

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



-ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ-

**Μελέτη του ρεπερτορίου των γονιδίων της β αλυσίδας
του υποδοχέα των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων σε
ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία**

Ιωάννα - Σεμέλη Μαστροδήμου

❖ Υπεύθυνη καθηγήτρια: Ελένη Παπαδάκη, Καθηγήτρια Αιματολογίας
Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Αιματολογίας κ. Ελένης Παπαδάκη. Πρώτα από όλους ευχαριστώ θερμά την ίδια για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ερευνητικά αλλά και επαγγελματικά. Για την δυνατότητα που μου έδωσε αυτά τα χρόνια να μάθω πολλά διαφορετικά πράγματα καινούρια σε μένα, τη σημαντική βοήθεια και τα κίνητρα που μου παρείχε τα οποία με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη διατριβή μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον κ. Α. Ηλιόπουλο, τον κ. Χ. Ποντίκογλου, τον Γ. Γουλιέλμο, τον Γ. Μπερτσιά, τον κ. Π. Σιδηρόπουλο και ιδιαίτερα τον κύριο Κώστα Σταματόπουλο που χωρίς τη βοήθεια του η παρούσα μελέτη δε θα είχε ολοκληρωθεί.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Σταλικά η οποία ήταν υπεύθυνη για την εκπαίδευσή μου σε αρκετές τεχνικές που χρειάστηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αλλά και για την επιστημονική συμβολή της σε επίλυση δυσκολιών ή αποριών που παρουσιαζόταν κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων και ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλους τους συναδέλφους που πέρασαν όλα αυτά τα χρόνια από το εργαστήριο που ο καθένας με τον τρόπο του συνέλαβαν να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου, να διαμορφώσω τον χαρακτήρα μου και τον τρόπο εργασίας μου, πράγματα που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κώστα και τα ανίψια μου Χρήστο και Σοφία που πάντα με έκαναν να ξεχνάω τα προβλήματά μου.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την αδερφή μου Νίκη που αποτελεί πάντα παράδειγμα για μένα και οι συμβουλές της επιστημονικές και προσωπικές είναι ανεκτίμητες και φυσικά ένα ευχαριστώ δεν θα είναι ποτέ αρκετό στη μητέρα μου Σοφία για όλη την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά για τις αρχές που έδωσε, για όλα τα πράγματα που με έμαθε για να μπορώ να ανταπεξέρχομαι σε όλες τις δυσκολίες και να μην το βάζω κάτω...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|------|
| Ευχαριστίες | iii |
| Περιεχόμενα | iv |
| Περίληψη | vi |
| Abstract..... | vii |
| Συντμήσεις | viii |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 01 |
| 1.1 Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (CIN) | 01 |
| 1.1.1 Ορισμός..... | 01 |
| 1.1.2 Παθογένεια – μελέτες – ευρήματα | 01 |
| 1.1.2.1 Διαγνωστικά κριτήρια | 01 |
| 1.1.2.2 Επιδημιολογία – κλινικά δεδομένα..... | 02 |
| 1.1.2.3 Εργαστηριακά ευρήματα | 02 |
| 1.1.3 Παθοφυσιολογία | 02 |
| 1.2 T κυτταρικός υποδοχέας (TR) | 04 |
| 1.2.1 Εισαγωγή | 04 |
| 1.2.2 αβ τ κυτταρα..... | 04 |
| 1.2.3 Δομή των αλυσίδων του T κυτταρικού υποδοχέα..... | 05 |
| 1.2.4 Σύμπλοκο TR-CDR3 | 06 |
| 1.2.5 Χρωμοσωμική εντόπιση γονιδίων της β αλυσίδας του TR, οργάνωση και πιθανό ρεπερτόριο | 07 |
| 1.2.6 Σύνθεση αλυσίδων του TR | 08 |
| 1.2.7 Συνδυαστική ποικιλότητα..... | 09 |
| 1.2.8 Συνδετική ποικιλότητα | 10 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 12 |
| 3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 13 |
| 3.1 Ασθενείς..... | 13 |
| 3.2 Δείγματα αίματος και μυελού..... | 14 |
| 3.3 Κυτταρομετρία ροής για την μελέτη του TCR | 15 |
| 3.4 Απομόνωση των CD8 ⁺ T-κυττάρων | 18 |
| 3.5 Απομόνωση γενωμικού DNA ή ολικού κυτταρικού RNA | 20 |
| 3.5.1 Απομόνωση γενωμικού DNA | 21 |
| 3.5.2 Απομόνωση ολικού RNA..... | 22 |
| 3.6 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT) | 24 |

| | |
|--|----|
| 3.7 Ενίσχυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανάλυση αλληλουχίας των TRBV-TRBD-TRBJ γονιδιακών αναδιατάξεων | 25 |
| 3.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 25 |
| 3.7.2 Κλωνοποίηση | 28 |
| 3.7.2.1 Ενσωμάτωση ενθέματος (Ligation) | 28 |
| 3.7.2.2 Μετασχηματισμός (Transformation) | 29 |
| 3.7.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA | 30 |
| 3.7.4 Ενίσχυση ενθέματος από πλασμιδιακό DNA | 31 |
| 3.7.5 Ανάλυση αποτελεσμάτων | 32 |
| 3.8 Ορισμοί | 32 |
| 3.9 Στατιστική ανάλυση | 33 |
| 3.10 Τυποποίηση HLA | 33 |
| 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 34 |
| 4.1 Κυτταρομετρία ροής για την μελέτη του TCR | 34 |
| 4.2 Τα CD8 ⁺ κύτταρα των ασθενών με CIN εκφράζουν ένα περιορισμένο ρεπερτόριο TRB γονιδίων | 36 |
| 4.3 Κοινοί κλωνότυποι μεταξύ διαφορετικών ασθενών | 39 |
| 4.4 Σύγκριση με αλληλουχίες δημόσιων βάσεων δεδομένων | 41 |
| 4.5 HLA τυποποίηση | 42 |
| 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 45 |
| 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 48 |
| 7.ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ | 52 |

Περίληψη

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN) είναι διαταραχή της κοκκιώδους σειράς που χαρακτηρίζεται από χαμηλό αριθμό ουδετεροφίλων, κυριαρχεί κυρίως στις γυναίκες και συνήθως έχει καλοήγη πορεία χωρίς επιπλοκές. Σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου έχει η παρουσία των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων με μυελοκατασταλτικές ιδιότητες τόσο στο αίμα όσο στο μυελό των οστών. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αυξημένο αριθμό ολιγο-/ μονο-κλωνικών T κυτταρικών υποπληθυσμών, κυρίως των CD8⁺, στο αίμα αλλά και στο μυελό των οστών ασθενών με CIN.

Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκε συστηματικά το ρεπερτόριο του γονιδίου της β αλυσίδας του T κυτταρικού υποδοχέα (TRB) στα CD8⁺ κύτταρα σε 34 ασθενείς με CIN με την μέθοδο υποκλωνοποίησης και αλληλούχιση κατά Sanger των γονιδιακών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ. Παρατηρήθηκε έντονη επιλεκτικότητα και ολιγοκλωνικότητα. Βρέθηκαν κοινοί κλωνότυποι σε διαφορετικούς ασθενείς, υποδεικνύοντας επιλογή από κοινό αντιγόνο. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων από την αλληλούχιση των TRB αναδιατάξεων με δημόσιες βάσεις δεδομένων για TRB αλληλουχίες δείχνουν ότι η CIN σπάνια εμφανίζει κοινά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά με άλλες νοσολογικές οντότητες. Με βάση τα συγκεκριμένα ευρήματα υποστηρίζεται η άποψη ότι η νόσος πιθανόν αναπτύσσεται μετά από μακροπρόθεσμη έκθεση σε περιορισμένο σύνολο ειδικών αντιγόνων που σχετίζονται με CIN.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη προσφέρει τεκμηριωμένες ενδείξεις ότι το ρεπερτόριο TRB στο CIN είναι έντονα επιλεκτικό. Το εύρημα των εκπτώξεων ολιγοκλωνικών T-κυττάρων και των «δημόσιων» κλωνοτύπων υποδηλώνει ότι άνοσες αποκρίσεις που υποκινούνται από αντιγόνο εμπλέκονται στην παθογένεση της CIN.

Abstract

Chronic idiopathic neutropenia (CIN) is an acquired disorder of granulopoiesis characterized by female predominance and mostly uncomplicated course. Crucial to CIN pathophysiology is the presence of activated T lymphocytes with myelosuppressive properties in both peripheral blood (PB) and bone marrow (BM). Preliminary evidence indicates that oligoclonal/monoclonal T-cell expansions may be detected, mainly within the CD8⁺ cells, in both the PB and BM of CIN patients.

Here we systematically profiled the T-cell receptor beta chain (TRB) gene repertoire in CD8⁺ cells of 34 CIN patients through subcloning/Sanger sequencing analysis of TRBV-TRBD-TRBJ gene rearrangements. Remarkable repertoire skewing and oligoclonality were observed. Shared (“stereotyped”) clonotypes were found between different patients, indicating selection by common antigenic elements. Cross-comparison of our TRB sequence dataset with public TRB sequence databases indicated that CIN may rarely share common immunogenetic features with other entities. However, the CIN TRB repertoire was largely disease-biased, suggesting that CIN may be driven by longterm exposure to a restricted set of specific CIN-associated antigens.

Overall, the present study offers conclusive evidence that the TRB repertoire in CIN is skewed. The finding of oligoclonal T-cell expansions and public clonotypes strongly indicates that antigen-driven immune responses are likely implicated in the pathogenesis of CIN.

Πίνακας συντμήσεων

| | |
|----------------|--|
| IFN γ | Interferon γ |
| ACD | Citrate Dextrose formula-A |
| BM | Bone Marrow |
| BMMCs | Bone Marrow Mononuclear Cells |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| C | Constant |
| CDR3 | Complementarity-Determining Region 3 |
| CIN | Chronic Idiopathic Neutropenia |
| D | Diversity |
| EDTA | EthyleneDiamineTetraacetic Acid |
| FITC | Fluorescein IsoThioCyanate |
| FSC | Forward Scatter |
| GAT | Granulocyte Agglutination Technique |
| GIFT | Granulocyte ImmunoFluorescence Technique |
| HLA | Human Leukocyte Antigens |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium |
| IPTG | IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside |
| J | Joining |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| PB | Periferal Blood |
| PBMCs | Periferal Blood Mononuclear Cells |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PC5 | PhycoerythrinCyanin 5.1 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PE | PhycoErythrin |
| PFA | ParaFormAldeyede |
| SD | Standard Deviation |
| SSC | Side Scatter |
| TAE | Tris base, Acetate acid, EDTA |
| TCR | T-Cell Receptor |
| TGF- β 1 | Transforming Growth Factor β 1 |
| TNF α | Tumor Necrosis Factor α |
| V | Variable |
| WFI | Water For Injection |
| X-GAL | BCIG, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία

1.1.1 Ορισμός

Η χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία (Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN) είναι σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας ανοσολογικής αρχής χαρακτηριζόμενο από εμμένουσα ουδετεροπενία χωρίς εμφανή υποκείμενη αιτία. Αποτελεί το 30% των περιπτώσεων «ανεξήγητης» ουδετεροπενίας (Dale et al, 1991; Papadaki et al, 2001).

1.1.2 Παθογένεια - μελέτες - ευρήματα

1.1.2.1 Διαγνωστικά κριτήρια

Όλα τα παρακάτω πρέπει να πληρούνται (Papadaki HA *et al*, 2003; Palmblad *et al*, 2008; Papadaki *et al*, 2008):

- οι μετρήσεις των ουδετεροφίλων των ασθενών να είναι $< 1.80 \times 10^9/l$ για πάνω από 3 μήνες
- οι ασθενείς να μην έχουν καμία κλινική/εργαστηριακή ένδειξη για υποκείμενο νόσημα το οποίο να σχετίζεται με ανάπτυξη ουδετεροπενίας
- να μην υπάρχει ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία, χρήσης χημικών ουσιών ή φαρμάκων που να σχετίζονται με ουδετεροπενία,
- οι ασθενείς να έχουν φυσιολογικό καρυότυπο μυελού των οστών
- οι ασθενείς να ελέγχονται αρνητικοί για αντι- πολυμορφοπυρηνικά αντισώματα με δύο μεθόδους αναφοράς (granulocyte agglutination technique, GAT και granulocyte immunofluorescence technique, GIFT).

1.1.2.2 Επιδημιολογία – κλινικά δεδομένα

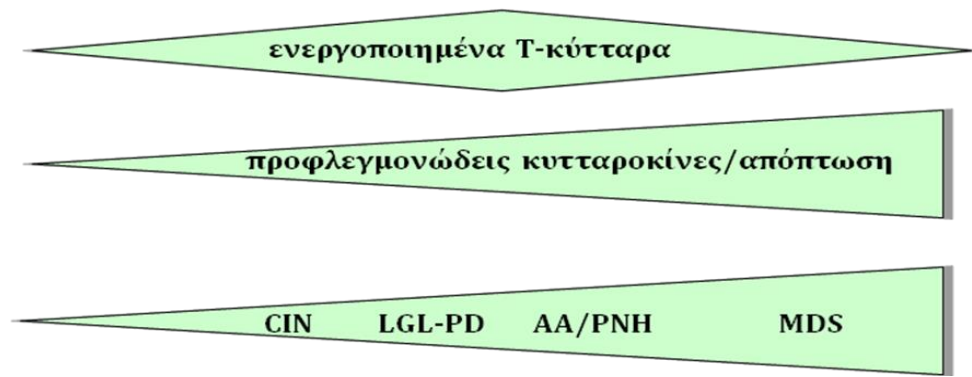
Η CIN εμφανίζεται στον γενικό πληθυσμό με συχνότητα 1,67%. Η νόσος αφορά κυρίως γυναίκες (ποσοστό 84,5%) μέσης ηλικίας και συνοδεύεται συχνά από οστεοπενία (κατά 44,4%) και οστεοπόρωση (κατά 15,6%). Γενικά, ακολουθεί καλοήγη πορεία χωρίς επιπλοκές με σπάνιες περιπτώσεις εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (Dale *et al*, 1991; Papadaki *et al*, 2001; Papadaki *et al*, 2008; Palmblad *et al*, 2008).

1.1.2.3 Εργαστηριακά ευρήματα

Οι ασθενείς με CIN παρουσιάζουν αναιμία (14,2%) λόγω αυξημένης απόπτωσης προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, ήπια θρομβοπενία (10%) εξαιτίας αυξημένων επιπέδων TGF-β1 (transforming growth factor β1) στο μυελό των οστών (bone marrow, BM), μονοκυτταροπενία (10%) λόγω χαμηλής συχνότητας κοινών προγόνων μονοκυτταρικής/κοκκιοκυτταρικής σειράς (Psyllaki M, 2006) και T λεμφοπενία (37%) εξαιτίας χαμηλών επιπέδων IL-7 που οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των CD8+ κυττάρων (Gemetzi C, 2011).

1.1.3 Παθοφυσιολογία

Η παθογένεια της CIN έχει συνδεθεί με αύξηση παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών π.χ. TNFα (tumor necrosis factor α), IFNγ (interferon γ), IL(interleukin)-1β, IL-6, TGF-β1 και Fas-ligand στον BM. Οι κυτταροκίνες αυτές επάγουν την απόπτωση των κοκκιοκυτταρικών προγονικών κυττάρων του μυελού μέσω Fas με αποτέλεσμα την ελάττωση της απελευθέρωσης των ουδετεροφίλων στο αίμα (Papadaki HA *et al*, 1999; Papadaki HA *et al*, 2003). Η κύρια πηγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών στον μυελό των οστών ασθενών με CIN είναι T κυτταρικοί πληθυσμοί με ενεργοποιημένο φαινότυπο και μυελοκατασταλτικές ιδιότητες (Papadaki *et al*, 2005). Αυτό υποδεικνυεί ότι η CIN έχει κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά με άλλα επίκτητα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας ανοσολογικής αρχής όπως η απλάστική αναιμία και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Palmblad *et al*, 2008) και μπορεί να αντιπροσωπεύει την ήπια μορφή στο φάσμα αυτών των νοσημάτων.



Μολαταύτα, το γενεσιουργό γεγονός για την υποκείμενη ενεργοποίηση των Τ κυττάρων στη CIN παραμένει άγνωστο.

Στην προσπάθεια να διερευνηθεί το αίτιο ενεργοποίησης των Τ κυττάρων μελετήθηκε το ρεπερτόριο της β αλυσίδας του Τ κυτταρικού υποδοχέα (T-Cell Receptor Vβ, TCRVβ) με κυτταρομετρία ροής. Η μελέτη αυτή υπέδειξε την παρουσία ανοσοεπικρατών CD8⁺ κλώνων (immunodominant clones) στο αίμα ή/και το μυελό στο 89% των ασθενών με CIN έναντι 30% σε φυσιολογικούς μάρτυρες ανάλογης ηλικίας και φύλου. Περαιτέρω διερεύνηση για ολιγο/μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό πρότυπο έκπτυξης των ανοσοεπικρατών CD8⁺ πληθυσμών των ασθενών με multiplex PCR και μοριακή φασματοσκοπία της υπερμεταβλητής περιοχής 3 (Complementarity-determining region 3, CDR3) αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ ανέδειξε ολιγοκλωνικούς και σπανιότερα μονοκλωνικούς CD8⁺ υποπληθυσμούς ενώ στους CD4⁺ πληθυσμούς παρατηρήθηκε πολυκλωνικό πρότυπο έκπτυξης (Spanoudakis *et al*, 2010). Τα δεδομένα αυτά δίνουν μια ένδειξη για πιθανή διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων των ασθενών λόγω επίδρασης (άγνωστου) αντιγονικού ερεθισμού.

Ωστόσο, εξαιτίας των εγγενών περιορισμών των εφαρμοζόμενων μεθοδολογιών, η λεπτομερής δυναμική και σύνθεση του ρεπερτορίου του TCR στη CIN παραμένουν άγνωστες.

1.2 Τ κυτταρικός υποδοχέας

1.2.1 Εισαγωγή

Κατά την έκθεση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο συμβαίνει άμεση ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: μη ειδικοί και ειδικοί. Στους ειδικούς μηχανισμούς εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, η επεξεργασία των πρωτεϊνικών αντιγόνων. Αυτά αρχικά επεξεργάζονται στο κυτταρόπλασμα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (π.χ. μακροφάγα, μονοκύτταρα, Β κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα), μετατρέπονται σε μικρά πεπτίδια και συνδέονται σε μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Τα μόρια MHC εκφράζονται στην επιφάνεια των παραπάνω κυττάρων και συνδέονται με το αντιγόνο (που παρουσιάζουν) με τέτοια ισχύ και συγγένεια ώστε ένα μόριο MHC να μπορεί να συνδεθεί με περισσότερα του ενός πεπτίδια σε διαφορετικές περιπτώσεις (ένα πεπτίδιο κάθε φορά). Το MHC που έχει σημασία στην αντιγονοπαρουσίαση διακρίνεται σε τάξης I και τάξης II και παράλληλα αναγνωρίζεται από τον T κυτταρικό υποδοχέα (T cell receptor, TR). Οι TR είναι επιφανειακοί υποδοχείς κλωνοτυπικά ειδικοί για συγκεκριμένο αντιγόνο, απαραίτητοι για την άνοση απόκριση. Πρόκειται για ετεροδιμερή με μία μόνο περιοχή αναγνώρισης και σύνδεσης με το αντιγόνο.

Η «εκπαίδευση» αναγνώρισης των ίδιων (self) MHC μορίων από τα T κύτταρα πραγματοποιείται στο θύμο αδέν. Ο πιο συνηθισμένος TR αποτελείται από δύο γλυκοζυλιωμένες πολυμορφικές αλυσίδες α και β που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (εικόνα 1) ενώ υπάρχει και άλλος ένας τύπος TR που αποτελείται από αλυσίδες γ και δ.

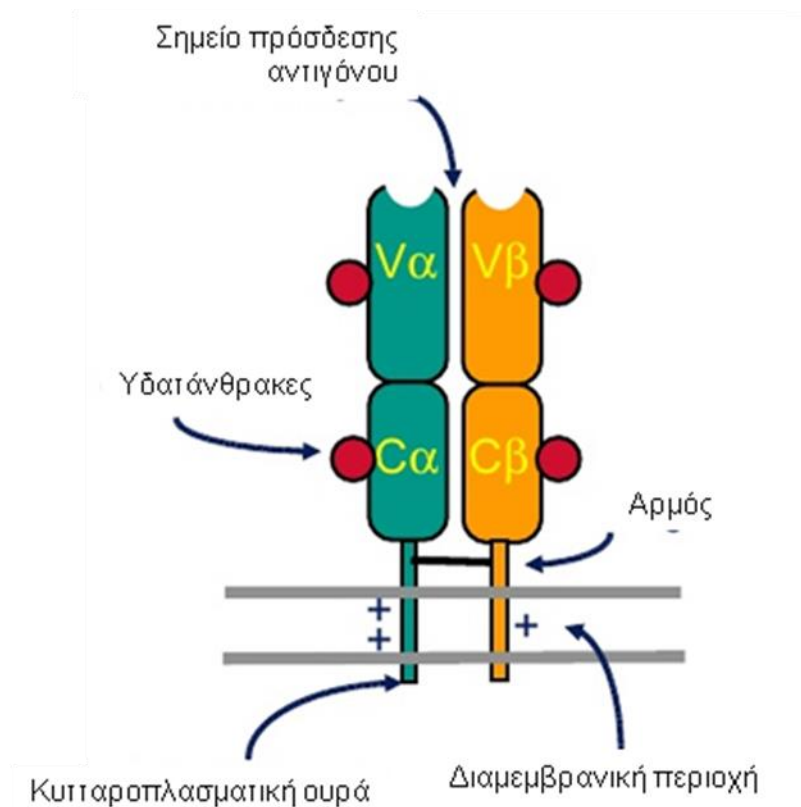
1.2.2 αβ T κύτταρα

Η έκφραση του υποδοχέα αβ αλυσίδων αφορά στο 90-99% των ώριμων T-λεμφοκυττάρων του αίματος. Ο αβ TR σχηματίζει σύμπλεγμα με το μόριο CD3. Οι βασικές υποκατηγορίες των αβ T κυττάρων είναι δύο: βοηθητικά και κυτταροτοξικά. Τα πρώτα αναγνωρίζουν πεπτίδια προερχόμενα κυρίως από εξωγενή αντιγόνα, π.χ. μικροοργανισμούς, τα οποία συνδέονται σε μόρια MHC τάξης II. Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 60% των

T κυττάρων και έχουν ανοσοφαινότυπο $CD3^+CD4^+CD8^-$. Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν πεπτίδια προερχόμενα από ενδογενείς διεργασίες, συνδεόνται με μόρια MHC τάξης I και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και θανάτωση κυττάρων μολυσμένων από ιό ή καρκινικών κυττάρων. Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 30% των T λεμφοκυττάρων και έχουν ανοσοφαινότυπο $CD3^+CD4^-CD8^+$ (Kronenberg M et al, 1986; Harty JT et al, 2000). Το ποσοστό των ώριμων T λεμφοκυττάρων με έκφραση γ/δ αλυσίδων στον TR είναι 1-10% (μέσος όρος 3%) στο κλάσμα των $CD3^+CD4^-CD8^-$ T-λεμφοκυττάρων του αίματος.

1.2.3 Δομή των αλυσίδων του T κυτταρικού υποδοχέα

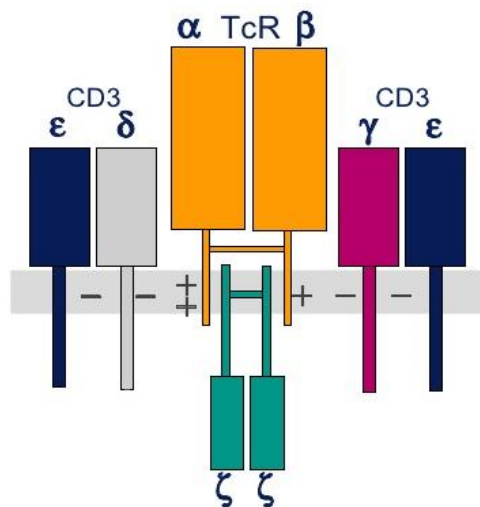
Οι αλυσίδες του TR αποτελούνται από μία αμινο (N) – τελική εξωκυττάρια περιοχή που απαρτίζεται από ένα μεταβλητό τμήμα (104-125αα) και ένα σταθερό τμήμα (91-129αα), ένα συνδετικό πεπτίδιο (21-62αα), μία διαμεμβρανική περιοχή (17-26αα) και μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά (0-7αα) (Lefranc, 1990; 1994).



Εικόνα 1. Δομή του T κυτταρικού υποδοχέα (T-cell receptor, TR).

1.2.4 Σύμπλοκο TR-CDR3

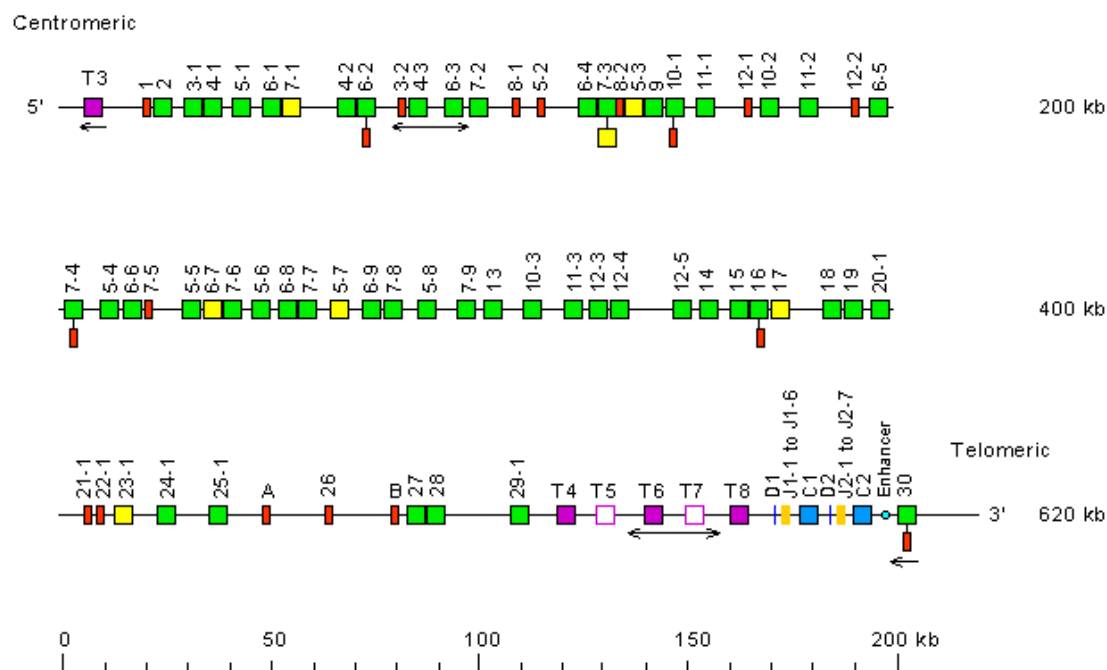
Ένα T κύτταρο δεν μπορεί να αναγνωρίσει αντιγόνο χωρίς σωστή σύσταση του συμπλόκου TR-CD3, επιτυχημένη μεταφορά και έκφρασή του στην επιφάνεια του κυττάρου (Clevers H et al, 1988; Ashwell JD and Klausner RD 1990; Klausner RD et al, 1990). Οι CD3 πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την μεταφορά του μηνύματος σύνδεσης του αντιγόνου στον TR στα ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης σήματος. Εκτός από τα ετεροδιμερή αβ ή γδ τα οποία είναι μοναδικές δομές για κάθε κλώνο των T κυττάρων, το σύμπλοκο TR-CD3 αποτελείται από επιπλέον μη πολυμορφικές CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ και CD3η πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πανομοιότυπες για όλα τα κύτταρα (Clevers H et al, 1988; Ashwell JD and Klausner RD 1990) (εικόνα 2). Οι κυτταροπλασματικές περιοχές των αλυσίδων του CD3 είναι μακρύτερες από τις αντίστοιχες του TR και, όπως προαναφέρθηκε, έχουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τα κυτταροπλασματικά μόρια που εμπλέκονται στη μεταβίβαση του σήματος από την πρόσδεση του αντιγόνου.



Εικόνα 2. Σύμπλοκο TR-CD3

Η σύνδεση των ξεχωριστών αλυσίδων του TR γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ξεκινά λίγο μετά τη βιοσύνθεσή τους. Το ολοκληρωμένο σύμπλοκο TR-CD3 μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η πρόσδεση κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης π.χ. p56lck, p59fyn και Zap-70 σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του συμπλόκου TR-CD3 μετά τη διέγερση του TR και συμβάλλει στη μεταβίβαση σήματος (εικόνα 3).

2 γονίδια TRBD, (12-13) TRBJ τα οποία ανήκουν σε δύο ομάδες και 2 γονίδια TRBC.



Εικόνα 5: Η διάταξη των γονιδίων στο γενετικό τόπο της β αλυσίδας του T κυτταρικού υποδοχέα. Προέλευση: <http://www.imgt.org/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes>.

1.2.6 Σύνθεση αλυσίδων του TR

Η σύνθεση των αλυσίδων του TR γίνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των T κυττάρων στο θύμο αδένα. Ο θύμος είναι απαραίτητος για την αρχική δημιουργία της δεξαμενής των περιφερικών κυττάρων που εκφράζουν TR αβ ή γδ. Η σταθερή περιοχή (Constant, C) των TR κωδικοποιείται από ένα σταθερό γονίδιο, ενώ η μεταβλητή περιοχή (Variable και Joining, V-J για α ή γ αλυσίδα και, V, Diversity, και J, V-D-J για β ή δ αλυσίδα) κωδικοποιείται από τη σύνδεση μη συνεχόμενων γονιδίων.

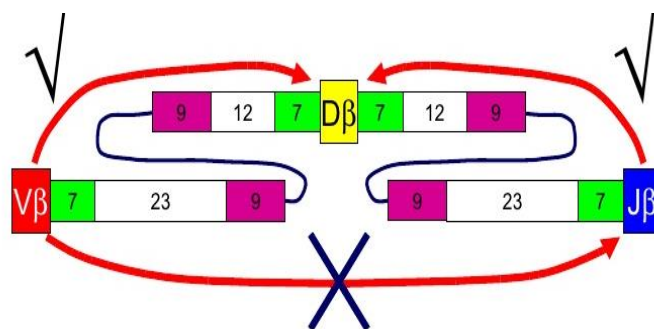
Τρεις CDR περιοχές καθορίζουν την αναγνώριση και την πρόσδεση του αντιγόνου, στην τρισδιάστατη δομή. Οι CDR1 και CDR2 κωδικοποιούνται από τα V γονίδια, ενώ η γενετική αλληλουχία για την CDR3 δημιουργείται στις συνδέσεις των V-(D)-J. Για τη σύνθεση της β αλυσίδας του TR, απαιτούνται

δύο επιτυχημένες αναδιατάξεις: σύνδεση μεταξύ D και J γονιδίων και επακόλουθη σύνδεση μεταξύ V γονιδίου και του συμπλόκου D-J.

Η ποικιλότητα των αλυσίδων του TR εξαρτάται από δύο μηχανισμούς: συνδυαστική ποικιλότητα, που είναι αποτέλεσμα του αριθμού των V, D, J γονιδίων, και συνδετική ποικιλότητα, που δημιουργεί εκτεταμένη και κλωνική ποικιλότητα στις συμβολές V-D-J.

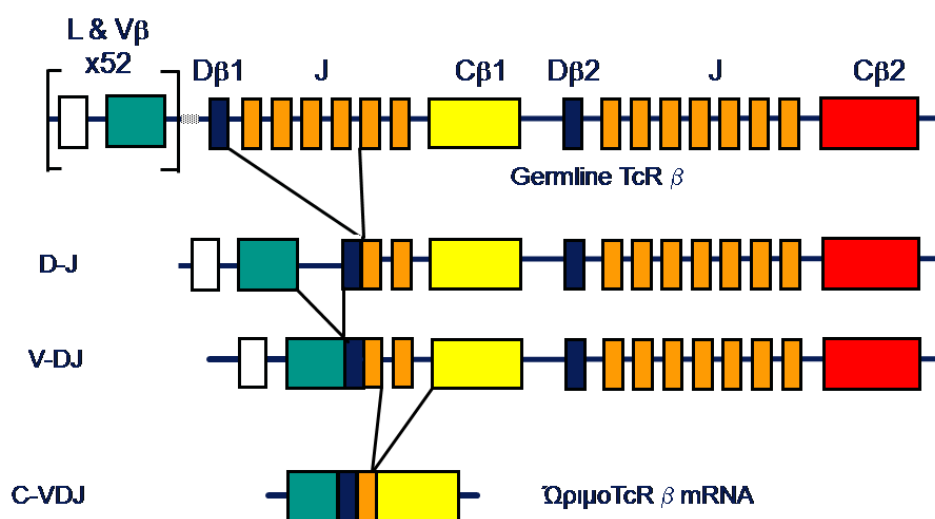
1.2.7 Συνδυαστική ποικιλότητα

Κάθε γονίδιο που μπορεί να αναδιαταχθεί φέρει μια αλληλουχία-σήμα του ανασυνδυασμού (RSS, recombination signal sequence) (Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Immunology 5 th Edition; Lewis SM. 1994; Ramsden DA, et al, 1994). Οι RSS αποτελούνται από ένα καλά συντηρημένο παλίνδρομο επτανουκλεοτίδιο (heptamer) (5'-CACTGTG-3'), ένα καλά συντηρημένο εννεανουκλεοτίδιο (nonamer) (5'-ACAAAAACC-3'), πλούσιο σε A ή T και ανάμεσα τους μια διαστηματική αλληλουχία (spacer region) μήκους 12 ή 23 νουκλεοτιδίων (± 1 νουκλεοτίδιο) με συντηρημένο μήκος αλλά χωρίς συντηρημένη αλληλουχία. Το μήκος της διαστηματικής αλληλουχίας παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση. Για να συμβεί αποτελεσματικός ανασυνδυασμός απαιτούνται δύο αλληλουχίες RSS, μια με διαστηματική αλληλουχία 12-bp και μια με 23-bp. Αυτός ο σχετικά απλός περιορισμός, γνωστός ως «κανόνας 12/23», έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες. Πρώτον, όλα τα γονίδια ενός συγκεκριμένου είδους περιβάλλονται από έναν τύπο αλληλουχίας RSS και, δεύτερον, όλα τα γονίδια με τα οποία θα μπορούσε ν' αναδιαταχθούν φέρουν τον αντίθετο τύπο αλληλουχίας. Έτσι, διασφαλίζεται ότι ο ανασυνδυασμός οδηγεί σε λειτουργικό προϊόν.



Εικόνα 6: Ο «κανόνας 12/23»

Σε μοριακό επίπεδο, πρώτα ένα από τα γονίδια TRBD ενώνεται με τα ένα από τα γονίδια TRBJ με απομάκρυνση του ενδιάμεσου DNA, οπότε δημιουργείται ένα σύμπλοκο D-J. Σε δεύτερο χρόνο, ένα από τα γονίδια TRBV ενώνεται με το σύμπλοκο D-J με απομάκρυνση του ενδιάμεσου DNA, δημιουργώντας ένα ολοκληρωμένο ανασυνδυασμένο γονίδιο TRBV-TRBD-TRBJ. Ακολουθεί μεταγραφή του γενετικού συμπλόκου TR VDJ, επεξεργασία και συρραφή του προ-mRNA (RNA splicing), μετάφραση του ώριμου mRNA σε πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσωμάτια και μετασυνθετική τροποποίηση των αντίστοιχων πεπτιδίων (κυρίως με γλυκοζυλίωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο). Κάθε γονίδιο V φέρει στο 5' άκρο του ένα μικρό εξόνιο, την αλληλουχία-οδηγό (leader). Αυτό κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός μικρού πεπτιδίου-σήματος ή οδηγού (signal ή leader L peptide). Το πεπτίδιο-οδηγός τελικά αφαιρείται από μια πεπτιδάση μετά την είσοδο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης της β αλυσίδας του TR.

1.2.8 Συνδετική ποικιλότητα

Η ποικιλότητα που δημιουργείται από την προσθαφαίρεση νουκλεοτιδίων στις συμβολές των αναδιατασσόμενων γονιδίων κατά τον ανασυνδυασμό V(D)J καλείται συνδετική (junctional diversity). Επειδή σε κάθε αναδιάταξη η συμβολή των γονιδίων V(D)J περιλαμβάνεται στην περιοχή CDR3, οι διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων των περιοχών CDR3 είναι περισσότερες

από αυτές που μπορεί να κωδικοποιηθούν από τα γονίδια V, J και D της γαμετικής σειράς. Οι γονιδιακές αναδιατάξεις των αντιγονικών υποδοχέων TR είναι χαρακτηριστικές των ξεχωριστών κλώνων λεμφοκυττάρων και, χάρη στη μοναδικότητά τους, αποτελούν ένα είδος «μοριακής ταυτότητας» των αντίστοιχων κλώνων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δημιουργίας ποικιλότητας από την προσθήκη και αφαίρεση νουκλεοτιδίων στις συνάψεις κατά τον ανασυνδυασμό V(D)J.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ευρήματα προηγούμενης μελέτης ανάλυσης του ρεπερτορίου της μεταβλητής περιοχής της β αλυσίδας του TCR με κυτταρομετρία ροής και φασματομετρία σε ασθενείς με CIN, ανέδειξαν ολιγοκλωνικούς / μονοκλωνικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Spanoudakis M, et al; 2010). Η παρουσία αυτών των πληθυσμών θα μπορούσε να υποστηρίξει το γεγονός ότι η CIN είναι μια T-επαγόμενη διαταραχή ανοσολογικού χαρακτήρα, καθώς και να πιθανολογήσει την ύπαρξη υπεύθυνου/ων για την διαταραχή αντιγόνου/ων.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τον TR στα T κυτταροτοξικά κύτταρα καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με CIN με αλληλούχιση των ανασυνδυασμών του γενετικού τόπου TRB. Σκοπός της μελέτης ήταν η ενδεδειγμένη ανάλυση της κλωνοτυπικής αλληλουχίας της TRB CDR3 περιοχής για την αναγνώριση της μοριακής ταυτότητας (κλωνοτύποι) των κυτταροτοξικών πληθυσμών. Η πιθανότητα ύπαρξης κοινού κλωνοτύπου μεταξύ ασθενών θα ήταν μια ένδειξη ύπαρξης κοινού αντιγόνου υπευθύνου για την παθογένεια/παθοφυσιολογία της CIN.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ασθενείς

Στη μελέτη εντάχθηκαν 34 ασθενείς με CIN (29 γυναίκες και 5 άνδρες), ηλικίας 20-82 ετών (διάμεση ηλικία 49 έτη). Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου (Papadaki HA *et al*, 2003; Palmblad *et al*, 2008; Papadaki *et al*, 2008). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς είχαν αριθμό ουδετεροφίλων $< 1.80 \times 10^9/l$ (μέσος όρος $1.34 \pm 0.36 \times 10^9/l$, εύρος $0.40 - 1.70 \times 10^9/l$), διάρκεια νόσου 16 έως 322 μήνες (μέση διάρκεια 100 μήνες) και δεν είχαν καμία κλινική/ εργαστηριακή ένδειξη για υποκείμενο νόσημα το οποίο να σχετίζεται με ανάπτυξη ουδετεροπενίας. Δεν είχαν ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία, χρήσης χημικών ουσιών ή φαρμάκων που να σχετίζεται με ουδετεροπενία, είχαν φυσιολογικό καρυότυπο μυελού των οστών και αρνητικά αντι-πολύμορφο-πυρηνικά αντισώματα (GAT, GIFT).

Ασθενείς με κυκλική και οικογενή ουδετεροπενία εξαιρέθηκαν από τη μελέτη μετά από τεκμηρίωση της νόσου με διαδοχικές απαριθμήσεις των ουδετερόφιλων στους ασθενείς και τα μέλη των οικογενειών τους. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών δίνονται αναλυτικά στον πίνακα 1. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε συμπτώματα ή σημεία λοίμωξης την ημέρα της δειγματοληψία και 3 μήνες πριν.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου με Αριθμό Πρωτοκόλλου 13103 και όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση σύμφωνα με το Πρωτόκολλο του Ελσίνκι.

Πίνακας 1. Δημογραφικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών υπό μελέτη.

| A/A | Ηλικία (έτη) | Φύλο | Διάρκεια CIN (μήνες) | Hb (g/dl) | WBC ($\times 10^9/L$) | Neutro ($\times 10^9/L$) | Lympho ($\times 10^9/L$) | Mono ($\times 10^9/L$) | Plts ($\times 10^9/L$) |
|-----|-----------------|------|----------------------------|--------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 61 | Θ | 36 | 13.5 | 3.6 | 1.6 | 1.7 | 0.2 | 165 |
| 2 | 40 | Θ | 78 | 13.8 | 4.3 | 1.6 | 1.8 | 0.8 | 261 |
| 3 | 27 | Θ | 58 | 12.2 | 4.1 | 1.6 | 2.2 | 0.2 | 140 |
| 4 | 35 | A | 60 | 16.8 | 3.5 | 1 | 1.7 | 0.6 | 183 |
| 5 | 36 | Θ | 96 | 11.5 | 3.8 | 1 | 1.3 | 0.3 | 271 |
| 6 | 79 | Θ | 72 | 12.8 | 3.2 | 1.6 | 0.8 | 0.5 | 182 |
| 7 | 48 | Θ | 204 | 11.7 | 3.7 | 1.6 | 1.8 | 0.3 | 210 |
| 8 | 82 | Θ | 240 | 12.4 | 3.5 | 1.3 | 1.7 | 0.4 | 217 |
| 9 | 59 | Θ | 120 | 14.5 | 3.9 | 1.6 | 1.7 | 0.3 | 292 |
| 10 | 73 | Θ | 130 | 13.5 | 5.1 | 1.3 | 3.2 | 0.6 | 202 |
| 11 | 70 | Θ | 120 | 12.3 | 3.6 | 1.6 | 1.4 | 0.3 | 169 |
| 12 | 55 | Θ | 120 | 13.1 | 3.4 | 1.6 | 1.4 | 0.3 | 132 |
| 13 | 39 | Θ | 60 | 13.5 | 3.5 | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 254 |
| 14 | 63 | Θ | 98 | 13.6 | 3.7 | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 210 |
| 15 | 66 | Θ | 276 | 11.1 | 3.9 | 1.6 | 1.9 | 0.4 | 323 |
| 16 | 44 | Θ | 120 | 12.9 | 2.4 | 1.2 | 0.8 | 0.4 | 161 |
| 17 | 37 | Θ | 118 | 13 | 3.3 | 1.5 | 1.4 | 0.3 | 277 |
| 18 | 53 | Θ | 115 | 14.2 | 2.6 | 0.4 | 1.6 | 0.3 | 313 |
| 19 | 53 | Θ | 120 | 13 | 3.3 | 1.5 | 1.4 | 0.3 | 277 |
| 20 | 60 | Θ | 115 | 11.1 | 3.9 | 1.6 | 1.9 | 0.4 | 323 |
| 21 | 48 | Θ | 22 | 12.8 | 3.1 | 1.1 | 1.5 | 0.4 | 278 |
| 22 | 20 | Θ | 76 | 14.3 | 4.5 | 1.3 | 2.8 | 0.4 | 275 |
| 23 | 62 | Θ | 100 | 12.6 | 3 | 1.5 | 1.1 | 0.3 | 154 |
| 24 | 45 | Θ | 100 | 12.6 | 3 | 1.5 | 1.1 | 0.3 | 154 |
| 25 | 49 | Θ | 16 | 13.8 | 4.2 | 1.6 | 2 | 0.6 | 185 |
| 26 | 70 | Θ | 322 | 11.8 | 3 | 1.6 | 1.1 | 0.3 | 149 |
| 27 | 56 | Θ | 25 | 14.2 | 2.9 | 0.6 | 1.8 | 0.1 | 244 |
| 28 | 51 | A | 180 | 14.1 | 3.7 | 1.6 | 1.6 | 0.5 | 181 |
| 29 | 37 | Θ | 28 | 14.1 | 3.5 | 1.3 | 1.8 | 0.3 | 117 |
| 30 | 47 | A | 50 | 14.8 | 4.3 | 1.6 | 2.5 | 0.2 | 241 |
| 31 | 65 | Θ | 115 | 13 | 3.1 | 1.1 | 1.5 | 0.4 | 278 |
| 32 | 37 | A | 85 | 15.1 | 3 | 0.3 | 2 | 0.4 | 298 |
| 33 | 44 | Θ | 100 | 12.2 | 2.8 | 1.3 | 1.2 | 0.3 | 189 |
| 34 | 56 | Θ | 100 | 13.4 | 2.7 | 0.8 | 1.5 | 0.3 | 193 |

Συντομογραφίες: A/A, αύξοντας αριθμός; Hb, hemoglobin (αιμοσφαιρίνη); WBC, white blood cells (λευκά αιμοσφαίρια αίματος; Neutro, neutrophils (ουδετερόφιλα); Lympho, lymphocytes (λεμφοκύτταρα); Mono, monocytes (μονοκύτταρα); Plts, platelets (αιμοπετάλια).

3.2 Δείγματα αίματος και μυελού

Λήψη φλεβικού αίματος από τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια που περιείχαν ως αντιπηκτικό ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Η επεξεργασία των δειγμάτων γινόταν εντός εικοσιτετραώρου. Επίσης, σε 12 ασθενείς με CIN πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση μυελού των οστών.

Τα δείγματα μυελού των οστών αραιώνονταν σε αναλογία 1:1 σε καλλιεργητικό υλικό Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco Invitrogen Corporation, Paisley, UK) το οποίο είχε εμπλουτιστεί με 100IU/ml penicillin-streptomycin (PS; Gibco) και 10IU/ml ηπαρίνης (Sigma, St Louis, MO, USA).

3.3 Κυτταρομετρία ροής για την μελέτη του TR

Την ημέρα της δειγματοληψίας γινόταν έλεγχος του ρεπερτορίου της μεταβλητής περιοχής της β αλυσίδας (Vβ) του TR με κυτταρομετρία ροής με τη χρήση του IOTest Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (Beckman-Coulter) σε CD8⁺ ή CD3⁺ κύτταρα μετά από εφαρμογή μονοκλωνικού αντισώματος αντι-CD8 (Clone SFC121Thy2D3 (T8), Beckman-Coulter), ή αντι-CD3 (Clone UCHT1, Beckman-Coulter) συνδεδεμένου με phycoerythrin 5.1 (PC5) και ισοτυπικού control IgG₁ PC5 από ποντίκι.

Το παραπάνω kit είναι ένα εργαλείο πολλαπλής ανάλυσης σχεδιασμένο για την ποσοτικοποίηση με κυτταρομετρία ροής του ρεπερτορίου Vβ του TR των T λεμφοκυττάρων του ανθρώπου. Αποτελείται από 8 φιαλίδια που περιέχουν μίγματα από συζευγμένα αντισώματα με phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC) ή PE/FITC έναντι του TR Vβ ρεπερτορίου και αντιστοιχούν σε 24 διαφορετικές ειδικότητες που καλύπτουν το 70% του φυσιολογικού ρεπερτορίου TR Vβ. Η επιλογή της ανάλυσης στα CD8⁺ κύτταρα έγινε λόγω της μεγαλύτερης παρέκκλισής τους από το φυσιολογικό ρεπερτόριο έναντι των CD4⁺ κυττάρων (Spanoudakis M, et al; 2010). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά φιαλίδια των 5ml, στα οποία προστέθηκαν οι ποσότητες αντιδραστηρίων που φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ποσότητες μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ρεπερτορίου της Vβ περιοχής του υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου στα CD8⁺ κύτταρα των ασθενών.

| Φιαλίδιο | Vβ ⁸ (#) | Μίγμα αντιδραστηρίων |
|--------------------|---|--|
| Φιαλίδιο ελέγχου 1 | | 20μl φιαλιδίου A + 10μl IgG ₁ PC5 |
| Φιαλίδιο 2 | | 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο A | Vβ 5.3 (TRBV5-5) Vβ 7.1 (TRBV4-1, TRBV4-2, TRBV4-3) Vβ 3 (TRBV28) | 20μl φιαλιδίου A + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο B | Vβ 9 (TRBV3-1) Vβ 17 (TRBV19) Vβ 16 (TRBV14) | 20μl φιαλιδίου B + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο C | Vβ 18 (TRBV18) Vβ 5.1 (TRBV5-1) Vβ 20 (TRBV30) | 20μl φιαλιδίου C + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο D | Vβ 13.1 (TRBV6-5, TRBV6-6, TRBV6-9) Vβ 13.6 (TRBV6-6) Vβ 8 (TRBV12-3, TRBV12-4) | 20μl φιαλιδίου D + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο E | Vβ 5.2 (TRBV5-6) Vβ 2 (TRBV20-1) Vβ 12 (TRBV10-3) | 20μl φιαλιδίου E + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο F | Vβ 23 (TRBV13) Vβ 1 (TRBV9) Vβ 21.3 (TRBV11-2) | 20μl φιαλιδίου F + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο G | Vβ 11 (TRBV25-1) Vβ 22 (TRBV2) Vβ 14 (TRBV27) | 20μl φιαλιδίου G + 10μl CD8 PC5 |
| Φιαλίδιο H | Vβ 13.2 (TRBV6-2) Vβ 4 (TRBV29-1) Vβ 7.2 (TRBV4-3) | 20μl φιαλιδίου H + 10μl CD8 PC5 |

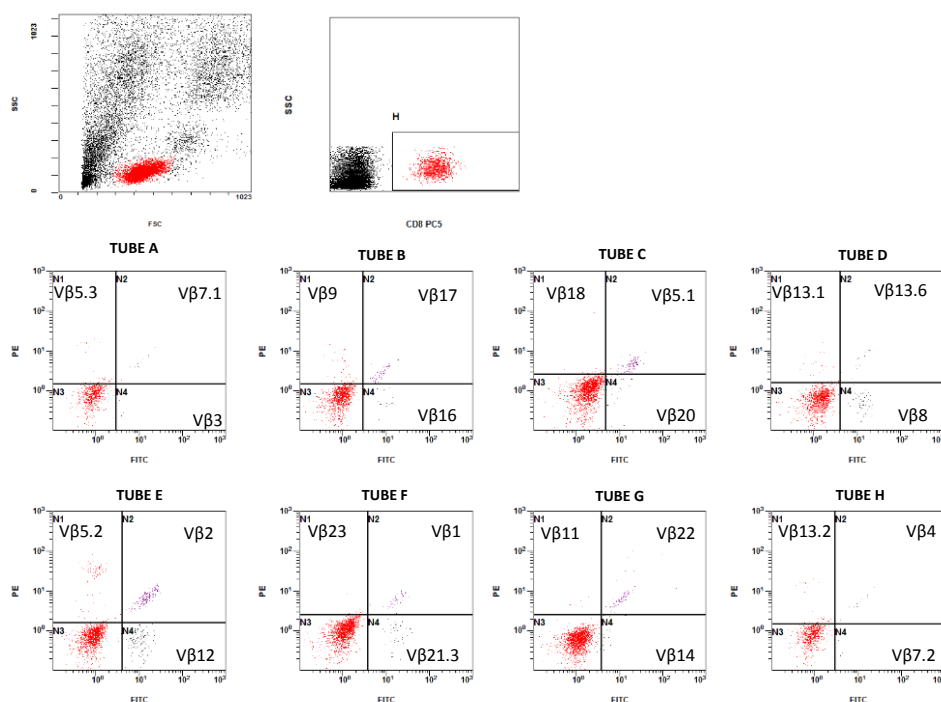
**Nomenclature from Wei et al; 1994*

IMGT nomenclature (Lefranc MP, et al; 1999, Lefranc MP; 2003)

1. Ακολουθούσε η προσθήκη 100μl καλά αναδευμένου δείγματος αίματος ή μυελού στα φιαλίδια.
2. Σύντομη ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 λεπτά, στο σκοτάδι.
3. Λύση των ερυθρών και μονιμοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση λυτικού συστήματος αντιδραστηρίων IMMUNOPREP (Beckman Coulter).

4. Προσθήκη 3ml διαλύματος PBS + 0,5% FBS.
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, σε 1500rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αφαίρεση του υπερκειμένου επανασύσταση του κατακρημνίσματος (pellet) και προσθήκη 200μl παραφορμαλδεΐδης 1% (PFA) για μονιμοποίηση.
7. Ανάλυση του δείγματος με κυτταρομετρία ροής με το μηχάνημα FC500 της Beckman Coulter.

Το gate των λεμφοκυττάρων οριζόταν σε διάγραμμα πρόσθιας σκέδασης (forward scatter, FSC) και πλάγιας σκέδασης (side scatter, SSC) και το ποσοστό των κυττάρων που εξέφραζαν την εκάστοτε Vβ οικογένεια οριζόταν από το «παράθυρο» (gate) των CD8⁺ κυττάρων του αίματος (Εικόνα 9). Η σύγκριση γινόταν σε σχέση με δείγματα από φυσιολογικά άτομα (n=40) ανάλογης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς που έχουν χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας (Spanoudakis M, et al; 2010) προκειμένου να καθοριστεί η μέση τιμή και η σταθερή αποκλιση (standard deviation, SD) της κατανομής κάθε Vβ ειδικότητας. Η έκπτυξη μιας Vβ οικογένειας θεωρούνταν ως σημαντική όταν υπερέβαινε τη μέση τιμή + 2SD της αντίστοιχης κατανομής των φυσιολογικών ατόμων (Spanoudakis M, et al; 2010).



Εικόνα 9: Παράδειγμα ανάλυσης ρεπερτορίου της μεταβλητής περιοχής Vβ του υποδοχέα T-λεμφοκυττάρων (TCR) με χρήση του IOTest Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (Beckman-Coulter) (εικόνα από μία ενδεικτική περίπτωση ασθενούς)

3.4 Απομόνωση CD8⁺ T λεμφοκυττάρων

Για να απομονωθούν τα μονοπύρηντα κύτταρα του αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ή του μυελού των οστών (BM mononuclear cells, BMMCs) εφαρμόστηκε η διαδικασία της φυγοκέντρησης βαθμιδωτής πυκνότητας (gradient centrifugation) και χρησιμοποιήθηκαν (μη πυρογενή) πλαστικά φιαλίδια των 15ml.

1. Επιστοίβαση σε φικόλη (Lymphodex, Inno-TRAIN H9L5060) 15ml δείγματος αίματος ή αραιωμένου μυελού των οστών σε αναλογία 3:4. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 1480rpm, χωρίς φρένο.
2. Με πολλή προσοχή μεταφερόταν η μεσόφαση σε νέο φιαλίδιο με χρήση πιπέτας pasteur.
3. Προσθήκη ίσου όγκου phosphate-buffered saline (PBS).
4. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1500rpm.
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου με αναρρόφηση.
6. Επανασύσταση και επαναδιάλυση του κατακρημνίσματος με 5ml PBS.

7. Προσδιορισμός του αριθμού των ζωντανών κυττάρων με την βοήθεια φωτονικού μικροσκοπίου (μεγέθυνση 40x). Η μέτρηση των κυττάρων γινόταν πάνω σε αιμοκυτταρόμετρο (Chemocytometer-Neubauer, Hauser Scientific) με τη χρήση Trypan blue για την αναγνώριση των νεκρών κυττάρων.
8. Δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1500rpm με φρένο.
9. Αφαίρεση υπερκειμένου με αναρρόφηση, ώστε να δημιουργηθεί κατακρήμνισμα (pellet) κυττάρων.

Για να απομονωθούν τα T κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8⁺) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού θετικής απομόνωσης με χρήση CD8 MicroBeads (130-045-201 MACS) και στήλες MS (Mitenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Σύμφωνα με την αρχή του θετικού διαχωρισμού, πρώτα σημαίνονται τα CD8⁺ κύτταρα με μαγνητικά αντι-CD8 μικροσφαιρίδια μονοκλωνικού αντισώματος. Έπειτα, το εναιώρημα των κυττάρων φορτώνεται στη στήλη, η οποία έχει τοποθετηθεί σε μαγνητικό πεδίο. Τα μαγνητικά σημασμένα CD8⁺ κύτταρα εγκλωβίζονται μέσα στην στήλη ενώ τα μη σημασμένα κύτταρα διαπερνούν τη στήλη. Μετά την απομάκρυνση της στήλης από το μαγνητικό πεδίο, τα CD8⁺ κύτταρα συλλέγονται ως το κλάσμα του θετικού επιλεγμένου πληθυσμού.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Χρήση ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (MiniMacs) κατά την διαδικασία που περιείχε 100ml αντιπηκτικού citrate dextrose formula-A (ACD), 50ml Bovine Serum Albumine (BSA) 7,5%, 40ml Sodium Bicarbonate 7,5% διαλυμένο σε τελικό όγκο 1lt PBS.

1. Επανασύσταση και επαναδιάλυση του κατακρημνίσματος των κυττάρων σε 80μl MiniMacs ανά 10⁷ PBMCs ή BMMCs.
2. Προσθήκη 20μl CD8 μικροσφαιριδίων ανά 10⁷ κύτταρα.
3. Επώαση για 15 λεπτά, στους 4°C.
4. Προσθήκη 3ml MiniMacs.
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1500rpm.
6. Αφαίρεση του υπερκειμένου με αναρρόφηση.

7. Επανασύσταση και επαναδιάλυση του κατακρημνίσματος σε 500μl MiniMacs.
8. Τοποθέτηση της στήλης MS στο μαγνητικό πεδίο, πλύσιμό της με 500μl MiniMacs και τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη. Απομάκρυνση των μη σημασμένων κυττάρων, τα οποία διαπέρασαν τη στήλη και συλλέχθηκαν σε ξεχωριστό φιαλίδιο. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με 500μl MiniMacs με στόχο την μεγαλύτερη καθαρότητα του επιθυμητού κλάσματος.
9. Αφαίρεση της στήλης από το μαγνητικό πεδίο και τοποθέτησή της σε ένα φιαλίδιο.
10. Προσθήκη 1ml Minimacs και έκλουση με τη βοήθεια του εμβόλου που μας παρείχε ο κατασκευαστής.

Για την αποφυγή της κάλυψης των αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και της μη ειδικής κυτταρικής σήμανσης, όλα τα διαλύματα χρησιμοποιούνταν κρύα (με διατήρηση σε 4° C), τα κύτταρα διατηρούνταν στον πάγο και οι εργασίες γινόνταν γρήγορα.

Σε όλα τα πειράματα, η καθαρότητα των CD8⁺ T κυτταρικών υποπληθυσμών ήταν πάνω από 96% και η εκτίμηση γινόταν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας 10μl μονοκλωνικού αντισώματος αντι-CD8 FITC (Clone B9.11, Bectman Coulter) σε 20μl εναιωρήματος.

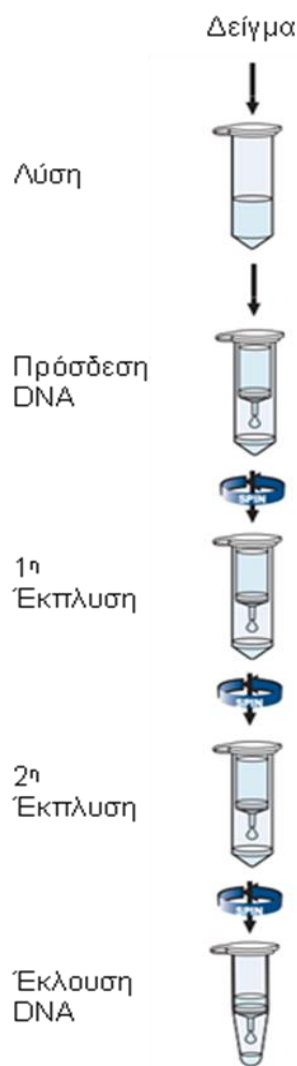
Αφού προσδιοριζόταν ο αριθμός των θετικά επιλεγμένων κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου συνεχιζόταν η επεξεργασία των κυττάρων για απομόνωση DNA ή/και RNA.

3.5 Απομόνωση γενωμικού DNA ή ολικού κυτταρικού RNA

Γενωμικό DNA (gDNA) ή ολικό κυτταρικό RNA απομονώθηκε από CD8⁺ κύτταρα δειγμάτων αίματος (n=22) και μυελού οστών (n=12) χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Life technologies) και RNeasy Mini kit (QIAGEN), αντιστοίχως. Το RNA μετατράπηκε με αντίστροφη μεταγραφή σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το SUPERScript Preamplification System (Gibco) ξεκινώντας από 0,5μg ολικού RNA.

3.5.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

1. Προσθήκη 200μl PBS στο κατακρήνισμα των CD8⁺ κυττάρων σε στείρο σωληνάριο 1,7ml.
2. Προσθήκη 20μl Proteinase K και 20μl RNase A.
3. Σύντομη παλμική ανάδευση, και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 200μl Lyse/Binding buffer, και έγινε καλή ανάδευση ώστε να έχουμε ένα ομοιογενές διάλυμα.
5. Επώαση για 10 λεπτά, στους 55°C με στόχο την αύξηση της δραστηριότητας της Proteinase K, την αποδιάταξη και πέψη των πρωτεϊνών. Παράλληλα κάθε υπόλειμμα RNA απομακρύνεται με πέψη από την RNase A.
6. Προσθήκη 200μl καθαρής αιθανόλης, καλή ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση ώστε να απομακρυνθούν τα σταγονίδια από τα τοιχώματα και να συγκεντρωθεί το διάλυμα στον πυθμένα.
7. Μεταφορά όλης της ποσότητας του δείγματος σε καθαρή στήλη.
8. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, σε 10.000g. Σε αυτό το στάδιο, το DNA συγκρατείται στην ειδική μεμβράνη πυριτίου της στήλης και οτιδήποτε άλλο την διαπερνά. Η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα του δείγματος επιτρέπει την καλύτερη πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη.
9. Αλλαγή δοχείου συλλογής και προσθήκη 500μl Wash Buffer 1 (στο οποίο περιέχεται αιθανόλη).
10. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, σε 10.000g.
11. Δεύτερη αλλαγή δοχείου συλλογής, προσθήκη 500μl Wash Buffer 2 (στο οποίο περιέχεται αιθανόλη).
12. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, σε 14.100g.
13. Μεταφορά στήλης σε καθαρό 1,5ml σωληνάριο και προσθήκη 50-100μl Elution buffer που αποτελεί διάλυμα χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα.
14. Επώαση για 1 λεπτό.
15. Φυγοκέντρηση για 75 δευτερόλεπτα, σε 14.100g με στόχο την έκλυση του DNA.
16. Η φύλαξη των δειγμάτων του DNA έγινε στους -20°C.

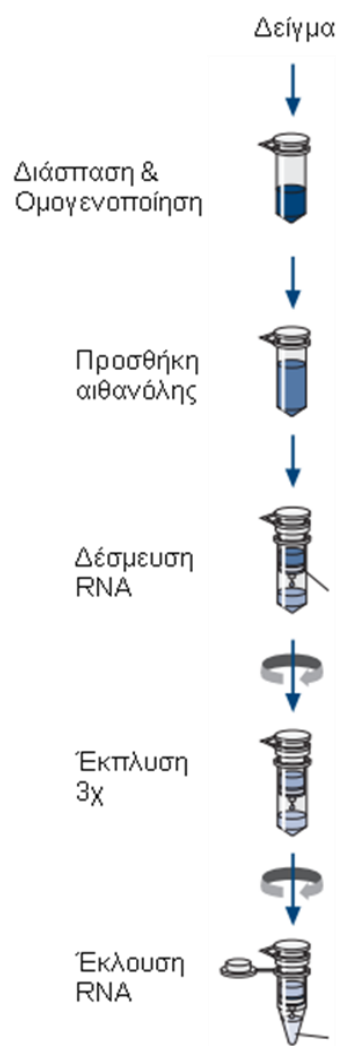


Εικόνα 10: Συνοπτική περιγραφή των βημάτων που ακολουθήθηκαν κατά την απομόνωση του RNA από τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα (από PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen handbook)

3.5.2 Απομόνωση ολικού RNA

1. Ανασύσταση του κατακρημνίσματος των CD8⁺ κυττάρων και προσθήκη διαλύματος 350μl RLT buffer με 3,5μl β-μερκαπτοαιθανόλης (ME), σε καθαρό σωληνάριο 1,7ml. Αυτό το βήμα είναι πολύ σημαντικό επειδή η ολοκληρωμένη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων και των τοιχωμάτων των οργανιδίων είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση όλου του RNA που περιέχεται στο δείγμα.
2. Ομογενοποίηση του δείγματος με πολλαπλές αναρροφήσεις (τουλάχιστον 5 φορές) με σύριγγα 1ml με 20G βελόνα.
Η ομογενοποίηση είναι απαραίτητη για την μείωση του ιξώδους που δημιουργείται στο διάλυμα κατά τη διάρκεια της διάσπασης.
3. Προσθήκη 350μL 70% αιθανόλης, και καλή ανάμιξη με πολλαπλές αναρροφήσεις με πιπέτα.

4. Μεταφορά (700μL) του δείγματος σε στήλη προσαρμοσμένη σε κατάλληλο σωληνάριο συλλογής.
5. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα, σε 10.000rpm
6. Αφαίρεση του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής.
7. Προσθήκη 350μL buffer RW1 στη στήλη.
8. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα σε 10.000rpm.
9. Αφαίρεση του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής.
10. Προσθήκη διαλύματος (10μL Dnase I σε 70μL buffer RDD) πάνω στη μεμβράνη της στήλης όπου έχει δεσμευτεί το RNA και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Προσθήκη 350μl buffer RW1.
12. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα, σε 10.000rpm.
13. Αφαίρεση του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής.
14. Προσθήκη 500μl buffer RPE.
15. Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα, σε 10.000rpm ώστε να γίνει έκπλυση της μεμβράνης.
16. Αφαίρεση του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής.
17. Προσθήκη 500μl buffer RPE.
18. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, σε 10.000rpm.
19. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα μετά από προσαρμογή καθαρού σωληναρίου συλλογής στη στήλη, για να εξαλείψουμε τις πιθανότητες μεταφοράς υπολειμμάτων κατά την έκλυση του RNA.
20. Μεταφορά της κολώνας σε καθαρό 1,5ml σωληνάριο και προσθήκη 30-50μl RNase-free water πάνω στη μεμβράνη.
21. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 10.000rpm με στόχο την έκλυση του RNA.
22. Η φύλαξη των δειγμάτων RNA έγινε στους -80°C.



Εικόνα 11: Συνοπτική περιγραφή των βημάτων που ακολουθήθηκαν κατά την απομόνωση του RNA από τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα (από RNeasy Mini kit, QIAGEN handbook)

3.6 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)

Μετά την απομόνωση του RNA από CD8⁺ λεμφοκύτταρα, για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε NanoDrop® ND-1000 UV-Vis φασματοφωτόμετρου και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της μετατροπής του RNA σε cDNA.

1. Προσθήκη 0,5μg RNA σε καθαρό (RNA free) 0,2ml σωληνάριο και συμπλήρωση μέχρι τα 8μl με DEPC-treated νερό.
2. Προσθήκη 1μl 50ng/μl random hexamers ως εκκινητές και 1μl 10 mM dNTPs.
3. Επώαση για 5 λεπτά, στους 65°C ώστε να γίνει η αποδιάταξη.
4. Τοποθέτηση σωληναρίου απευθείας στον πάγο τουλάχιστον για ένα λεπτό.
5. Προσθήκη 10μl διαλύματος, που περιείχε ανά αντίδραση τα εξής:

2μl 10X FS buffer
4μl 25mM MgCl₂
2μl 0.1M DTT
1μl RNase OUT
1μl Superscript II (50 Units, αραιωμένη σε RNase free νερό)

6. Πολύ καλή ανάμιξη με την πιπέτα και αμέσως μετά ακολούθησαν διαδοχικές επωάσεις στις παρακάτω συνθήκες και τοποθέτηση στον πάγο
25°C για 10 λεπτά (primer annealing)
42 °C για 50 λεπτά (ενζυμική RT)
72°C για 15 λεπτά (καταστροφή του ενζύμου)
7. Προσθήκη 1μl RNase H.
8. Τοποθέτηση του σωληναρίου στους 37°C για 20 λεπτά, ώστε να αφαιρεθεί το RNA.
9. Αραίωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τα 50μl.
10. Η φύλαξη των cDNAs γινόταν στους -20 °C.

3.7 Ενίσχυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανάλυση αλληλουχίας των TRBV-TRBD-TRBJ γονιδιακών αναδιατάξεων.

3.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση των γονιδιακών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED-2 χρησιμοποιώντας το IdentiClone™ PCR assay TCRB φιαλίδιο A – μη σημειωμένο cat. No. 2-205-0010 (InvivoScribe) και τη DNA πολυμεράση AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) είτε σε γενωμικό DNA (n=24) ή σε συμπληρωματικό DNA (cDNA, n=10) (van Dongen et al, 2003).

Το συγκεκριμένο φιαλίδιο περιέχει πολλαπλούς DNA εκκινητές οι οποίοι έχουν στόχο διατηρημένες γενετικές περιοχές μέσα στο γονίδιο της β αλυσίδας του TCR.

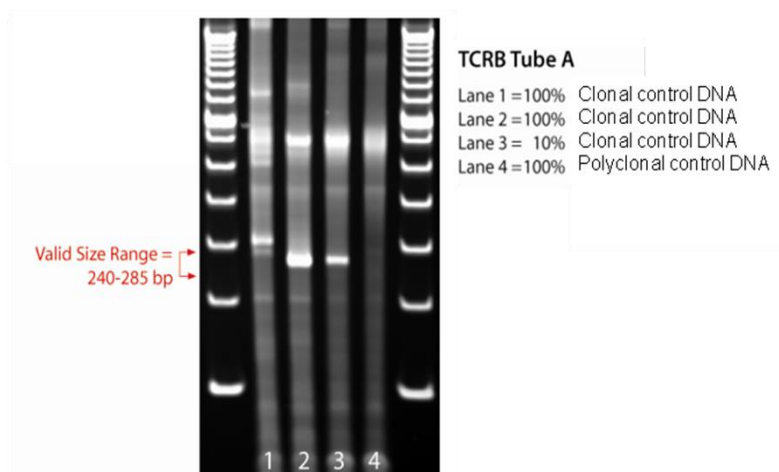
Πιο συγκεκριμένα, σε 0,2ml σωληνάρια προστέθηκαν 5μl DNA και 0,25μl DNA πολυμεράση σε 45μl μίγματος από το φιαλίδιο A, το οποίο περιείχε 23

εκκινητές για γονίδια TRBV και 9 για γονίδια TRBJ. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή υπό τις εξής συνθήκες:

- 1^ο βήμα 95°C για 7 λεπτά
- 2^ο βήμα για 35 κύκλους
 - 95°C για 45 δευτερόλεπτα
 - 60°C για 45 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 90 δευτερόλεπτα
- 3^ο βήμα 72°C για 10 λεπτά
- 4^ο βήμα 15°C για πάντα

Τα προϊόντα της PCR φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλής τήξης και υψηλής καθαρότητας 3% και στη συνέχεια καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο PureLink® Quick Gel Extraction Kit K2100-12 (Invitrogen Life technologies, USA).

Πιο αναλυτικά, 4,5gr αγαρόζης διαλύθηκαν σε 150ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE (Tris base, Acetate acid, EDTA) 1X, προστέθηκαν 15μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml) και αφού δημιουργήθηκε πήκτωμα, τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ηλεκτροφόρησης με περίπου 700ml TAE 1X και φορτώθηκαν τα δείγματα. Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε για 12-18 ώρες σε 40Volt.



Εικόνα 12 : Έλεγχος κλωνικότητας TRB. (IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay – Gel Detection handbook)

Στη συνέχεια, από το πήκτωμα της αγαρόζης απομονώθηκαν οι ζώνες που μας ενδιαφέρουν (240-285bp, εικόνα 12), τοποθετήθηκαν σε καθαρά

σωληνάρια, ζυγίστηκαν και εφαρμόστηκαν τα παρακάτω βήματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ:

1. Προσθήκη διαλύματος (L3) σε αναλογία 6:1.
2. Τοποθέτηση των σωληναρίων σε υδατόλουτρο στους 50°C, για 15 λεπτά με ανάδευση ανά 3 λεπτά με σκοπό την διαλυτοποίηση του πηκτώματος.
3. Μετά τη πλήρη διάλυση του πηκτώματος, προσθήκη 1 όγκου ισοπροπανόλης και καλή ανάδευση.
4. Μεταφορά όλης της ποσότητας του διαλύματος σε στήλη.
5. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, σε 12.000g.
6. Αλλαγή δοχείου συλλογής και προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης (W1) το οποίο περιέχει αιθανόλη.
7. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, σε 12.000g ώστε να αφαιρεθεί το διάλυμα.
8. Επανάληψη φυγοκέντρωσης για 1 λεπτό, σε μέγιστη ταχύτητα ώστε να αφαιρεθεί η αιθανόλη.
9. Μεταφορά της στήλης σε 1,7ml σωληνάριο και προσθήκη 50μl διαλύματος έκπλυσης (ES) στο κέντρο της στήλης.
10. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, σε 12.000g ώστε να επιτευχθεί η έκλυση.
12. Στο τελικό σωληνάριο περιέχεται το καθαρισμένο προϊόν της PCR το οποίο φυλάχθηκε στους -20°C.



Εικόνα 13: Συνοπτική περιγραφή των βημάτων που ακολουθήθηκαν κατά τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR (από PureLink® Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen Quick reference)

3.7.2 Κλωνοποίηση

Το καθαρισμένο προϊόν ενσωματώθηκε σε πλασμίδιο (TA cloning kit με pCR2.1, Invitrogen Life technologies, USA), μετασχηματίστηκε σε βακτήρια (*E. coli*/TOP10F' competent ικανά βακτήρια, Invitrogen Life technologies), επιλέχτηκαν τυχαίες αποικίες όπου είχε πετύχει ο μετασχηματισμός και απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA.

3.7.2.1 Ενσωμάτωση ενθέματος (Ligation)

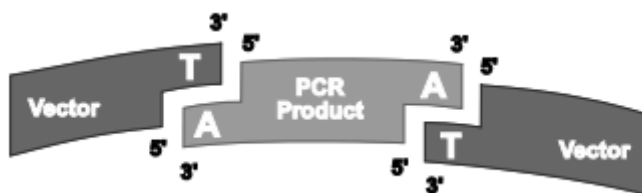
Έχοντας το επιθυμητό προϊόν της PCR έγινε η ενσωμάτωσή του στο πλασμίδιο pCR2.1 ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

Σε 0,2ml σωληνάρια προστέθηκαν τα παρακάτω

- 5μl νερό (WFI)
- 1μl 10X ligation buffer
- 2μl Vector
- 1μl T4 DNA ligase
- 1μl προϊόν PCR

Έγινε επώαση στους 14°C για 16-18 ώρες και έπειτα φυλάχθηκαν στους -20°C.

Εκμεταλλεζόμενοι την ιδιότητα της *Taq* πολυμεράσης να αφήνει μοναδικό κατάλοιπο δεοξυαδενίνης (A) στο 3' άκρο των προϊόντων της PCR, ο κατασκευαστής παρέχει πλασμίδιο που έχει στο 3' άκρο μοναδικό κατάλοιπο δεοξυθυμίνης (T) και έτσι επιτρέπεται στο προϊόν της PCR να ενσωματωθεί επιτυχώς στο πλασμίδιο.



Εικόνα 14: Στο σχεδιάγραμμα φαίνεται η αρχή της μεθόδου που ακολουθήθηκε (φυλλάδιο TA cloning kit με pCR2.1, Invitrogen)

3.7.2.2 Μετασχηματισμός (Transformation)

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία του μετασχηματισμού.

1. Απόψυξη των TOP10F' βακτηρίων και του μίγματος Ligation και μεταφορά τους σε 1,5ml σωληνάριο 50μl και 1,5μl αντίστοιχα.
2. Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Εμβάπτιση για 30 δευτερόλεπτα στους 42°C σε υδατόλουτρο και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο. Το θερμικό shock που εφαρμόζεται στα βακτηριακά κύτταρα καθιστούν την κυτταρική τους μεμβράνη διαπερατή ώστε να εισαχθούν τα πλασμίδια.
3. Προσθήκη 250μl S.O.C. θρεπτικού.
4. Επώαση για 1-4 ώρες στους 37°C.
5. Επίστρωση 40μl X-GAL (εναλλακτική ονομασία για 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, BCIG) (0,05M) και 40μl IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (0,1M) σε τρυβλία (100*20mm) με LB αγαρ και αμπικιλίνη.
6. Επώαση σε κλίβανο στους 37°C, για 10 λεπτά με μισάνοιχτα καπάκια.
7. Μετά την ολοκλήρωση του μετασχηματισμού έγινε επίστρωση όλου του μίγματος (θρεπτικό, βακτήρια, μίγμα ligation) στα τρυβλία.

8. Τοποθέτηση τρυβλίων σε κλίβανο στους 37°C, για 16-18 ώρες με σκοπό την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών.

Η χρήση του X-GAL και του IPTG έγινε για τη διάκριση των επιτυχώς μετασχηματισμένων βακτηρίων. Το TOP10F' περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης μέσα στο οποίο γίνεται η ένθεση του γονιδίου. Έτσι, αν το βακτήριο δεν έχει πλασμίδιο, είναι μη ανθεκτικό στην αμπικιλίνη και δεν αναπτύσσει αποικίες. Αν οι αποικίες παράγουν κανονικά την β-γαλακτοσιδάση έχουν μπλε χρώμα. Αν στις αποικίες έχει συμβεί ένθεση του γονιδίου, το οπερόνιο της λακτόζης δεν λειτουργεί, δεν παράγει β-γαλακτοσιδάση κι έτσι οι αποικίες έχουν λευκό χρώμα.

Μετά το πέρας της επώασης, απομονώθηκαν με την άκρη πλαστικού ρύγχους 50 λευκές αποικίες, τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα που περιείχε υγρό θρεπτικό LB (Broth), έγινε διαλυτοποίηση και τοποθέτηση σε κλίβανο 37°C, για 16-18 ώρες με καπάκι.

3.7.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μετά την απομόνωση αποικιών επιτυχώς μετασχηματισμένων βακτηρίων, ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

1. Μεταφορά του καλλιεργήματος από την πλάκα 96 βοθρίων σε πιάτο για PCR.
2. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 3700rpm.
3. Αφαίρεση του υπερκειμένου.
4. Δύο διαδοχικές εκπλύσεις με 40μl και 20μl νερού (water for injection, WFI) με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 3700rpm.
5. Αφαίρεση του υπερκειμένου.
6. Προσθήκη 20μl νερού (WFI).
7. Επώαση για 10 λεπτά στους 99°C και μεταφορά για 5 λεπτά στον πάγο.
8. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 3700rpm.
9. Μεταφορά 11,5μl από το υπερκείμενο (όπου περιέχονταν το πλασμιδιακό DNA) σε 0,2ml σωληναρία, τα οποία φυλάχθηκαν στους -20°C.

3.7.4 Ενίσχυση ενθέματος από πλασμιδιακό DNA

Για την ενίσχυση του ενθέματος από πλασμιδιακό DNA, χρησιμοποιήθηκαν M13 εκκινητές κατασκευασμένοι στο εργαστήριο μικροχημείας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ITE) της Κρήτης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν οι ακόλουθες:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' Forward

5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' Reverse

Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση ήταν το παρακάτω:

| | |
|-------|--|
| 5μl | 10X PCR buffer |
| 1,5μl | 50mM MgCl ₂ |
| 5μl | 10μM M13F |
| 5μl | 10μM M13R |
| 1μl | 10mM dNTPs (Invitrogen Life technologies, USA) |
| 0,5μl | Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life technologies, USA) |
| 30μl | νερό (WFI) |
| 2μl | πλασμιδιακό DNA |

Ακολούθησε επώσση σε μηχανήμα θερμοπολλαπλασιαστή με τις εξής συνθήκες:

| | | |
|---------------------|----------------|---------------------|
| 1 ^ο βήμα | 72°C | για 90 δευτερόλεπτα |
| 2 ^ο βήμα | για 35 κύκλους | |
| | 94°C | για 40 δευτερόλεπτα |
| | 60°C | για 30 δευτερόλεπτα |
| | 72°C | για 90 δευτερόλεπτα |
| 3 ^ο βήμα | 72°C | για 10 λεπτά |
| 4 ^ο βήμα | 4°C | για πάντα |

Μετά την απομόνωση των προϊόντων PCR από το πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας με διδαιοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger) σε αυτόματο αναλυτή (CEQ 8000 Genetic Analysis System) και την χρήση του εκκινητή M13 Forward.

3.7.5 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι αλληλουχίες των υποκλώνων που προέκυψαν, μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου του προγράμματος IMGT/V-QUEST από το διεθνές σύστημα πληροφόρησης ImMunoGeneTics® (<http://www.imgt.org>) (Giudicelli et al, 2011). Στην ανάλυση συμπεριλήφθησαν μόνο οι παραγωγικές TRBV-TRBD-TRBJ γονιδιακές αναδιατάξεις που φέρουν εντός πλαισίου (in-frame) αλληλουχίες προσδιορισμού συμπληρωματικότητας της περιοχής CDR3 και τα λειτουργικά TRBV γονίδια.

Όλες οι αλληλουχίες των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ από τους ασθενείς με CIN συγκρίθηκαν με μια ομάδα 5717 παραγωγικών αλληλουχιών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ από διάφορες κατηγορίες (φυσιολογικών, αυτοαντιδραστικών και κακοηθών κλώνων T- κυττάρων) που ήταν διαθέσιμες στην ομάδα μας (n=1715) ή ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων αλληλούχισης IMGT/LIGM-DB (<http://www.imgt.org/IMGIndex/LGM.html>) (n=4002).

3.8 Ορισμοί

Κλωνότυποι ορίζονται οι TRBV-TRBD-TRBJ γονιδιακές αναδιατάξεις με το ίδιο TRBV γονίδιο και TRB CDR3 αλληλουχία αμινοξέων. Οι κλωνότυποι θεωρούνται εκτεταμένοι (σχηματίζουν αθροίσματα, clusters) όταν αποτελούνται ≥ 2 αλληλουχίες και ο πιο διευρυμένος κλωνότυπος κάθε δείγματος αναφέρεται ως ανοσοεπικρατών. Μονήρης (singleton) ορίζεται ο κλωνότυπος που ανταποκρίνεται σε μία μοναδική αναδιάταξη TRBV-TRBD-TRBJ. Η σχετική συχνότητα του κάθε κλωνοτύπου ανά δείγμα αντιστοιχεί στον αριθμό των αναδιατάξεων που περιέχονται στον κλωνότυπο δια του συνολικού αριθμού των παραγωγικών αναδιατάξεων που κλωνοποιήθηκαν (ελέγχθηκαν) στο συγκεκριμένο δείγμα. Για την ανάλυση του ρεπερτορίου, αξιολογήθηκαν μόνο κλωνοτύποι και όχι μεμονωμένες αναδιατάξεις έτσι ώστε να αποδευχθούν λάθος εκτιμήσεις λόγω κλωνικής έκπτωσης μετά από αντιγονική διέγερση.

Η διάκριση μεταξύ μονο-, ολιγο- και πολυ-κλωνικότητας για τους ασθενείς με λεμφοϋπερπλασίες, ιδίως με εκπτώξεις T-κυτταροτοξικών κυττάρων, είναι αμφιλεγόμενη και, σε μεγάλο βαθμό, αυθαίρετη (O’Keeffe CL et al, 2004;

Clemente MJ et al, 2011; Jerez A et al, 2012; Papalexandri A et al, 2013; Stalika E et al, 2014). Ετσι, στην παρούσα μελέτη θεωρήσαμε oligo- και mono- κλωνικούς πληθυσμούς, τους εκτεταμένους, ανοσοεπικρατούντες κλώνους με συχνότητα >7,5% ή >30% του συνολικού ρεπερτορίου, αντιστοίχως, λαμβάνοντας υπόψη την χαμηλή απόδοση της ανάλυσης με κλασσική υποκλωνοποίηση και αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger.

3.9 Στατιστική ανάλυση

Τα στατιστικά στοιχεία για τις ποιοτικές μεταβλητές περιγράφονται με κατανομές συχνότητας, ενώ για τις ποσοτικές μεταβλητές με τη μέση τιμή, (mean), τη διάμεση τιμή (median) και τη σταθερή απόκλιση (standard deviation). Οι συσχετίσεις μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το χ^2 -test. Η σύγκριση μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών με κανονική κατανομή εκτιμήθηκε με τη χρήση του Student's t-test και εκείνων με μη-κανονική κατανομή με Mann-Whitney test.

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των λογισμικών GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) και Statistica Software 10.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, OK).

Το γράφημα Circos δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας δωρεάν λογισμικό, που διατίθεται στη διεύθυνση <http://circos.ca> με άδεια χρήσης από το GPL (Krzywinski et al, 2009) .

3.10 Τυποποίηση HLA

Όλα τα δείγματα των ασθενών με CIN τυποποιήθηκαν για τους HLA-A, -B, -C τύπους με ανάλυση δύο ψηφίων, με αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αλληλουχία ειδικού ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή (reverse PCR-SSO, sequence specific oligonucleotide probe) χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (Lifecodes Immucor).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη του TR

Για να έχουμε μια αρχική εικόνα για τις εκπτύξεις T-κυτταρικών υποπληθυσμών πραγματοποιήσαμε μελέτη του TCR με κυτταρομετρία ροής όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τα αποτελέσματα για τους ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκε και αλληλούχιση των γονιδιακών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ.

Όπως προαναφέρθηκε, το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι σχεδιασμένο ώστε να ανιχνεύει 24 οικογένειες του TCR που ανταποκρίνονται περίπου στο 70% του ρεπερτορίου του TCRVβ. Ωστόσο, όπως θα φανεί από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των γονιδίων TRB, κάποια από τα πιο συχνά γονίδια TRBV δεν αντιπροσωπεύονται στο kit της κυτταρομετρίας ροής. Παρατηρήθηκε, επίσης, να υπάρχουν δείγματα με υπερέκφραση Vβ οικογενειών σύμφωνα με την κυτταρομετρία ροής που σε μοριακό επίπεδο έδιναν αντίστοιχη έκφραση μειωμένη ή μηδενική. Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει καλή αντιστοιχία μεταξύ των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής και της αλληλούχισης των γονιδιακών αναδιατάξεων.

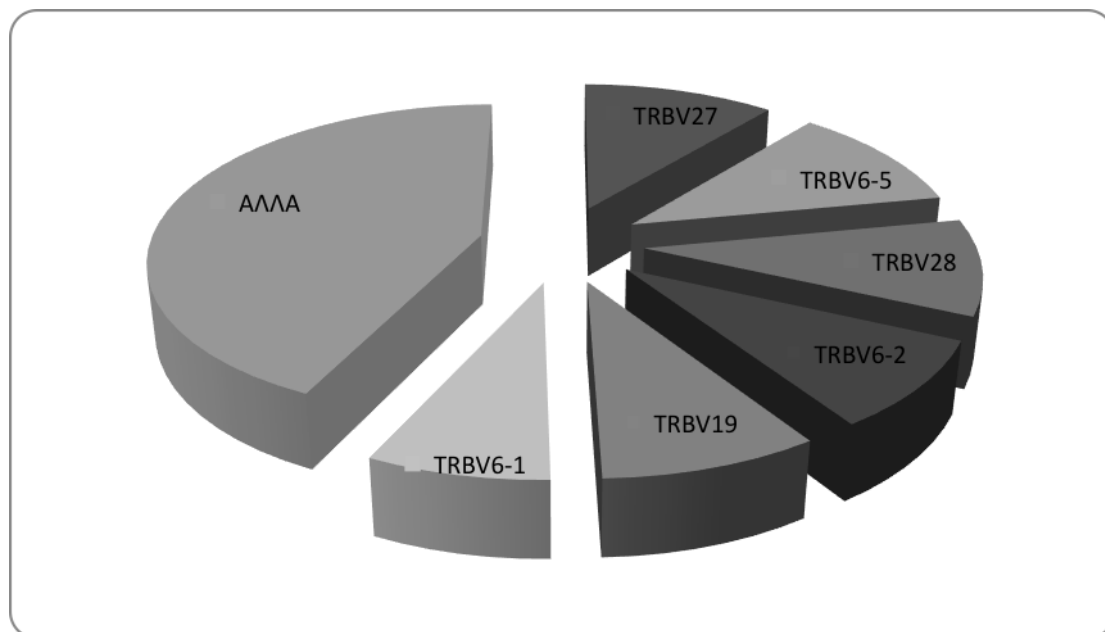
Πίνακας 3. Υπερεκφρασμένες Vβ οικογένειες σύμφωνα με την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής στα CD8⁺ ή CD3⁺ κύτταρα του αίματος των ασθενών με CIN. (Υπερέκφραση μιας Vβ οικογένειας ορίστηκε η αύξηση πάνω από τη μέση τιμή +2SD της αντίστοιχης οικογένειας στην κατανομή των φυσιολογικών ατόμων,) N.D.: not done

| Κωδικός ασθενούς | CD3 ⁺ κύτταρα | CD8 ⁺ κύτταρα |
|------------------|--------------------------------|---|
| C1201 | | Vβ23 (TRBV13) |
| C1202 | | - |
| C1204 | | Vβ13.6 (TRBV6-6) |
| C1205 | | Vβ13.6 (TRBV6-6)/ Vβ12 (TRBV10-3)/ Vβ21.3 (TRBV11-2)/ Vβ11 (TRBV21-1) |
| C1209 | | Vβ12 (TRBV10-3) |
| C1302 | | - |
| C1303 | | - |
| C1307 | - | N.D. |
| C1308 | | N.D. |
| C1310 | | N.D. |
| C1311 | | - |
| C1312 | | Vβ16 (TRBV14)/ Vβ13.6 (TRBV6-6) |
| C1316 | | Vβ17 (TRBV19) |
| C1317 | | - |
| C1322 | | Vβ5.2 (TRBV5-6)/ Vβ14 (TRBV27) |
| C1330 | | Vβ12 (TRBV10-3) |
| CIN10 | | Vβ3 (TRBV28) |
| CIN12 | | Vβ13.1 (TRBV6-5, TRBV6-6, TRBV6-9) |
| CIN16 | | - |
| CIN18 | - | N.D. |
| CIN20 | - | N.D. |
| CIN21 | Vβ5.2 (TRBV5-6)/ Vβ14 (TRBV27) | N.D. |
| CIN23 | - | N.D. |
| CIN25 | | Vβ9 (TRBV3-1) |
| CIN26 | | Vβ2 (TRBV20-1) |
| CIN30 | | - |
| CIN32 | Vβ16 (TRBV14) | N.D. |
| CIN34 | | - |
| CIN36 | | Vβ16 (TRBV14)/ Vβ9 (TRBV3-1) |
| CIN38 | | Vβ5.2 (TRBV5-6)/ Vβ21.3 (TRBV11-2)/ Vβ11 (TRBV25-1) |
| CIN40 | | Vβ12 (TRBV10-3) |
| CR3 | | Vβ3 (TRBV28) |
| CR6 | | - |
| CR7 | | Vβ16 (TRBV14)/ Vβ17 (TRBV19) |

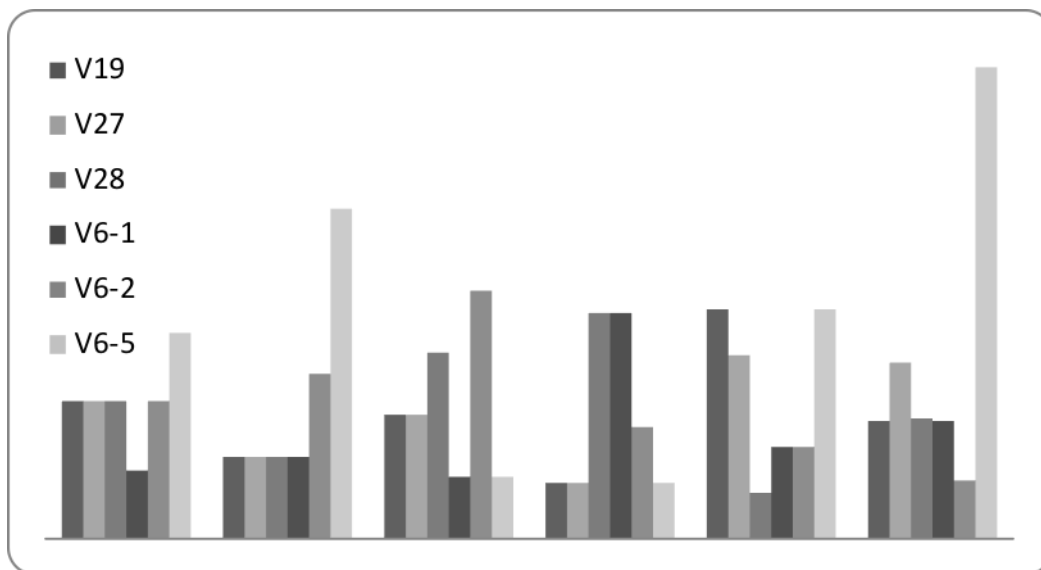
4.2 Τα CD8⁺ κύτταρα των ασθενών με CIN εμφανίζουν επιλεκτικότητα ρεπερτορίου γονιδίων TRB

Συνολικά αναλύθηκαν 1037 αλληλουχίες γονιδιακών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ (19-46/δείγμα, μέσος όρος=28). Από αυτές, 806 (78%) ήταν παραγωγικές (6-36/περίπτωση, μέσος όρος=25), με λειτουργικά TRBV γονίδια και TRB CDR3 περιοχές εντός πλαισίου. Οι υπόλοιπες 231 αναδιατάξεις ήταν μη παραγωγικές κυρίως εξαιτίας εκτός πλαισίου CDR3.

Οι παραγωγικές αναδιατάξεις που αξιολογήθηκαν αντιστοιχούσαν σε 546 διακριτούς κλωνοτύπους (4-27/περίπτωση, μέσος όρος=17). Ταυτοποιήθηκαν 34 λειτουργικά TRBV γονίδια. Πιο συχνά γονίδια ήταν τα TRBV27 και TRBV6-5 με 59 κλωνοτύπους το καθένα (11%), ακολουθόμενα από τα TRBV28 (9.8%), TRBV6-2 (8.9%), TRBV19 (8.9%) και TRBV6-1 (7.4%). Έτσι, συνολικά, 6 TRBV γονίδια αντιστοιχούσαν στο ~57% του συνόλου των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων (Σχήμα 1α). Σε επίπεδο μεμονωμένων περιπτώσεων, παρατηρήθηκαν διαφορετικές συχνότητες TRBV γονιδίων (Σχήμα 1β).



Σχήμα 1α. Συχνότητες εμφάνισης γονιδίων TRVB στο σύνολο των ασθενών.



Σχήμα 1β. Συχνότητες εμφάνισης των TRBV γονιδίων ανά ασθενή. Οι συχνότητες των 6 επικρατέστερων TRBV γονιδίων απεικονίζονται για 6 αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ασθενών με CIN.

TRBD γονίδια ταυτοποιήθηκαν σε 517/546 (94,7%) κλωνοτύπους (TRBD1 και TRBD2 σε 357 και 160 κλωνοτύπους, αντιστοίχως). Οι περισσότεροι κλωνοτύποι χρησιμοποιούσαν τα TRBJ2-7 (139/546, 25,5%) και TRBJ1-2 (119/546, 21,8%) γονίδια.

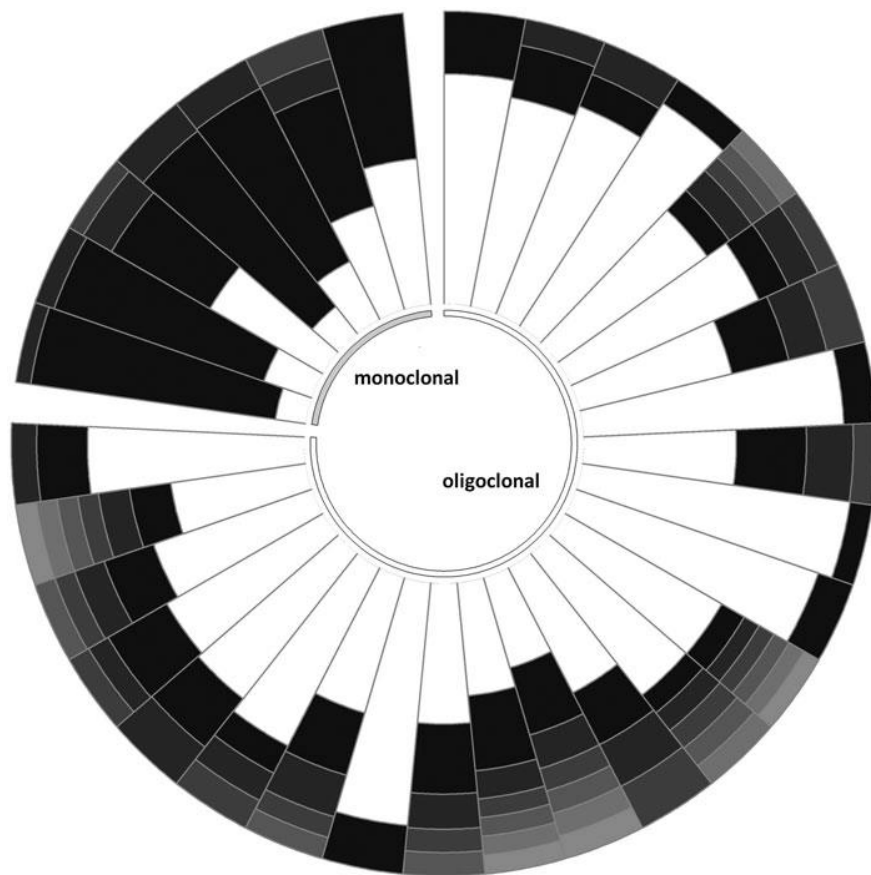
Η διάμεση τιμή του μήκους του TRB CDR3 σε επίπεδο ομάδας ήταν 12 αμινοξέα (εύρος 8-19). Η διάμεση τιμή του μήκους της CDR3 περιοχής των κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν σε μεμονωμένες περιπτώσεις διέφερε έως και 5 αμινοξέα (11-16), με τους μεγαλύτερους κλωνοτύπους γενικά να κυριαρχούν μεταξύ περιπτώσεων με πιο έντονη επιλεκτικότητα (skewing) του ρεπερτορίου.

Κοινά TRB CDR3 μοτίβα σε αναδιατάξεις ταυτόσημου μήκους CDR3 ταυτοποιήθηκαν σε πολλαπλούς κλωνοτύπους από διαφορετικούς ασθενείς με χρησιμοποίηση διαφορετικών γονιδίων TRBV.

Τα κοινά μοτίβα αλληλουχιών ταξινομήθηκαν σε 2 τύπους: (1) «συνδυαστικός», που κωδικοποιείται από αλληλουχίες της περιοχής D και περιοχή 5' J ειδικών συνδυασμών TRBD-TRBJ γονιδίων και (2) «συνδυαστικός + συνδετικός», δηλαδή κωδικοποιείται εν μέρει από τις περιοχές N-ποικιλότητας (N1 και N2) που δημιουργούνται από μηχανισμούς διακλαδισμένης ποικιλομορφίας, οδηγώντας σε περιορισμένα μοτίβα στις

συνδέσεις/ενώσεις γονιδίων TRBV-TRBD και/ή TRBD-TRBJ.

Στην ανάλυση της κλωνικότητας συμπεριλήφθησαν μόνο δείγματα με >15 αλληλουχημένες παραγωγικές αναδιατάξεις (n=33): έτσι μια περίπτωση ασθενούς με χαμηλή απόδοση αλληλουχιών (n=6) εξαιρέθηκε. Με την εξαίρεση μιας περίπτωσης, οι υπόλοιπες περιπτώσεις (n=32) παρουσίασαν ολιγοκλωνικότητα, δηλαδή βρέθηκαν να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μια ομάδα πανομοιότυπων αναδιατάξεων (≥ 2) [διευρυμένος κλωνότυπος]. Στα 32 δείγματα που παρουσιάζουν διευρυμένους κλώνους/κλωνικές εκπτώξεις, ο αριθμός των διευρυμένων κλωνότυπων ανά δείγμα κυμαινόταν από 1-6 (διάμεση τιμή 3). Σε 25/32 περιπτώσεις (78,1%), ο κυρίαρχος κλωνότυπος υπολογίστηκε σε 7,7% έως 25,8% του συνόλου, ενδεικτικός ολιγοκλωνικότητας. Σε 7/32 περιπτώσεις (21,9%), ο κυρίαρχος κλωνότυπος υπολογίστηκε σε 38,8% έως 84,6% του συνόλου, ενδεικτικός μονοκλωνικότητας (σχήμα 2). Ο ανοσοεπικρατών κλώνος χρησιμοποιούσε το γονίδιο TRBV28 σε 6/32 (18,8%) περιπτώσεις ασθενών με CIN. Το ρεπερτόριο των γονιδίων TRBV διέφερε μεταξύ ολιγοκλωνικών και πολυκλωνικών περιπτώσεων με υπεραντιπροσώπωση των TRBV6-1 και TRBV7-8 γονιδίων και υποεκπροσώπωση των TRBV19 και TRBV6-6 γονιδίων, αντιστοίχως. Ωστόσο, αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, ίσως λόγω του σχετικά μικρού αριθμού μονοκλωνικών περιστατικών (n=7).



Σχήμα 2. Ανάλυση κλωνικότητας των T-κυττάρων για κάθε υποκατηγορία ασθενών με CIN (με βάση την παρουσία ολιγοκλωνικών και μονοκλωνικών εκπτύξεων). Κάθε λωρίδα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα με κλωνικές εκπτώξεις (σύνολο $n=32$) και κάθε τετραγωνίδιο μιας λωρίδας αντιστοιχεί στο σχετικό μέγεθος των διαφορετικά διευρυμένων κλωνοτύπων μέσα στο δείγμα. Το εσωτερικό τετραγωνίδιο (φαίνεται με λευκό σε όλα τα παραδείγματα) αντιπροσωπεύει το πολυκλωνικό υπόβαθρο (background) δηλαδή την σωρευτική συχνότητα όλων των μονών κλωνοτύπων μέσα στο δείγμα.

4.3 Κοινοί κλωνότυποι μεταξύ διαφορετικών ασθενών

Στην ανάλυση αθροισμάτων (Cluster analysis) των αμινοξικών αλληλουχιών της TRB CDR3 περιοχής σε όλες τις CIN περιπτώσεις ταυτοποιήθηκαν 7 διακριτές αλληλουχίες κοινές σε ζευγάρια ασθενών, οι οποίες ορίστηκαν ως «δημόσιοι» κλωνότυποι. Πέντε από αυτές τις αλληλουχίες έφεραν το ίδιο γονίδιο TRBV ενώ οι υπόλοιπες 2 «δημόσιες» αλληλουχίες χρησιμοποιούσαν διαφορετικά TRBV γονίδια (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Ζεύγη CIN ασθενών με πανομοιότυπους κλωνότυπους ή κλωνότυπους με πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία της CDR3*

| Κωδικός Ασθενούς | TRBV γονίδιο | Αμινοξική αλληλουχία της CDR3 |
|------------------|--------------|-------------------------------|
| CIN 30 | TRBV7-9 | ASSLVAGAGELF |
| CIN 38 | | |
| CIN 18 | TRBV7-8 | ASSLGGYYEQY |
| CIN 21 | | |
| CIN 21 | TRBV7-8 | ASGRVGYEQY |
| CIN 38 | | |
| CIN 10 | TRBV7-2 | ASSSRLASSEQY |
| CIN 38 | | |
| CIN 25 | TRBV19 | ASSPRDKPNEKLF |
| CIN 36 | | |
| CIN 30 | TRBV6-2 | ASSDSSGANVLT |
| CIN 21 | TRBV6-4 | |
| CIN1202 | TRBV6-2 | ASSTGYYGYT |
| CIN1330 | TRBV6-1 | |

* CDR3, complementarity determining region 3

Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν οι γονιδιακοί τόποι του HLA σε αυτά τα 7 ζευγάρια ασθενών με σκοπό την ανεύρεση κάποιας αντιστοιχίας. Διαπιστώθηκε ότι 3/7 ασθενείς είχαν τουλάχιστον έναν κοινό τόπο ανάμεσα σε αυτούς που ελέγχθηκαν.

Επιτρέποντας την ύπαρξη διαφοράς ενός μόνο αμινοξέος, ελέγχθηκε αν υπήρχαν κλωνότυποι με υψηλή ομολογία στην αλληλουχία TRB CDR3. και ταυτοποιήθηκαν 9 τέτοιες αμινοξικές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνταν από ζεύγη ασθενών. Σε 4/9 ζεύγη ασθενών το γονίδιο TRBV ήταν πανομοιότυπο ενώ τα υπόλοιπα 5/9 ζεύγη χρησιμοποιούσαν διαφορετικά TRBV γονίδια (πίνακας 5)

Πίνακας 5: Ζεύγη ασθενών με κλωνότυπο με παρόμοια αμινοξική αλληλουχία της CDR3 (με διαφορά ενός μόνο αμινοξέος μέσα στην αλληλουχία της CDR3).

| Κωδικός ασθενούς | TRBV γονίδιο | Αμινοξική αλληλουχίας της CDR3 |
|------------------|--------------|--------------------------------|
| CIN1310 | TRBV6-5 | ASSPLTGTGHYGYT |
| CIN1311 | | ASSPLTGTGSYGYT |
| CIN1322 | TRBV19 | ASSIDSNQPQH |
| CIN34 | | ASSIDHNQPQH |
| CIN1330 | TRBV6-4 | ASSDRNTGELF |
| CIN 32 | | ASSDRDTGELF |
| CIN34 | TRBV19 | ASSIDHNQPQH |
| CIN1322 | | ASSIDSNQPQH |
| CIN1307 | TRBV10-3 | ATGTGDSNQPQH |
| CIN 32 | TRBV19 | ASGTGDSNQPQH |
| CIN1312 | TRBV29-1 | SVEGGSSYEQY |
| CIN 26 | TRBV20-1 | SAEGGSSYEQY |
| CIN1322 | TRBV27 | ASSWTGGVGQPQH |
| CIN 26 | TRBV6-5 | ASSWTGQVGQPQH |
| CIN1330 | TRBV6-4 | ASSDRNTGELF |
| CIN 32 | TRBV2 | ASSDPNTGELF |
| CIN 30 | TRBV6-1 | ASSVWGANEKLF |
| CIN 25 | TRBV7-9 | ASSLWGANEKLF |

4.4 Σύγκριση με αλληλουχίες δημόσιων βάσεων δεδομένων

Όλες οι αλληλουχίες παραγωγικών αναδιατάξεων των TRBV-TRBD-TRBJ γονιδίων της παρούσας μελέτης (n=806) συγκρίθηκαν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με δεδομένα 5.717 διακριτών, παραγωγικών αλληλουχιών γονιδιακών αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ από διάφορες οντότητες που ήταν διαθέσιμες στην ομάδα μας ή ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων αλληλουχιών IMGT / LIGM-DB.

Δύο κλωνοτύποι από το σύνολο των δεδομένων μας βρέθηκαν και στη δημόσια βάση δεδομένων και θεωρήθηκαν επίσης ως «δημόσιοι»: (i) ο πρώτος αντιστοιχούσε σε κλώνο κυττάρων που ανιχνεύθηκε μετά από

μεταμόσχευση αλλογενών αιματοποιητικών κυττάρων, (ii) ο δεύτερος αντιστοιχούσε σε κλώνο που ανιχνεύθηκε σε κύτταρα ειδικά για τον ιό Epstein-Barr (Αριθμός Πρόσβασης AM041153 στη βάση δεδομένων αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB). Ο δεύτερος κλωνότυπος συμμετείχε επίσης σε ένα από τα προαναφερθέντα «ζεύγη» ασθενών με CIN με υψηλή ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας της CDR3. Όταν υιοθετήθηκε ένα λιγότερο αυστηρό όριο για την ταυτότητα αμινοξέων της CDR3, εντοπίστηκαν επιπρόσθετες ομοιότητες με αλληλουχίες από τη δημόσια βάση δεδομένων. Αυτές οι ομοιότητες αφορούσαν σε αλληλουχίες από ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές (ρευματοειδής αρθρίτιδα, ψωριασική αρθρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας), πολλαπλούν μυέλωμα ή λέμφωμα Hodgkin καθώς και ασθενείς μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

4.5 HLA τυποποίηση

Με δεδομένο ότι τα μόρια τάξης I HLA μεσολαβούν στην άνοση απάντηση παρουσιάζοντας πεπτίδια προερχόμενα από παθογόνους οργανισμούς στην επιφάνεια των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, ερευνήθηκαν οι αντίστοιχοι γονιδιακοί τόποι σε όλες τις περιπτώσεις των ασθενών με CIN (Πίνακας 6). Οι 22/34 περιπτώσεις (64.7%) ασθενών με CIN βρέθηκαν να εκφράζουν το HLA-A*01 (n=10) ή HLA-A*02 (n=12).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα τυποποίησης HLA με ανάλυση 2 ψηφίων*

| Κωδικός Ασθενούς | HLA-A* | | HLA-B* | | HLA-C* | |
|------------------|--------|----|--------|----|--------|----|
| CIN10 | 24 | 69 | 51 | 51 | 16 | 02 |
| CIN12 | 01 | 03 | 14 | 15 | 08 | 03 |
| CIN16 | 02 | 23 | 44 | 49 | 14 | 07 |
| CIN18 | 02 | 24 | 15 | 41 | 03 | 07 |
| CIN20 | 02 | 68 | 47 | 50 | 06 | 06 |
| CIN21 | 02 | 24 | 07 | 51 | 15 | 07 |
| CIN23 | 01 | 02 | 18 | 44 | 07 | 16 |
| CIN25 | 02 | 03 | 52 | 55 | 12 | 03 |
| CIN26 | 01 | 02 | 41 | 52 | 12 | 17 |
| CIN30 | 01 | 01 | 07 | 44 | 05 | 07 |
| CIN32 | 02 | 30 | 13 | 35 | 04 | 06 |
| CIN34 | 01 | 30 | 08 | 44 | 05 | 07 |
| CIN36 | 11 | 24 | 35 | 55 | 12 | 03 |
| CIN38 | 26 | 30 | 13 | 37 | 06 | 06 |
| CIN40 | 11 | 11 | 51 | 55 | 14 | 01 |
| CR3 | 03 | 24 | 07 | 44 | 07 | 07 |
| CR6 | 24 | 33 | 14 | 27 | 02 | 05 |
| CR7 | 02 | 23 | 27 | 49 | 01 | 07 |
| C1201 | 01 | 33 | 14 | 52 | 12 | 08 |
| C1202 | 24 | 32 | 41 | 44 | 17 | 05 |
| C1204 | 11 | 26 | 35 | 55 | 03 | 04 |
| C1205 | 02 | 32 | 27 | 39 | 02 | 12 |
| C1209 | 01 | 24 | 08 | 38 | 12 | 07 |
| C1302 | 30 | 30 | 13 | 13 | 06 | 06 |
| C1303 | 01 | 02 | 15 | 40 | 03 | 03 |
| C1307 | 03 | 24 | 35 | 51 | 03 | 14 |
| C1308 | 02 | 30 | 18 | 35 | 12 | 04 |
| C1310 | 02 | 25 | 18 | 39 | 12 | 12 |
| C1311 | 01 | 02 | 08 | 44 | 07 | 07 |
| C1312 | 24 | 32 | 08 | 40 | 12 | 07 |
| C1316 | 02 | 26 | 13 | 38 | 12 | 06 |
| C1317 | 02 | 68 | 35 | 51 | 04 | 15 |
| C1322 | 03 | 03 | 27 | 52 | 12 | 02 |
| C1330 | 01 | 11 | 18 | 38 | 12 | 12 |

* Με τεχνική αντίστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αλληλουχία ειδικού ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή (reverse PCR-SSO, sequence specific oligonucleotide probe).

Συμπερασματικά, η μοριακή ανάλυση των αναδιατάξεων TRBV-TRBD-TRBJ στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα ασθενών με CIN ενισχύει και διευρύνει σημαντικά τα δεδομένα από προηγούμενες μελέτες μας για έντονη επιλεκτικότητα (skewing) του ρεπερτορίου των γονιδίων του TRBV στην πλειονότητα των ασθενών. Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η ανεύρεση κοινών αναδιατάξεων (κλωνοτύπων) σε διαφορετικούς ασθενείς, η οποία καταργεί τη λογική του τυχαίου και υποδεικνύει επιλογή από κοινό – άγνωστο προς το παρόν - αντιγόνο που ίσως να έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια/παθοφυσιολογία της CIN.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει ότι τα T κυτταροτοξικά κύτταρα έχουν βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της CIN (Papadaki *et al*, 2005; Spanoudakis *et al*, 2010). Αυτός ο ισχυρισμός υποστηρίζεται από την ταυτοποίηση ενεργοποιημένων κυττάρων στο αίμα και μυελό των οστών των ασθενών καθώς επίσης και από την *ex vivo* καταστολή σχηματισμού κοκκιοκυτταρικών αποικιών μετά από συγκαλλιέργεια προγονικών κυττάρων από CIN ασθενείς ή φυσιολογικά άτομα με T λεμφοκύτταρα των ασθενών (Papadaki *et al*, 1999). Επιπλέον, η εκτίμηση με κυτταρομετρία ροής και η μοριακή ανάλυση του φάσματος κατανομής (spectratyping) των TRB CDR3 CD4⁺ και CD8⁺ λεμφοκυττάρων CIN ασθενών σε σύγκριση με αντίστοιχα φυσιολογικών ατόμων έχουν αναδείξει σημαντικές διαφορές στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα (Spanoudakis *et al*, 2010).

Στην παρούσα μελέτη, η μελέτη των ασθενών συνεχίστηκε με αλληλούχιση των γονιδίων TRBV-TRBD-TRBJ ώστε να συγκεντρωθούν λεπτομερέστερες ενδείξεις για τη σύσταση του ρεπερτορίου του T κυτταρικού υποδοχέα στην CIN. Με τη συγκεκριμένη προσέγγιση, παρουσιάζεται για πρώτη φορά ανοσογενετικός χαρακτηρισμός του ρεπερτορίου των CD8⁺ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN. Τα δεδομένα μας τεκμηριώνουν έντονη επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των CD8⁺ TRB γονιδίων σε όλους τους ασθενείς με CIN που αναλύθηκαν. Συγκρίνοντας τα δεδομένα από την κυτταρομετρία ροής με τα αντίστοιχα από την αλληλούχιση των γονιδίων TRBV-TRBD-TRBJ δεν παρατηρήθηκε άμεση σύνδεση των αποτελεσμάτων. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει πλήρη αντιπροσώπευση των οικογενειών του TR ρεπερτορίου στο kit και μάλιστα ότι αποσιάζουν γονίδια με υψηλή συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς με CIN μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κυτταρομετρία ροής δεν είναι η καταλληλότερη μέθοδος για την εξαγωγή δεδομένων για το ρεπερτόριο των TRB γονιδίων για τους ασθενείς με CIN.

Επισημαίνεται ότι η έκταση της επιλεκτικότητας του ρεπερτορίου στα CD8⁺ T κύτταρα μπορεί να εξακολουθεί να υποτιμάται εξαιτίας των δεδομένων περιορισμών των κλασικών μεθόδων υποκλωνοποίησης. Πράγματι, στην μελέτη μας ένας κλωνότυπος θεωρείτο διευρυμένος όταν αποτελείτο από ≥ 2 πανομοιότυπες TRBV-TRBD-TRBJ αναδιατάξεις. Παρόλα αυτά, υπάρχει η

πιθανότητα ένα singleton να αντιπροσωπεύει έναν *in vivo* διευρυμένο κλώνο, ο οποίος απέτυχε να ταυτοποιηθεί εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης μεθόδου. Με μια μέθοδο υψηλότερης απόδοσης, η ίδια αναδιάταξη θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί και ενδεχομένως ν' αποτελεί διευρυμένο κλωνότυπο.

Ανεξάρτητα από τις πραγματικές συχνότητες των διευρυμένων κλωνοτύπων, τα περιορισμένα ρεπερτόρια που παρατηρήθηκαν υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη κοινών αντιγόνων που οδήγησαν σε έκπτυξη αντίστοιχων CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στα πλαίσια συγκεκριμένων περιορισμών (restrictions) HLA τάξης I (Delon *et al*, 1998; Germain *et al*, 1999; Contini *et al*, 2003). Υπέρ αυτής της υπόθεσης είναι το εύρημα της αυξημένης έκφρασης του HLA-A μεταξύ των ασθενών με CIN. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς επικρατούν τα HLA-A*01 και HLA-A*02 αλληλίες που συνολικά εκφράζονται στο 65% των ασθενών με CIN). Αυτή η συχνότητα είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αναμενόμενη στον πληθυσμό της Κρήτης (37%, n=135), όπως βρέθηκε από δημόσια διαθέσιμα αρχεία (<http://www.allelefrequencys.net>).

Σε σύγκριση του ρεπερτορίου των TRBV γονιδίων των CD8⁺ κυττάρων παρατηρήθηκε εμφάνιση ίδιων γονιδίων σε όλους τους ασθενείς με CIN που αναλύθηκαν. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των γονιδίων μπορεί να ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς, όμως το γεγονός της ύπαρξης κοινών γονιδίων, αναδεικνύει για πρώτη φορά μοριακά δεδομένα για την αντιγονική επιλογή των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στη CIN. Επίσης, για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκαν κοινοί, «δημόσιοι» κλωνότυποι μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Η πιθανότητα να εντοπιστούν κοινοί κλωνότυποι κατά τύχη είναι αμελητέα (Arstila *et al*, 1999; Nikilich-Zugich *et al*, 2004). Επίσης, η πιθανότητα τα ευρήματά μας να είναι αποτέλεσμα διαμόλυνσης (PCR contamination) αποκλείστηκε, καθώς κοινοί κλωνότυποι ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα στα οποία η ανάλυση έγινε σε διαφορετικά εργαστήρια και σε διαφορετικό χρόνο. Με βάση τα παραπάνω, υποστηρίζουμε ότι ένας «δημόσιος» κλωνότυπος που ανιχνεύεται σε διαφορετικούς CIN ασθενείς αντικατοπτρίζει επιλογή από ένα κοινό αντιγονικό ερέθισμα και/ή μια κοινή άνοση διαδικασία που έχει ρόλο στην παθογένεια/παθοφυσιολογία της CIN. Το εύρημα των κοινών TRB CDR3 μοτίβων στους κλωνότυπους με συγκεκριμένο CDR3 μήκος και η χρησιμοποίηση συγκεκριμένων TRBV γονιδίων ενισχύουν ακόμα περισσότερο την παραπάνω υπόθεση.

Παρόλο που η μοριακή ανάλυση του TRB δεν προσφέρει αποδείξεις για το είδος του αντιγόνου, επιχειρήσαμε να συγκεντρώσουμε έμμεσες ενδείξεις συγκρίνοντας τις TRBV-TRBD-TRBJ αναδιατάξεις των CIN ασθενών με ταυτοποιημένες αλληλουχίες. Χρησιμοποιήσαμε ρεπερτόρια από τη βάση δεδομένων LIGM-DB και/ή από δημοσιευμένες μελέτες για άλλες αιματολογικές διαταραχές, αυτοάνοσα νοσήματα, λοιμώξεις και φυσιολογικά T-κύτταρα (Papadaki *et al*, 2002; Papadaki T *et al*, 2003; Stamatopoulos *et al*; Stalika *et al*, 2011; Papalexandri *et al*, 2013; Stalika *et al*, 2014). Μια αλληλουχία από τους «δημόσιους» κλωνοτύπους στη CIN ήταν πανομοιότυπη με αλληλουχία που αντιστοιχεί σε κλώνος ειδικός για τον EBV (Miles *et al*, 2005; Tynan *et al*, 2007). Ωστόσο, αυτό δε μπορεί να θεωρηθεί ως απόδειξη για την εμπλοκή του EBV στην παθογένεια της CIN, καθώς θα μπορούσε να οφείλεται απλώς σε λοίμωξη από EBV. Έτσι, η φύση των ερεθισμάτων που οδηγούν στην επιλογή των κλώνων των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων στην CIN παραμένει κατά μεγάλο μέρος άγνωστη. Σίγουρα, ωστόσο, με τα δεδομένα μας μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι οι εκπύξεις των T κυτταροτοξικών κυττάρων στους ασθενείς με CIN μπορεί να είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας έκθεσης σε μια περιορισμένη ομάδα (αυτο)αντιγόνων.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την έντονη επιλεκτικότητα (skewing) του ρεπερτορίου των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στην CIN που σε συνδυασμό με την αυξημένη συχνότητα συγκεκριμένων HLA τάξης I και τον ενεργοποιημένο φαινότυπο των T λεμφοκυττάρων, υποδεινύει τη συμμετοχή στην παθογένεση της νόσου (αυτο)αντιγόνου/ων που σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της CIN. Η ταυτοποίηση κοινών κλωνοτύπων μεταξύ διαφορετικών ασθενών υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών αντιγονικών στοιχείων και/ή άνοσων διαδικασιών στην οντογένεση της CIN. Η φύση των αντιγόνων μένει να διευκρινιστεί.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*. 1999;286(5441):958-61.

Ashwell JD, Klusner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology*. 1990;8:139-67.

Clemente MJ, Wlodarski MW, Makishima H, et al. Clonal drift demonstrates unexpected dynamics of the T-cell repertoire in T-large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2011;118:4384–4393.

Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual Review of Immunology*. 1988;6:629-62.

Contini P, Ghio M, Poggi A, et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *European journal of immunology*. 2003;33(1):125-34.

Dale DC. Neutrophil disorders: benign, quantitative abnormalities of neutrophils. McGraw-Hill Publishing Company, New York, 1991.

Delon J, Gregoire C, Malissen B, et al. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity*. 1998;9(4):467-73.

Gemetzi C, Mavroudi I, Koutala H, Velegraki M, Choulaki C, Damianaki A, Pontikoglou C, Papadaki HA Lymphopenia in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with decreased number of T-lymphocytes containing T-cell receptor excision circles. *Eur J Haematol*. 2012 Mar;88(3):210-23. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01722.x. Epub 2011 Nov 24

Germain RN, Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annual review of immunology*. 1999;17:467-522.

Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. *Cold Spring Harbor protocols*. 2011;2011(6):695-715.

Harty JT¹, Tinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:275-308.

Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) gene. *J Clin Pathol*. 2003; 56:1-11.

Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Immunology 5 th Edition

Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lympho- proliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120:3048–3057.

Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2013;122: 2453–2459.

Klausner RD, Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annual Review of Cell Biology*. 1990;6:403-31.

Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366:1905–1913.

Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annual Review of Immunology*. 1986;4:529-91.

Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research*. 2009;19(9):1639-45.

Lefranc MP¹. Organization of the human T-cell receptor genes. *Eur Cytokine Netw*. 1990 Aug-Sep;1(3):121-30.

Lefranc MP. *Immunochemistry*, van Oss CJ and van Regenmortel MHV. Eds Marcel Dekker Inc., New York, 1994, pp129-157.

Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Muller W, Bontrop R, Lemaître M, Malik A, Barbie V, Chaume D, IMGT, the international ImMunoGeneTics database, *Nucleic Acids Res*, 1999, 27, 209-212.

Lefranc MP, IMGT, the international ImMunoGeneTics database, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 307-331.

Lewis SM. The Mechanism of V(D)J Joining: Lessons from Molecular, Immunological, and comparative Analyses. *Advances in immunology* 1994;56:27-150.

Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 1999; 101-117.

Miles JJ, Elhassen D, Borg NA, et al. CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *Journal of immunology*. 2005;175(6):3826-34.

Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(2):123-32.

O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004;172: 1960–1969.

Palmblad J, Papadaki HA. Chronic idiopathic neutropenias and severe congenital neutropenia. *Current opinion in hematology*. 2008;15(1):8-14.

Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF-beta1 by bone marrow stromal cells. *European journal of haematology*. 1999;63(3):154-62.

Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *European journal of haematology*. 2001;67(1):35-44.

Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, et al. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood*. 2003;101(7):2591-600.

Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, et al. Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *British journal of haematology*. 2005;128(6):863-76.

Papadaki HA, Pontikoglou C. Pathophysiologic mechanisms, clinical features and treatment of idiopathic neutropenia. *Expert review of hematology*. 2008;1(2):217-29.

Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Paterakis G, Phisphis M, Stefanoudaki-Sofianatou K. Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leukemia research*. 2002;26(6):597-600.

Papadaki T, Stamatopoulos K, Anagnostopoulos A, Fassas A. Rituximab-associated immune myelopathy. *Blood*. 2003;102(4):1557-8.

Papalexandri A, Stalika E, Iskas M, et al. Molecular evidence for repertoire skewing of T large granular lymphocyte proliferation after allogeneic hematopoietic SCT: report of two cases. *Bone marrow transplantation*. 2013;48(9):1260-1.

Psyllaki M, Damianaki A, Gemetzi C, Pyrovolaki K, Eliopoulos GD, Papadaki HA. Impaired megakaryopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased transforming growth factor beta1 production in the bone marrow. *Br J Haematol*. 2006 Sep;134(6):624-31.

Ramsden DA, Baetz K, Wu GE. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:1785-1796.

Spanoudakis M, Koutala H, Ximeri M, Pyrovolaki K, Stamatopoulos K, Papadaki HA. T-cell receptor Vbeta repertoire analysis in patients with chronic idiopathic neutropenia demonstrates the presence of aberrant T-cell expansions. *Clinical immunology*. 2010;137(3):384-95.

Stalika E, Papalexandri A, Kannelis G, et al. Transient monoclonal CD3+ T large granular lymphocyte proliferation in a case of mantle cell lymphoma with Rituximab-associated late onset neutropenia. *Hematological oncology*. 2011;29(3):144-6.

Stalika E, Papalexandri A, Iskas M, et al. Familial CD3+ T large granular lymphocyte leukemia: evidence that genetic predisposition and antigen selection promote clonal cytotoxic T-cell responses. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(8):1781-7.

Stamatopoulos K, Papadaki T, Pontikoglou C, et al. Lymphocyte subpopulation imbalances, bone marrow hematopoiesis and histopathology in rituximab-treated lymphoma patients with late-onset neutropenia. *Leukemia*. 2008;22(7):1446-9.

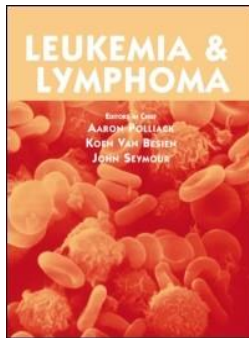
Tynan FE, Reid HH, Kjer-Nielsen L, et al. A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nature immunology*. 2007;8(3):268-76.

van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, 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*. 2003;17(12):2257-317.

Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P, The extent of the human germline T-cell receptor V β gene segment repertoire, *Immunogenetics*, 1994, 40, 27-36.

Wlodarski MW, Nearman Z, Jiang Y, Lichtin A, Maciejewski JP. Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia. *Experimental hematology*. 2008;36(3):293-300.

7. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ



Leukemia & Lymphoma

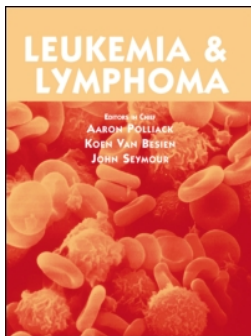
ISSN: 1042-8194 (Print) 1029-2403 (Online) Journal homepage:

<http://www.tandfonline.com/loi/lal20>

Cytotoxic T cells in chronic idiopathic neutropenia express restricted antigen receptors

Semeli Mastrodemou, Evangelia Stalika, Anna Vardi, Katerina Gemenetzi, Michalis Spanoudakis, Maria Karypidou, Irene Mavroudi, Anastasia Hadzidimitriou, Catherine Stavropoulos-Giokas, Helen A. Papadaki & Kostas Stamatopoulos

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2017.1324154>



Cytotoxic T cells in chronic idiopathic neutropenia express restricted antigen receptors

Semeli Mastrodemou, Evangelia Stalika, Anna Vardi, Katerina Gemenetzi, Michalis Spanoudakis, Maria Karypidou, Irene Mavroudi, Anastasia Hadzidimitriou, Catherine Stavropoulos-Giokas, Helen A. Papadaki & Kostas Stamatopoulos

To cite this article: Semeli Mastrodemou, Evangelia Stalika, Anna Vardi, Katerina Gemenetzi, Michalis Spanoudakis, Maria Karypidou, Irene Mavroudi, Anastasia Hadzidimitriou, Catherine Stavropoulos-Giokas, Helen A. Papadaki & Kostas Stamatopoulos (2017): Cytotoxic T cells in chronic idiopathic neutropenia express restricted antigen receptors, *Leukemia & Lymphoma*

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2017.1324154>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 23 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Cytotoxic T cells in chronic idiopathic neutropenia express restricted antigen receptors

Semeli Mastrodemou^a, Evangelia Stalika^b, Anna Vardi^b, Katerina Gemenetzi^b, Michalis Spanoudakis^a, Maria Karypidou^b, Irene Mavroudi^a, Anastasia Hadzidimitriou^b, Catherine Stavropoulos-Giokas^c, Helen A. Papadaki^{a,*} and Kostas Stamatopoulos^{b,d,*}

^aDepartment of Hematology, University of Crete School of Medicine, Heraklion, Greece; ^bInstitute of Applied Biosciences, Center for Research and Technology, Thessaloniki, Greece; ^cHellenic Cord Blood Bank, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens, Greece; ^dDepartment of Immunology, Genetics and Pathology, Science for Life Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden

ABSTRACT

Chronic idiopathic neutropenia (CIN) is an acquired disorder of granulopoiesis characterized by female predominance and mostly uncomplicated course. Crucial to CIN pathophysiology is the presence of activated T lymphocytes with myelosuppressive properties in both peripheral blood (PB) and bone marrow (BM). We systematically profiled the T cell receptor beta chain (TRB) gene repertoire in CD8⁺ cells of 34 CIN patients through subcloning/Sanger sequencing analysis of TRBV-TRBD-TRBJ gene rearrangements. Remarkable repertoire skewing and oligoclonality were observed, along with shared clonotypes between different patients, alluding to antigen selection. Cross-comparison of our sequence dataset with public TRB sequence databases revealed that CIN may rarely share common immunogenetic features with other entities, however, the CIN TRB repertoire is largely disease-biased. Overall, these findings suggest that CIN may be driven by long-term exposure to a restricted set of specific CIN-associated antigens.

ARTICLE HISTORY

Received 18 October 2016
Revised 12 April 2017
Accepted 24 April 2017

KEYWORDS

Chronic idiopathic neutropenia; T cell receptor; antigen selection

Introduction

Chronic idiopathic neutropenia (CIN) is an acquired disorder of granulopoiesis characterized by the prolonged and unexplained reduction of peripheral blood (PB) neutrophil count [1,2]. The disease mainly affects middle-aged women and generally displays a benign and uncomplicated course with rare evolution to acute myeloid leukemia [1–4]. CIN pathogenesis has been linked to increased production of inflammatory cytokines, namely tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 1 beta (IL1 β), interferon gamma (IFN γ), and Fas-ligand, in the bone marrow (BM), inducing Fas-mediated apoptosis of BM granulocyte progenitor cells and decreased neutrophil release in the PB [5,6]. It has been shown that the main source of these inflammatory cytokines in CIN BM is a T cell subpopulation with activated phenotype and myelosuppressive properties [7]. This evidence suggests that CIN shares common pathogenetic features with immune-mediated BM failure syndromes, e.g. aplastic anemia (AA) and myelodysplastic syndromes (MDS) [4]. That notwithstanding,


the triggering events underlying T cell activation in CIN remain unknown.

In a previous study from our group, using flow cytometry and molecular spectratyping of the T cell receptor beta complementarity-determining region 3 (TRB CDR3), we demonstrated that T cell clonal expansions are invariably detected in patients with CIN, with a polyclonal pattern within the CD4⁺ and an oligoclonal/monoclonal pattern within the CD8⁺ cells [8]. However, due to the inherent limitations of the applied methodologies, the detailed dynamics and composition of the T cell repertoire in CIN remained elusive.

In order to overcome these limitations, here we significantly extended our studies of the cytotoxic T cells in CIN through sequencing analysis of TRB gene rearrangements from a series of well characterized patients in order to obtain a comprehensive view about antigen involvement in CIN ontogeny. We report pronounced repertoire skewing and clonotypes shared by different patients ('public' clonotypes), strongly suggesting that CIN may be linked to

CONTACT Kostas Stamatopoulos  kostas.stamatopoulos@gmail.com  Institute of Applied Biosciences, Center for Research and Technology Hellas, 57001 Thessaloniki, Greece

*These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

cytotoxic cell expansions triggered by a restricted range of, as yet, unidentified antigen(s). These findings further support the concept that CIN shares common pathogenesis with other disorders characterized by T-cell- and cytokine-mediated suppression of hematopoiesis, perhaps representing a milder entity within the spectrum of these acquired immune-mediated BM failure syndromes.

Patients, material and methods

Patients and controls

Thirty-four patients with CIN (29 females and five males), aged 20–82 years (median age 52 years), diagnosed according to previously defined criteria [3–5], were included in the study. All patients had neutrophil counts $<1.8 \times 10^9/l$ (mean $1.34 \pm 0.36 \times 10^9/l$, range $0.3\text{--}1.6 \times 10^9/l$) for a period of 16–322 months (median duration 100 months), with no clinical, serological, or ultrasonic evidence of any underlying disease known to be associated with neutropenia and no history of exposure to irradiation, use of chemical compounds, or intake of drugs to which neutropenia might be ascribed. They also carried a normal BM karyotype and were found negative on serum leucoagglutination and immunofluorescence tests for antineutrophil antibodies. Cyclic and familial neutropenias were excluded by performing serial neutrophil enumerations in patients and their family members. Detailed patient characteristics are presented in Table 1. None of the patients had symptoms or signs of infection at the time of the sampling or in the preceding 3 months. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion and informed consent according to the Helsinki Protocol was obtained from all subjects studied.

Isolation of CD8⁺ T cells

CD8⁺ T cell subpopulations were isolated from the PB and BM mononuclear cell fraction by magnetic-activated cell sorting (MACS) (Mitenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's protocol. In all experiments, the purity of the CD8⁺ T cell subpopulation exceeded 96%, as estimated by flow cytometry.

PCR amplification and sequence analysis of TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangements

Total cellular RNA or genomic DNA (gDNA) was isolated from CD8⁺ cells of PB ($n = 22$) and BM ($n = 12$) samples.

RNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using the SuperScript II RT kit (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA). Amplification of TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangements was performed according to the BIOMED-2 protocol on either genomic DNA ($n = 24$) or complementary DNA (cDNA, $n = 10$) [9].

PCR products were gel-purified with the QIAGEN DNA purification columns (QIAGEN, Hilden, Germany), ligated into pCR2.1 vectors (Invitrogen Life technologies), and transformed into *Escherichia coli*/TOP10F' competent bacteria (Invitrogen Life technologies). Individual colonies were chosen randomly and sequenced using M13 primers.

Sequence data were analyzed using the IMG/V-QUEST tool from the international ImMunoGeneTics information system® (<http://www.imgt.org>) [10]. Only productive TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangements carrying in-frame complementarity-determining region 3 sequences and utilizing functional TRBV genes were included in the analysis.

All productive TRBV–TRBD–TRBJ rearrangement sequences from patients with CIN were aligned and compared to a panel of 5717 non-redundant, well-annotated, productive TRBV–TRBD–TRBJ rearrangement sequences from various entities (normal, autoreactive, and malignant T cell clones), available to our group ($n = 1715$) or retrieved from the IMG/LIGM-DB sequence database (<http://www.imgt.org/IMGIndex/LIGM.html>) ($n = 4002$).

Immunogenetic definitions

Clonotypes were defined as TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangements with the same TRBV gene and TRB CDR3 amino acid sequence. Clonotypes were considered expanded (forming clusters) when they comprised ≥ 2 sequences, with the most expanded clonotype within a sample referred to as the immunodominant clonotype. The relative frequency of each clonotype/sample corresponds to the number of rearrangements contained in a clonotype divided by the total number of subcloned productive rearrangements for that particular sample. For repertoire analysis, clonotypes rather than single rearrangements were considered so as to avoid potential biases due to clonal expansion secondary to antigenic stimulation. Although the demarcation of borders between mono-, oligo-, and poly-clonality for patients with lymphoproliferations, particularly cytotoxic T cell expansions, is still largely debated and essentially arbitrary [11–15], for this study we deemed cases with expanded, immunodominant clones with frequency $>7.5\%$ or $>30\%$ of the total repertoire

Table 1. Demographic and laboratory data of the studied patients.

| UPN | Age (years) | Sex | Duration of CIN (months) | Hb (g/dl) | WBC ($\times 10^9/L$) | Neutro ($\times 10^9/L$) | Lympho ($\times 10^9/L$) | Mono ($\times 10^9/L$) | Plts ($\times 10^9/L$) |
|-----|-------------|-----|--------------------------|-----------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 61 | F | 36 | 13.5 | 3.6 | 1.6 | 1.7 | 0.2 | 165 |
| 2 | 40 | F | 78 | 13.8 | 4.3 | 1.6 | 1.8 | 0.8 | 261 |
| 3 | 27 | F | 58 | 12.2 | 4.1 | 1.6 | 2.2 | 0.2 | 140 |
| 4 | 35 | M | 60 | 16.8 | 3.5 | 1 | 1.7 | 0.6 | 183 |
| 5 | 36 | F | 96 | 11.5 | 3.8 | 1 | 1.3 | 0.3 | 271 |
| 6 | 79 | F | 72 | 12.8 | 3.2 | 1.6 | 0.8 | 0.5 | 182 |
| 7 | 48 | F | 204 | 11.7 | 3.7 | 1.6 | 1.8 | 0.3 | 210 |
| 8 | 82 | F | 240 | 12.4 | 3.5 | 1.3 | 1.7 | 0.4 | 217 |
| 9 | 59 | F | 120 | 14.5 | 3.9 | 1.6 | 1.7 | 0.3 | 292 |
| 10 | 73 | F | 130 | 13.5 | 5.1 | 1.3 | 3.2 | 0.6 | 202 |
| 11 | 70 | F | 120 | 12.3 | 3.6 | 1.6 | 1.4 | 0.3 | 169 |
| 12 | 55 | F | 120 | 13.1 | 3.4 | 1.6 | 1.4 | 0.3 | 132 |
| 13 | 39 | F | 60 | 13.5 | 3.5 | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 254 |
| 14 | 63 | F | 98 | 13.6 | 3.7 | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 210 |
| 15 | 66 | F | 276 | 11.1 | 3.9 | 1.6 | 1.9 | 0.4 | 323 |
| 16 | 44 | F | 120 | 12.9 | 2.4 | 1.2 | 0.8 | 0.4 | 161 |
| 17 | 37 | F | 118 | 13 | 3.3 | 1.5 | 1.4 | 0.3 | 277 |
| 18 | 53 | F | 115 | 14.2 | 2.6 | 0.4 | 1.6 | 0.3 | 313 |
| 19 | 53 | F | 120 | 13 | 3.3 | 1.5 | 1.4 | 0.3 | 277 |
| 20 | 60 | F | 115 | 11.1 | 3.9 | 1.6 | 1.9 | 0.4 | 323 |
| 21 | 48 | F | 22 | 12.8 | 3.1 | 1.1 | 1.5 | 0.4 | 278 |
| 22 | 20 | F | 76 | 14.3 | 4.5 | 1.3 | 2.8 | 0.4 | 275 |
| 23 | 62 | F | 100 | 12.6 | 3 | 1.5 | 1.1 | 0.3 | 154 |
| 24 | 45 | F | 100 | 12.6 | 3 | 1.5 | 1.1 | 0.3 | 154 |
| 25 | 49 | F | 16 | 13.8 | 4.2 | 1.6 | 2 | 0.6 | 185 |
| 26 | 70 | F | 322 | 11.8 | 3 | 1.6 | 1.1 | 0.3 | 149 |
| 27 | 56 | F | 25 | 14.2 | 2.9 | 0.6 | 1.8 | 0.1 | 244 |
| 28 | 51 | M | 180 | 14.1 | 3.7 | 1.6 | 1.6 | 0.5 | 181 |
| 29 | 37 | F | 28 | 14.1 | 3.5 | 1.3 | 1.8 | 0.3 | 117 |
| 30 | 47 | M | 50 | 14.8 | 4.3 | 1.6 | 2.5 | 0.2 | 241 |
| 31 | 65 | F | 115 | 13 | 3.1 | 1.1 | 1.5 | 0.4 | 278 |
| 32 | 37 | M | 85 | 15.1 | 3 | 0.3 | 2 | 0.4 | 298 |
| 33 | 44 | F | 100 | 12.2 | 2.8 | 1.3 | 1.2 | 0.3 | 189 |
| 34 | 56 | F | 100 | 13.4 | 2.7 | 0.8 | 1.5 | 0.3 | 193 |

UPN: unique patient number; Hb: hemoglobin; WBC: white blood cells; Neutro: neutrophils; Lympho: lymphocytes; Mono: monocytes; Plts: platelets.

oligo- and monoclonal, respectively, taking into consideration the low-throughput scale of analysis by classic subcloning and Sanger sequencing.

Screening for *STAT3* mutations

Exon 21 sequences of the *STAT3* gene were amplified on genomic DNA from ficoll-separated mononuclear cells of PB and BM samples in 25 of 34 patients included in the study. PCR products were subjected to bidirectional Sanger sequencing. Sequence data were analyzed using the Vector NTI alignment tool (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). The sensitivity of our approach for detecting *STAT3* mutations is 15%.

Statistical analysis

Descriptive statistics for categorical variables included frequency distributions while for quantitative variables, statistical measures included mean, median, and standard deviation. Associations between categorical variables were evaluated using the χ^2 -test. Significance of bivariate relationships between factors and variables normally distributed was assessed with the use of

Student's *t*-test. In cases where the underlying distribution was not normal, the Mann–Whitney test was performed.

All statistical analyzes were performed with the use of the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) and the Statistica Software 10.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, OK).

Circos graph were created using freeware, licensed under GPL, and available at <http://circos.ca> [16].

Results

CD8⁺ cells in CIN express a restricted TRB gene repertoire

Overall, 1037 TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangement sequences were collected (19–46/sample, mean = 28). Of these, 806 (78%) were productive (6–36/case, mean = 25), i.e. using functional TRBV genes and carrying in-frame TRB CDR3, and were included in the analysis; the remaining 231 rearrangements were unproductive mainly due to out-of-frame CDR3 junctions.

The evaluated productive rearrangements corresponded to 546 distinct clonotypes (4–27/case,

mean = 17). Thirty-four functional TRBV genes were identified. The most frequent genes were TRBV27, contributing to 59 clonotypes, and TRBV6-5 (11% each), followed by TRBV28 (9.8%), TRBV6-2 (8.9%), TRBV19 (8.9%), and TRBV6-1 (7.4%). Thus, collectively, six TRBV genes accounted for almost 57% of all clonotypic rearrangements (Figure 1(A)). However, at the individual case level, different TRBV gene frequencies were observed (Figure 1(B)).

TRBD genes were identified in 517/546 (94.7%) clonotypes (TRBD1 and TRBD2 in 357 and 160 clonotypes, respectively). Most clonotypes utilized the TRBJ2-7 (139/546; 25.5%) and TRBJ1-2 (119/546; 21.8%) genes. The median TRB CDR3 length at the cohort level was 12 amino acids (range 8–19); the median CDR3 length of the clonotypes detected in individual cases differed up to five amino acids (11–16), with longer clonotypes generally prevailing among cases with more

pronounced skewing of the repertoire (deemed as oligo/monoclonal; see below).

Of note, homologous TRB CDR3 motifs restricted to the same CDR3 length were identified in multiple clonotypes from different patients utilizing different TRBV genes. Shared sequence motifs were broadly divided into two types: (1) 'combinatorial', that is, encoded by sequences of the D region and 5' J-region of specific combinations of TRBD–TRBJ genes, and (2) 'combinatorial + junctional', that is, encoded in part by the N-diversity regions (N1 and N2) generated by junctional diversity mechanisms, leading to restricted motifs at the TRBV–TRBD and/or TRBD–TRBJ gene junctions.

For clonality analysis, only samples with >15 sequenced productive rearrangements were considered ($n=33$), thus a single case with low sequence yield ($n=6$) was excluded. With the exception of a single case, all remaining cases ($n=32$) exhibited oligoclonality, i.e. were found to include at least one cluster of identical rearrangements (≥ 2) [expanded clonotype(s)]. In the 32 samples exhibiting clonal expansions, the number of expanded clonotypes per sample ranged from 1 to 6 (median 3). In 25/32 cases (78.1%), the dominant clonotype accounted for 7.7–25.8% of the total, shaping an oligoclonal profile, whereas in 7/32 cases (21.9%), it accounted for 38.8–84.6% of the total, indicative of monoclonality (Figure 2). The immunodominant clone utilized the TRBV28 gene in 6/32 (18.8%) CIN cases. The TRBV gene repertoire differed among oligoclonal and monoclonal cases, e.g. with over-representation of the TRBV6-1 and TRBV7-8 genes and under-representation of the TRBV19 and TRBV6-6 genes, respectively. However, these differences did not reach statistical significance, perhaps due to the relatively small number of monoclonal cases ($n=7$).

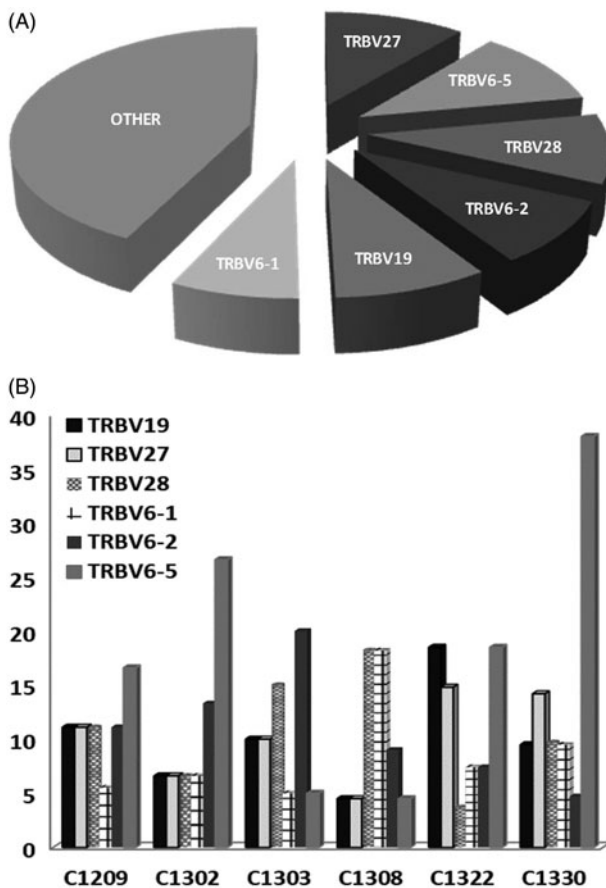


Figure 1. TRBV gene repertoire in CIN. (A) TRBV gene frequencies at cohort level. Only six TRBV genes accounted for more than half (57%) of all clonotypic rearrangements. (B) TRBV gene frequencies across patients. The frequencies of the six most prevalent TRBV genes at cohort level are depicted for six representative CIN cases.

Clonotypes shared between different patients

Cluster analysis of the TRB CDR3 amino acid (aa) sequences of all CIN cases identified seven distinct sequences shared by pairs of patients and, thus, deemed as 'public'. In 5/7 of these sequences, TRBV usage was also identical, whereas the remaining two 'public' sequences utilized different TRBV genes (Table 2).

We then investigated the HLA gene loci in these seven pairs of patients searching for possible matches and found that 3/7 shared at least one match among the tested loci.

Relaxing the stringency of our method, we next searched for clonotypes with high sequence similarity,

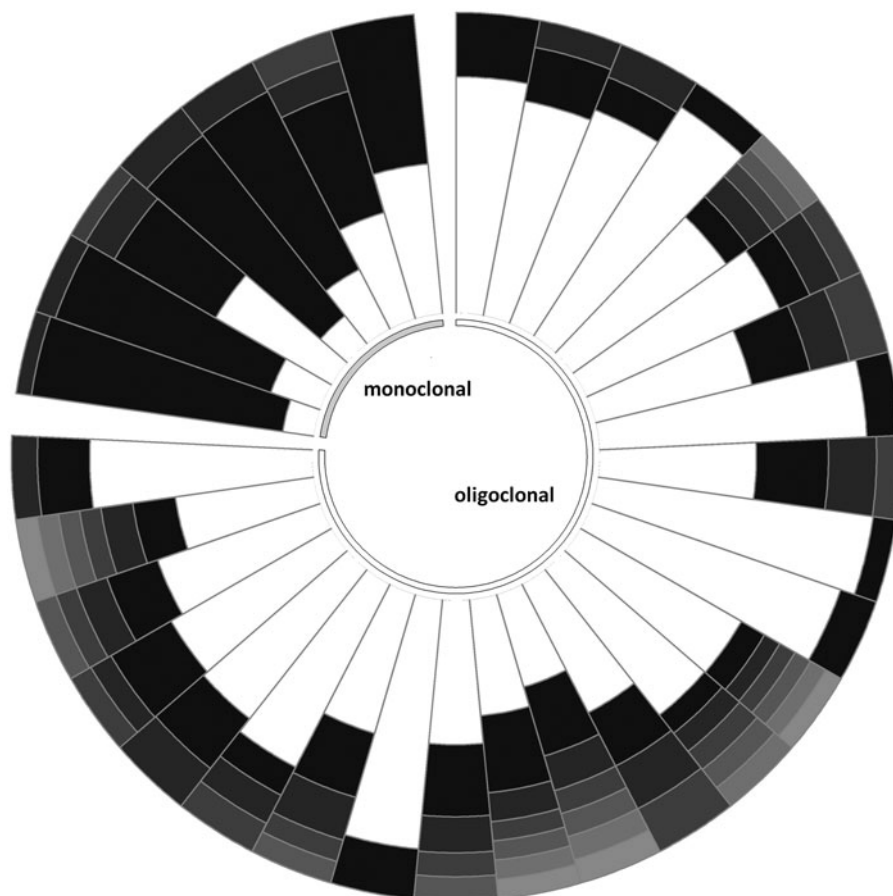


Figure 2. T cell clonality analysis for each subgroup of CIN patients (oligoclonal versus monoclonal). Each lane corresponds to a sample with clonal expansions (total $n = 32$) and each tile of a lane corresponds to the relative size of different expanded clonotypes within a sample. The inner tile (shown in white in all instances) depicts the polyclonal background, i.e. the cumulative frequency of all single clonotypes, within a sample.

Table 2. Pairs of patients who were found to share identical clonotypes or clonotypes with identical CDR3 amino acid sequence.

| Patient ID | TRBV gene | CDR3 amino acid sequence |
|------------|-----------|--------------------------|
| CIN 30 | TRBV7-9 | ASSLVAGAGELF |
| CIN 38 | | |
| CIN 18 | TRBV7-8 | ASSLGGYYEQY |
| CIN 21 | | |
| CIN 21 | TRBV7-8 | ASGRVGYEQY |
| CIN 38 | | |
| CIN 10 | TRBV7-2 | ASSSRLASSEQY |
| CIN 38 | | |
| CIN 25 | TRBV19 | ASSPRDKPNEKLF |
| CIN 36 | | |
| CIN 30 | TRBV6-2 | ASSDSSGANVLT |
| CIN 21 | TRBV6-4 | |
| CIN1202 | TRBV6-2 | ASSTGGYGYT |
| CIN1330 | TRBV6-1 | |

i.e. allowing for a single aa difference in the TRB CDR3 aa sequence. We identified nine such similar TRB CDR3 aa sequences utilized by pairs of patients. In 4/9 pairs of patients the TRBV gene was also identical, while the remaining 5/9 pairs utilized different TRBV genes (Supplemental Table 1).

Cross-comparison against public database sequences

We compared all productive TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangement sequences from our study ($n = 806$) against a panel of 5717 non-redundant, productive TRBV–TRBD–TRBJ gene rearrangement sequences from various entities available to our group or retrieved from the IMGT/LIGM-DB sequence database. Two clonotypes from our dataset were found to have an identical match within the public database and were also considered as ‘public’: (i) the first corresponded to a T cell clone detected after hematopoietic cell transplantation and (ii) the second corresponded to a T cell clone specific for the Epstein–Barr virus (Accession Number AM041153 in the IMGT/LIGM-DB sequence database). Notably, the latter clonotype also participated in one of the aforementioned ‘pairs’ with high CDR3 aa sequence similarity among CIN patients. When adopting a less stringent threshold for CDR3 amino acid identity (see above), several additional

'hits' with sequences from the public database were identified, as listed in the Supplemental Data. These similarities concerned sequences from patients with autoimmune disorders (rheumatoid arthritis, psoriatic arthritic, multiple sclerosis), myeloma, or Hodgkin lymphoma as well as patients analyzed after hematopoietic cell transplantation.

Cytotoxic T cell expansions in CIN display infrequent *STAT3* mutations

Mutations in exon 21 of the *STAT3* gene, encoding the Src homology 2 (SH2) domain which mediates the dimerization and activation of the STAT protein, were found in only 2/25 analyzed cases (8%). Both mutations concerned single nucleotide insertions at position 963, leading to frameshift. Immunogenetic analysis of the *STAT3*-mutant samples revealed an oligoclonal profile with the dominant clonotypes accounting for 17.4% and 24% of all clonotypes, respectively.

Discussion

Cytotoxic T cells play a prominent role in the pathophysiology of CIN [7,8]. This claim is supported by the identification of T cells with activated phenotype in patients' PB and BM but also by the suppression of autologous or normal granulocytic progenitor cell colony formation in the presence of patient T cells *ex vivo* [6]. Furthermore, flow cytometric evaluation and molecular spectratyping of the TRB CDR3 of CD4⁺ and CD8⁺ T cells revealed significant biases within the CD8⁺ T cell pool of CIN patients compared to controls, albeit not with a specific pattern [8].

Prompted by these observations, here we report the first-to-date immunogenetic characterization of the CD8⁺ T cell repertoire of patients with CIN. Our results provide strong evidence for CD8⁺ TRB gene repertoire skewing in practically all CIN patients analyzed, while also offering a new, detailed perspective into the repertoire restrictions observed in CIN, unattainable by flow cytometry and molecular spectratyping [8,17].

It should be noted that the extent of skewing in the CD8⁺ T cell repertoire may still be under-appreciated due to the inherent limitations of classic subcloning methods. Indeed, in our study a clonotype was considered expanded when comprising ≥ 2 identical TRBV–TRBD–TRBJ rearrangements. However, the possibility that a singleton (clonotype corresponding to a single, unique TRBV–TRBD–TRBJ rearrangement) represents an *in vivo* expanded clone, which was failed to be identified as such by a low-throughput method, cannot be *a priori* excluded.

Regardless of the actual frequencies of the expanded clonotypes, the observed repertoire restrictions strongly argue for antigenic drive, selectively affecting the CD8⁺ T cell pool, i.e. [18–20]. That said, further analysis is clearly warranted in order to specify the exact role of particular subpopulations (e.g. activated or effector cells) in CIN development.

Severe cytopenias can develop in a range of clinical syndromes associated with chronic CD8⁺ expansions, most notably T-large granular lymphocyte (T-LGL) leukemia, which was recently shown to exhibit activating *STAT3* mutations in 20–25% of cases, assisting in the differential diagnosis from reactive expansions [13,21]. With this in mind, we sought to obtain more insight into the biological background of the CD8⁺ T cell expansions identified in CIN, and found only a minor proportion (2/25 cases, 8%) of *STAT3*-mutant cases. This recalls previous findings in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients and further supports the argument that *STAT3*-mutant T-LGL clones may facilitate persistent dysregulated autoimmune activation, underlying BM failure in a subset of CIN patients [22]. Admittedly, the rather limited analytical sensitivity of Sanger sequencing may underestimate the true incidence of *STAT3* mutations in CIN, however, their presence (even in a minority of cases) further supports the concept that CIN shares common features with/is linked to lymphoproliferations of cytotoxic cells.

Besides providing molecular evidence of antigenic selection of the CD8⁺ T cells in CIN, the present study revealed the existence of shared ('public') clonotypes among different patients. Estimates of normal T cell repertoire diversity suggest that the chance that this may happen by serendipity is practically negligible [23,24]. The possibility that this finding may result from cross-contamination was also effectively ruled out, since shared clonotypes were identified in samples that were subjected to subcloning at different labs and different times. Therefore, one could reasonably argue that 'public' clonotypes present in different CIN patients reflect selection by public antigenic stimuli and/or shared immune processes underlying CIN development, at least for a proportion of cases. Additional support to this argument is provided by our finding of shared TRB CDR3 motifs in clonotypes of a given CDR3 length yet utilizing distinct TRBV genes, alluding to functional constraints.

Although TRB specificity cannot be deduced by sequence analysis alone, however, useful hints may derive from the analysis of the known specificity of similar TRs. With this in mind, we compared CIN TRBV–TRBD–TRBJ rearrangements with sequences identified in contexts other than CIN (retrieved from

the LIGM-DB database and/or published in previous studies from our group on other hematological disorders, autoimmune diseases, infections and the normal T cell repertoire) [14,15,25–28]. ‘Hits’ were found with sequences from other entities: for instance, one of the ‘public’ clonotypes was identical to that of a known EBV-specific clone [29,30], however, this cannot be considered as conclusive evidence of EBV implication in CIN pathogenesis, as it could result from latent EBV infection. Hence, overall, the nature of the selecting agents remained largely undisclosed after extensive cross-entity comparisons. On these grounds, it reasonable to argue that the cytotoxic T cell expansions detected in CIN may be driven by long-term exposure to a restricted set of specific CIN-associated (auto)antigens.

In conclusion, this study provides clear molecular evidence of CD8⁺ T cell repertoire skewing in CIN. This combined with the major HLA associations of CIN with certain class I alleles and the activated phenotype of the expanded T cells, supports that (auto)antigenic stimulation is relevant in the natural course of CIN, driving CD8⁺ T cell repertoire into oligo/monoclonality. The identification of common clonotypes among different patients alludes to the existence of shared antigenic elements and/or immune processes to CIN ontogeny. Whether these antigens are directly implicated in disease pathogenesis remains to be elucidated by functional studies.

Acknowledgements

This work was supported in part by the ENosAI project (code 09SYN-13-880) co-funded by the EU and the General Secretariat for Research and Technology of Greece; the KRIPIS action, funded by the General Secretariat for Research and Technology of Greece; H2020 ‘AEGLE, An analytics framework for integrated and personalized healthcare services in Europe’, by the EU; ‘MEDGENET’ (No. 692298) by the EU.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1324154>.

Funding

This work was supported in part by the ENosAI project (code 09SYN-13-880) co-funded by the EU and the General Secretariat for Research and Technology of Greece; the KRIPIS action, funded by the General Secretariat for Research and Technology of Greece; H2020 ‘AEGLE, An analytics framework for integrated and personalized healthcare services in Europe’, by the EU; ‘MEDGENET’ (No. 692298) by the EU.

References

- [1] Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol*. 2001;67:35–44.
- [2] Dale DC. Neutrophil disorders: benign, quantitative abnormalities of neutrophils. New York: McGraw-Hill Publishing Company; 1991.
- [3] Papadaki HA, Pontikoglou C. Pathophysiologic mechanisms, clinical features and treatment of idiopathic neutropenia. *Expert Rev Hematol*. 2008;1:217–229.
- [4] Palmblad J, Papadaki HA. Chronic idiopathic neutropenias and severe congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:8–14.
- [5] Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kostas T, et al. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood*. 2003;101:2591–2600.
- [6] Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF-beta1 by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol*. 1999;63:154–162.
- [7] Papadaki HA, Stamatopoulos K, Damianaki A, et al. Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Br J Haematol*. 2005;128:863–876.
- [8] Spanoudakis M, Koutala H, Ximeri M, et al. T-cell receptor Vβ repertoire analysis in patients with chronic idiopathic neutropenia demonstrates the presence of aberrant T-cell expansions. *Clin Immunol*. 2010;137:384–395.
- [9] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, 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*. 2003;17:2257–2317.
- [10] Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011:695–715.
- [11] O’Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004;172:1960–1969.
- [12] Clemente MJ, Wlodarski MW, Makishima H, et al. Clonal drift demonstrates unexpected dynamics of the T-cell repertoire in T-large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2011;118:4384–4393.
- [13] Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120:3048–3057.
- [14] Papalexandri A, Stalika E, Iskas M, et al. Molecular evidence for repertoire skewing of T large granular lymphocyte proliferation after allogeneic hematopoietic SCT: report of two cases. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:1260–1261.

- [15] Stalika E, Papalexandri A, Iskas M, et al. Familial CD3+ T large granular lymphocyte leukemia: evidence that genetic predisposition and antigen selection promote clonal cytotoxic T-cell responses. *Leuk Lymphoma*. 2014;55:1781–1787.
- [16] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009;19:1639–1645.
- [17] Wlodarski MW, Nearman Z, Jiang Y, et al. Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia. *Exp Hematol*. 2008;36:293–300.
- [18] Germain RN, Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:467–522.
- [19] Contini P, Ghio M, Poggi A, et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol*. 2003;33:125–134.
- [20] Delon J, Gregoire C, Malissen B, et al. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity*. 1998;9:467–473.
- [21] Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366:1905–1913.
- [22] Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2013;122:2453–2459.
- [23] Arstila TP, Casrouge A, Baron V, et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*. 1999;286:958–961.
- [24] Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:123–132.
- [25] Stalika E, Papalexandri A, Kannelis G, et al. Transient monoclonal CD3+ T large granular lymphocyte proliferation in a case of mantle cell lymphoma with Rituximab-associated late onset neutropenia. *Hematol Oncol*. 2011;29:144–146.
- [26] Papadaki T, Stamatopoulos K, Anagnostopoulos A, et al. Rituximab-associated immune myelopathy. *Blood*. 2003;102:1557–1558.
- [27] Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, et al. Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Res*. 2002;26:597–600.
- [28] Stamatopoulos K, Papadaki T, Pontikoglou C, et al. Lymphocyte subpopulation imbalances, bone marrow hematopoiesis and histopathology in rituximab-treated lymphoma patients with late-onset neutropenia. *Leukemia*. 2008;22:1446–1449.
- [29] Miles JJ, Elhassen D, Borg NA, et al. CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *J Immunol*. 2005;175:3826–3834.
- [30] Tynan FE, Reid HH, Kjer-Nielsen L, et al. A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nat Immunol*. 2007;8:268–276.