor genes. *Current protocols in immunology* **Appendix 1**, Appendix 1O (2001).
8. Maizels, N. Immunoglobulin gene diversification. *Annual review of genetics* **39**, 23-46 (2005).
9. Borghesi, L. & Milcarek, C. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic research* **36**, 27-32 (2006).
10. Hassanin, A., Golub, R., Lewis, S.M. & Wu, G.E. Evolution of the recombination signal sequences in the Ig heavy-chain variable region locus of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11415-11420 (2000).
11. Nishihara, T., Nagawa, F., Imai, T. & Sakano, H. RAG-heptamer interaction in the synaptic complex is a crucial biochemical checkpoint for the 12/23 recombination rule. *The Journal of biological chemistry* **283**, 4877-4885 (2008).
12. Schatz, D.G. & Spanopoulou, E. Biochemistry of V(D)J recombination. *Current topics in microbiology and immunology* **290**, 49-85 (2005).
13. Fugmann, S.D. RAG1 and RAG2 in V(D)J recombination and transposition. *Immunologic research* **23**, 23-39 (2001).
14. Roth, D.B. Restraining the V(D)J recombinase. *Nature reviews. Immunology* **3**, 656-666 (2003).
15. Roitt IM, D.P. *Roitt's essential immunology.*, (Blackwell Science, Oxford, 2001).
16. Benedict, C.L., Gilfillan, S., Thai, T.H. & Kearney, J.F. Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunological reviews* **175**, 150-157 (2000).
17. Brezinschek, H.P., *et al.* Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2488-2501 (1997).
18. Papavasiliou, F.N. & Schatz, D.G. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* **109 Suppl**, S35-44 (2002).
19. Odegard, V.H. & Schatz, D.G. Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews. Immunology* **6**, 573-583 (2006).
20. Franklin, A. & Blanden, R.V. On the molecular mechanism of somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes. *Immunology and cell biology* **82**, 557-567 (2004).

21. Shapiro, G.S. & Wysocki, L.J. DNA target motifs of somatic mutagenesis in antibody genes. *Critical reviews in immunology* **22**, 183-200 (2002).
22. Casali, P., Pal, Z., Xu, Z. & Zan, H. DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends in immunology* **27**, 313-321 (2006).
23. Neuberger, M.S., *et al.* Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nature reviews. Immunology* **5**, 171-178 (2005).
24. Goldmit, M., Schlissel, M., Cedar, H. & Bergman, Y. Differential accessibility at the kappa chain locus plays a role in allelic exclusion. *The EMBO journal* **21**, 5255-5261 (2002).
25. Liang, H.E., Hsu, L.Y., Cado, D. & Schlissel, M.S. Variegated transcriptional activation of the immunoglobulin kappa locus in pre-b cells contributes to the allelic exclusion of light-chain expression. *Cell* **118**, 19-29 (2004).
26. Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S.T. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunological reviews* **197**, 206-218 (2004).
27. Schlissel, M.S. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature reviews. Immunology* **3**, 890-899 (2003).
28. 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. *The Journal of experimental medicine* **191**, 5-8 (2000).
29. Matthias, P. & Rolink, A.G. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nature reviews. Immunology* **5**, 497-508 (2005).
30. Defrance, T., Casamayor-Palleja, M. & Krammer, P.H. The life and death of a B cell. *Advances in cancer research* **86**, 195-225 (2002).
31. LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580 (2008).
32. Fang, T., Smith, B.P. & Roman, C.A. Conventional and surrogate light chains differentially regulate Ig mu and Dmu heavy chain maturation and surface expression. *J Immunol* **167**, 3846-3857 (2001).
33. Lassoued, K., Illges, H., Benlagha, K. & Cooper, M.D. Fate of surrogate light chains in B lineage cells. *The Journal of experimental medicine* **183**, 421-429 (1996).
34. Meffre, E., *et al.* Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nature immunology* **1**, 207-213 (2000).
35. Ohmori, H. & Hikida, M. Expression and function of recombination activating genes in mature B cells. *Critical reviews in immunology* **18**, 221-235 (1998).
36. McHeyzer-Williams, L.J., Driver, D.J. & McHeyzer-Williams, M.G. Germinal center reaction. *Current opinion in hematology* **8**, 52-59 (2001).
37. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews. Immunology* **8**, 22-33 (2008).
38. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology* **20**, 149-157 (2008).
39. Genestier, L., *et al.* TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* **178**, 7779-7786 (2007).
40. Milner, E.C., Anolik, J., Cappione, A. & Sanz, I. Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer seminars in immunopathology* **26**, 433-452 (2005).
41. Spencer, J., Perry, M.E. & Dunn-Walters, D.K. Human marginal-zone B cells. *Immunology today* **19**, 421-426 (1998).

42. Martin, F., Oliver, A.M. & Kearney, J.F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* **14**, 617-629 (2001).
43. Oliver, A.M., Martin, F. & Kearney, J.F. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* **162**, 7198-7207 (1999).
44. Timens, W., Boes, A. & Poppema, S. Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *European journal of immunology* **19**, 2163-2166 (1989).
45. Zandvoort, A. & Timens, W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clinical and experimental immunology* **130**, 4-11 (2002).
46. Weller, S., *et al.* Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647-3654 (2004).
47. Griffin, D.O., Holodick, N.E. & Rothstein, T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70. *J Exp Med* **208**, 67-80 (2011).
48. Boes, M., *et al.* Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1184-1189 (2000).
49. Watson, L., Wyld, P. & Catovsky, D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *European journal of haematology* **81**, 253-258 (2008).
50. Morton, L.M., *et al.* Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* **107**, 265-276 (2006).
51. Mauro, F.R., *et al.* Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* **94**, 448-454 (1999).
52. Ginaldi, L., *et al.* Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of clinical pathology* **51**, 364-369 (1998).
53. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* **90**, 446-460 (2015).
54. Sutton, L.A. & Rosenquist, R. The complex interplay between cell-intrinsic and cell-extrinsic factors driving the evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in cancer biology* **34**, 22-35 (2015).
55. Gruber, M. & Wu, C.J. Evolving understanding of the CLL genome. *Semin Hematol* **51**, 177-187 (2014).
56. Sutton, L.A. & Rosenquist, R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica* **100**, 7-16 (2015).
57. Zenz, T., *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 4473-4479 (2010).
58. Sutton, L.A., *et al.* Antigen selection in B-cell lymphomas--tracing the evidence. *Seminars in cancer biology* **23**, 399-409 (2013).
59. Packham, G., *et al.* The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica* **99**, 1138-1148 (2014).
60. Burger, J.A. & Chiorazzi, N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* **34**, 592-601 (2013).

61. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **21**, 841-894 (2003).
62. Fais, F., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation* **102**, 1515-1525 (1998).
63. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854 (1999).
64. Damle, R.N., *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-1847 (1999).
65. Vardi, A., *et al.* Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer research* **74**, 4211-4216 (2014).
66. Mertens, D. & Stilgenbauer, S. Prognostic and predictive factors in patients with chronic lymphocytic leukemia: relevant in the era of novel treatment approaches? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 869-872 (2014).
67. Baliakas, P., *et al.* Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 329-336 (2015).
68. Messmer, B.T., *et al.* Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **200**, 519-525 (2004).
69. Byrd, J.C., *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **369**, 32-42 (2013).
70. Furman, R.R., *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **370**, 997-1007 (2014).
71. Stevenson, F.K., Forconi, F. & Packham, G. The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* **51**, 158-167 (2014).
72. Duhren-von Minden, M., *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312 (2012).
73. Gounari, M. Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukemia. 21st Congress of EHA. *Haematologica* **9** (2016).
74. Agathangelidis, A., *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* **119**, 4467-4475 (2012).
75. Darzentas, N., *et al.* A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia* **24**, 125-132 (2010).
76. Stamatopoulos, K., *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* **109**, 259-270 (2007).
77. Murray, F., *et al.* Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* **111**, 1524-1533 (2008).
78. Bomben, R., *et al.* Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *British journal of haematology* **144**, 492-506 (2009).
79. Bystry, V., *et al.* ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics* **31**, 3844-3846 (2015).

80. Hadzidimitriou, A., *et al.* Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* **118**, 3088-3095 (2011).
81. Zibellini, S., *et al.* Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* **95**, 1792-1796 (2010).
82. Bikos, V., *et al.* Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia* **26**, 1638-1646 (2012).
83. Kostareli, E., *et al.* Antigen receptor stereotypy across B-cell lymphoproliferations: the case of IGHV4-59/IGKV3-20 receptors with rheumatoid factor activity. *Leukemia* **26**, 1127-1131 (2012).
84. Kanduri, M., *et al.* Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics* **7**, 1435-1442 (2012).
85. Marincevic, M., *et al.* Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* **95**, 2072-2079 (2010).
86. Papakonstantinou, N., *et al.* Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med* **19**, 115-123 (2013).
87. Ntoufa, S., *et al.* Distinct innate immunity pathways to activation and tolerance in subgroups of chronic lymphocytic leukemia with distinct immunoglobulin receptors. *Mol Med* **18**, 1281-1291 (2012).
88. Gounari, M., *et al.* Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood* **125**, 3580-3587 (2015).
89. Ntoufa, S., *et al.* B Cell Energy Modulated by TLR1/2 and the miR-17 approximately 92 Cluster Underlies the Indolent Clinical Course of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #4. *J Immunol* **196**, 4410-4417 (2016).
90. Del Giudice, I., *et al.* Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: a direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *American Journal of Hematology* **89**, 74-82 (2014).
91. Varambally, S., *et al.* Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* **322**, 1695-1699 (2008).
92. Beguelin, W., *et al.* EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer cell* **23**, 677-692 (2013).
93. Kanduri, M., *et al.* A key role for EZH2 in epigenetic silencing of HOX genes in mantle cell lymphoma. *Epigenetics* **8**, 1280-1288 (2013).
94. Chang, C.J. & Hung, M.C. The role of EZH2 in tumour progression. *British journal of cancer* **106**, 243-247 (2012).
95. Sutton, L.A., *et al.* Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica* (2016).
96. Mansouri, L., *et al.* Functional loss of IkappaBepsilon leads to NF-kappaB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* **212**, 833-843 (2015).
97. Baliakas, P., *et al.* Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *The Lancet. Haematology* **1**, e74-84 (2014).
98. Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R. & Ghia, P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2016).

99. Baliakas, P., *et al.* Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood* **125**, 856-859 (2015).
100. Tobin, G., *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* **101**, 4952-4957 (2003).
101. Hadzidimitriou, A., *et al.* Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 403-411 (2009).
102. Belessi, C.J., *et al.* IGHV gene insertions and deletions in chronic lymphocytic leukemia: "CLL-biased" deletions in a subset of cases with stereotyped receptors. *European journal of immunology* **36**, 1963-1974 (2006).
103. Marincevic, M., *et al.* High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* **95**, 1519-1525 (2010).
104. Malcikova, J., *et al.* The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *British journal of haematology* **166**, 621-625 (2014).
105. Rossi, D., *et al.* Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 4902-4905 (2013).
106. Strefford, J.C., *et al.* Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia* **27**, 2196-2199 (2013).
107. Ajuh, P., *et al.* Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* **19**, 6569-6581 (2000).
108. Rossi, D., *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* **118**, 6904-6908 (2011).
109. Athanasiadou, A., *et al.* Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica* **93**, 473-474 (2008).
110. Dohner, H., *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910-1916 (2000).
111. Vardi, A., *et al.* IgG-switched CLL has a distinct immunogenetic signature from the common MD variant: ontogenetic implications. *Clin Cancer Res* **20**, 323-330 (2014).
112. Jang, Y.J. & Stollar, B.D. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**, 309-320 (2003).
113. Sutton, L.A., *et al.* Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. *Blood* **114**, 4460-4468 (2009).
114. Kostareli, E., *et al.* Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia* **24**, 1317-1324 (2010).
115. Sutton, L.A., *et al.* Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: longitudinal immunogenetic evidence. *Molecular medicine* **19**, 230-236 (2013).
116. Sutton, L.A., *et al.* An entity evolving into a community: defining the common ancestor and evolutionary trajectory of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #4. *Molecular medicine* **20**, 720-728 (2014).
117. Muzio, M., *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* **112**, 188-195 (2008).

118. Ghiotto, F., *et al.* Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* **113**, 1008-1016 (2004).
119. Rossi, D., *et al.* Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* **15**, 4415-4422 (2009).
120. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* **117**, 1781-1791 (2011).
121. Seifert, M., *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **209**, 2183-2198 (2012).
122. Paus, D., *et al.* Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* **203**, 1081-1091 (2006).
123. Chiorazzi, N., Rai, K.R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815 (2005).
124. Weill, J.C., Weller, S. & Reynaud, C.A. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 267-285 (2009).
125. Chappell, C.P., Draves, K.E., Giltiay, N.V. & Clark, E.A. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1825-1840 (2012).
126. Kaji, T., *et al.* Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *The Journal of experimental medicine* **209**, 2079-2097 (2012).
127. Herve, M., *et al.* Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* **115**, 1636-1643 (2005).
128. Catera, R., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med* **14**, 665-674 (2008).
129. Borche, L., Lim, A., Binet, J.L. & Dighiero, G. Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood* **76**, 562-569 (1990).
130. Chu, C.C., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* **112**, 5122-5129 (2008).
131. Lanemo Myhrinder, A., *et al.* A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* **111**, 3838-3848 (2008).
132. Hoogeboom, R., *et al.* A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med* **210**, 59-70 (2013).
133. Baumgarth, N., Tung, J.W. & Herzenberg, L.A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 347-362 (2005).
134. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* **11**, 34-46 (2011).
135. Martin, F. & Kearney, J.F. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 323-335 (2002).
136. Chou, M.Y., *et al.* Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* **119**, 1335-1349 (2009).
137. Hardy, R.R. B-1 B cell development. *J Immunol* **177**, 2749-2754 (2006).
138. Baumgarth, N. Innate-like B cells and their rules of engagement. *Adv Exp Med Biol* **785**, 57-66 (2013).

139. Forconi, F., *et al.* The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood* **115**, 71-77 (2010).
140. Vardi, A., *et al.* Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood* **121**, 4521-4528 (2013).
141. Han, T., *et al.* Benign monoclonal B cell lymphocytosis--a benign variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* **64**, 244-252 (1984).
142. Kimby, E., Mellstedt, H., Bjorkholm, M. & Holm, G. Clonal cell surface structures related to differentiation, activation and homing in B-cell chronic lymphocytic leukemia and monoclonal lymphocytosis of undetermined significance. *European journal of haematology* **43**, 452-459 (1989).
143. Rachel, J.M., *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *British journal of haematology* **139**, 832-836 (2007).
144. Dagklis, A., *et al.* The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood* **114**, 26-32 (2009).
145. Nieto, W.G., *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* **114**, 33-37 (2009).
146. Rawstron, A.C., *et al.* Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* **100**, 635-639 (2002).
147. Ghia, P., *et al.* Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood* **103**, 2337-2342 (2004).
148. Shanafelt, T.D., Ghia, P., Lanasa, M.C., Landgren, O. & Rawstron, A.C. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* **24**, 512-520 (2010).
149. Marti, G.E., *et al.* Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British journal of haematology* **130**, 325-332 (2005).
150. Landgren, O., *et al.* B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **360**, 659-667 (2009).
151. Goldin, L.R., *et al.* Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *British journal of haematology* **151**, 152-158 (2010).
152. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC WHO Classification of Tumours)*, (2008).
153. Rawstron, A.C., *et al.* Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry* **78 Suppl 1**, S19-23 (2010).
154. Rawstron, A.C., *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **359**, 575-583 (2008).
155. Fazi, C., *et al.* General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* **118**, 6618-6625 (2011).
156. Rossi, D., *et al.* The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *British journal of haematology* **146**, 64-75 (2009).
157. Brochet, X., Lefranc, M.P. & Giudicelli, V. IMSGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic acids research* **36**, W503-508 (2008).

158. Lefranc, M.P., *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental and comparative immunology* **27**, 55-77 (2003).
159. Dagklis, A., *et al.* Immunoglobulin gene repertoire in ocular adnexal lymphomas: hints on the nature of the antigenic stimulation. *Leukemia* **26**, 814-821 (2012).
160. Shanafelt, T.D., *et al.* Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **27**, 3959-3963 (2009).
161. Scarfo, L., *et al.* Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia* **26**, 1703-1707 (2012).
162. Tobin, G., *et al.* Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 2262-2264 (2002).
163. Thorselius, M., *et al.* Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* **107**, 2889-2894 (2006).
164. Geiger, K.D., *et al.* CD5-positive B cells in healthy elderly humans are a polyclonal B cell population. *European journal of immunology* **30**, 2918-2923 (2000).
165. Ghia, P., Melchers, F. & Rolink, A.G. Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. *Experimental gerontology* **35**, 159-165 (2000).
166. Klinman, N.R. & Kline, G.H. The B-cell biology of aging. *Immunological reviews* **160**, 103-114 (1997).
167. LeMaoult, J., Szabo, P. & Weksler, M.E. Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development. *Immunological reviews* **160**, 115-126 (1997).
168. Ghia, P., *et al.* Age-dependent accumulation of monoclonal CD4+CD8+ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *British journal of haematology* **139**, 780-790 (2007).
169. Naylor, K., *et al.* The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* **174**, 7446-7452 (2005).
170. Wack, A., *et al.* Age-related modifications of the human alphabeta T cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets. *International immunology* **10**, 1281-1288 (1998).
171. Hauswirth, A.W., *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *American journal of hematology* **87**, 721-724 (2012).
172. Rawstron, A.C. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology*, 430-439 (2009).
173. Casabonne, D., *et al.* Common infectious agents and monoclonal B-cell lymphocytosis: a cross-sectional epidemiological study among healthy adults. *Plos ONE* **In press**.
174. Kenny, J.J., *et al.* Autoreactive B cells escape clonal deletion by expressing multiple antigen receptors. *J Immunol* **164**, 4111-4119 (2000).
175. Liu, S., *et al.* Receptor editing can lead to allelic inclusion and development of B cells that retain antibodies reacting with high avidity autoantigens. *J Immunol* **175**, 5967-5976 (2005).
176. Li, Y., Li, H. & Weigert, M. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *The Journal of experimental medicine* **195**, 181-188 (2002).

177. Langerak, A.W., *et al.* Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* **25**, 979-984 (2011).
178. Liu, Y., Hernandez, A.M., Shibata, D. & Cortopassi, G.A. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8910-8914 (1994).
179. Dolken, G., Illerhaus, G., Hirt, C. & Mertelsmann, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol* **14**, 1333-1344 (1996).
180. Schuler, F., Hirt, C. & Dolken, G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. *Seminars in cancer biology* **13**, 203-209 (2003).
181. Roulland, S., *et al.* Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2425-2431 (2006).
182. Lecluse, Y., *et al.* t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia* **23**, 1190-1193 (2009).
183. Hirt, C., Schuler, F., Dolken, L., Schmidt, C.A. & Dolken, G. Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood* **104**, 904-905 (2004).
184. Katayama, Y., Sakai, A., Katsutani, S., Takimoto, Y. & Kimura, A. Lack of allelic exclusion and isotype switching in B cell chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology* **68**, 295-297 (2001).
185. Cerutti, A., *et al.* Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* **169**, 6594-6603 (2002).
186. Oppezzo, P., *et al.* Do CLL B cells correspond to naive or memory B-lymphocytes? Evidence for an active Ig switch unrelated to phenotype expression and Ig mutational pattern in B-CLL cells. *Leukemia* **16**, 2438-2446 (2002).
187. Efremov, D.G., Ivanovski, M., Batista, F.D., Pozzato, G. & Burrone, O.R. IgM-producing chronic lymphocytic leukemia cells undergo immunoglobulin isotype-switching without acquiring somatic mutations. *The Journal of clinical investigation* **98**, 290-298 (1996).
188. Oppezzo, P., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* **101**, 4029-4032 (2003).
189. Patten, P.E., *et al.* IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood* **120**, 4802-4811 (2012).
190. Palacios, F., *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* **115**, 4488-4496.
191. Geisler, C.H., *et al.* Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **78**, 1795-1802 (1991).
192. Potter, K.N., *et al.* Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 1672-1679 (2006).
193. Lanham, S., *et al.* Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 1087-1093 (2003).
194. Mockridge, C.I., *et al.* Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* **109**, 4424-4431 (2007).

195. Efremov, D.G., Wiestner, A. & Laurenti, L. Novel Agents and Emerging Strategies for Targeting the B-Cell Receptor Pathway in CLL. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* **4**, e2012067.
196. Stevenson, F.K., Krysov, S., Davies, A.J., Steele, A.J. & Packham, G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, 4313-4320 (2011).
197. Wiestner, A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 4684-4691 (2012).
198. Woyach, J.A., Johnson, A.J. & Byrd, J.C. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* **120**, 1175-1184 (2012).
199. Hallek, M., *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446-5456 (2008).
200. Widhopf, G.F., 2nd, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* **104**, 2499-2504 (2004).
201. Barbas, S.M., *et al.* Human autoantibody recognition of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 2529-2533 (1995).
202. Baliakas P, M.E., Hadzidimitriou A, *et al.* CLL: Different ages, different antigen receptor profiles. *Haematologica* **98**, 34-35 (2013).
203. Potter, K.N., Hobby, P., Klijn, S., Stevenson, F.K. & Sutton, B.J. Evidence for involvement of a hydrophobic patch in framework region 1 of human V4-34-encoded Igs in recognition of the red blood cell I antigen. *J Immunol* **169**, 3777-3782 (2002).
204. CATERA R, M.A., KOLITZ JE, *et al.* Somatic hypermutation in stereotyped subset 4 BcRs/mAbs of CLL patients, expressing IGHV4-34 gene, edits anti-DNA reactivity. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **116**, 2444 (2010).
205. DeKosky, B.J., *et al.* High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nature biotechnology* **31**, 166-169 (2013).
206. Gounari M, N.S., Chu CC, *et al.* Promiscuous antigen reactivity may underlie clinical aggressiveness and increased risk for Richter's syndrome in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-39/IGKV1(D)-39 B cell receptors. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **120**, 561 (2012).
207. Taylor, J.J., Pape, K.A. & Jenkins, M.K. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *The Journal of experimental medicine* **209**, 597-606 (2012).
208. Phan, T.G., *et al.* B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells. *The Journal of experimental medicine* **197**, 845-860 (2003).
209. Vardi, A., *et al.* Restrictions in the T-cell repertoire of chronic lymphocytic leukemia: high-throughput immunoprofiling supports selection by shared antigenic elements. *Leukemia* **accepted for publication**(2016).
210. Vardi, A., *et al.* Antigen Selection Shapes the T-cell Repertoire in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **22**, 167-174 (2016).
211. Hashimoto, S., *et al.* Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1507-1517 (1995).
212. Dighiero, G. & Hamblin, T.J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **371**, 1017-1029 (2008).

213. Tobin, G., *et al.* Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **104**, 2879-2885 (2004).
214. Burger, J.A., *et al.* Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine* **373**, 2425-2437 (2015).
215. Brown, J.R., *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib with chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **125**, 2915-2922 (2015).
216. Brown, J.R., *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 3390-3397 (2014).
217. Gorgun, G., Holderried, T.A., Zahrieh, D., Neuberg, D. & Gribben, J.G. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1797-1805 (2005).
218. Ramsay, A.G., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of clinical investigation* **118**, 2427-2437 (2008).
219. Bagnara, D., *et al.* A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* **117**, 5463-5472 (2011).
220. Ramsay, A.G., Clear, A.J., Fatah, R. & Gribben, J.G. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* **120**, 1412-1421 (2012).
221. Ramsay, A.G., *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* **121**, 2704-2714 (2013).
222. Devereux, S. Two-faced T cells in CLL. *Blood* **117**, 5273-5274 (2011).
223. Zenz, T. Exhausting T cells in CLL. *Blood* **121**, 1485-1486 (2013).
224. Totterman, T.H., Carlsson, M., Simonsson, B., Bengtsson, M. & Nilsson, K. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood* **74**, 786-792 (1989).
225. Foa, R., *et al.* Interleukin 2 (IL 2) and interferon-gamma production by T lymphocytes from patients with B-chronic lymphocytic leukemia: evidence that normally released IL 2 is absorbed by the neoplastic B cell population. *Blood* **66**, 614-619 (1985).
226. Cantwell, M., Hua, T., Pappas, J. & Kipps, T.J. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine* **3**, 984-989 (1997).
227. Rossi, E., *et al.* Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **10**, 494-497 (1996).
228. Farace, F., *et al.* T cell repertoire in patients with B chronic lymphocytic leukemia. Evidence for multiple in vivo T cell clonal expansions. *Journal of immunology* **153**, 4281-4290 (1994).
229. Rezvany, M.R., *et al.* Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood* **94**, 1063-1069 (1999).
230. Goolsby, C.L., Kuchnio, M., Finn, W.G. & Peterson, L. Expansions of clonal and oligoclonal T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia are primarily restricted to the CD3(+)CD8(+) T-cell population. *Cytometry* **42**, 188-195 (2000).
231. Shanafelt, T.D., *et al.* Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemoimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* **121**, 4137-4141 (2013).
232. van Dongen, J.J., *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in

- suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**, 2257-2317 (2003).
233. Krzywinski, M., *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research* **19**, 1639-1645 (2009).
 234. Miles, J.J., *et al.* CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *J Immunol* **175**, 3826-3834 (2005).
 235. Baliakas P, H.A., Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, *et al.* Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol* **1**, e74-84 (2014).
 236. Vardi, A., *et al.* IgG-switched CLL has a distinct immunogenetic signature from the common MD variant: ontogenetic implications. *Clin Cancer Res* **20**, 323-330 (2013).
 237. Chu, C.C., *et al.* Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood* **115**, 3907-3915 (2010).
 238. Arstila, T.P., *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958-961 (1999).
 239. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* **4**, 123-132 (2004).
 240. Tynan, F.E., *et al.* A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nature immunology* **8**, 268-276 (2007).
 241. Hermouet, S., *et al.* Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* **17**, 185-195 (2003).
 242. Kostareli, E., *et al.* Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia* **23**, 919-924 (2009).
 243. Venturi, V., *et al.* Sharing of T cell receptors in antigen-specific responses is driven by convergent recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18691-18696 (2006).
 244. Quigley, M.F., *et al.* Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19414-19419 (2010).
 245. McClanahan, F., *et al.* PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **126**, 203-211 (2015).
 246. McClanahan, F., *et al.* Mechanisms of PD-L1/PD-1-mediated CD8 T-cell dysfunction in the context of aging-related immune defects in the Emicro-TCL1 CLL mouse model. *Blood* **126**, 212-221 (2015).
 247. Caligaris-Cappio, F. & Ghia, P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 4497-4503 (2008).