

Репертуар генов тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе в России и Беларуси

Б.В. Бидерман¹, Е.А. Никитин¹, Т.Ф. Сергиенко², А.В. Бакун²,
И.Б. Тарас², А.И. Свирновский², А.Б. Судариков¹

¹ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск

Контакты: Белла Вениаминовна Бидерман bella_biderman@mail.ru

Мутационный статус генов вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов давно известен как важный фактор долгосрочного прогноза при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ). Более детальное изучение последовательностей генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IgVH) привело к открытию стереотипных антигенных рецепторов (САР) — рецепторов, у которых совпадает набор использованных VH-, D- и JH-генов. Клетки, несущие САР, обнаружены почти в четверти всех случаев В-ХЛЛ. Данный феномен не наблюдается при других лимфатических опухолях. Подтверждены и расширены представления об основных закономерностях репертуара IgVH при В-ХЛЛ, в частности приведены наблюдения, касающиеся САР, а также различий репертуара IgVH при В-ХЛЛ в России и Беларуси.

Ключевые слова: В-ХЛЛ, репертуар IgVH, мутационный статус, стереотипные антигенные рецепторы

The repertoire of heavy chain immunoglobulin genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia in Russia and Belarus

B.V. Biderman¹, E.A. Nikitin¹, T.F. Sergienko², A.V. Bakun², I.B. Taras², A.I. Svirnovskiy², A.B. Sudarikov¹

¹Russian Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow;

²Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk

Mutation status of the heavy chain variable region genes has long been known as an important factor in long-term prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). A more detailed study of the gene sequences of immunoglobulin heavy chain (IgVH) led to the discovery of stereotyped antigen receptors (SAR) — receptors that have the same set of VH-, D- and JH-genes used. Cells with SARs have been found almost in a quarter of all B-CLL cases. This phenomenon is not observed in other lymphatic tumors. In our study, we confirmed and extended the basic observations concerning the repertoire of IgVH in B-CLL. Differences in the B-CLL IgVH gene repertoires between Russia, Belarus and other countries are also analysed and discussed.

Key words: CLL, IgVH gene repertoire, mutation status, stereotyped antigen receptors

Введение

В последние несколько лет значительно расширилось понимание патогенеза В-клеточного хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ). Появились новые клеточные и молекулярные маркеры, предсказывающие течение болезни и помогающие выбрать рациональную риск-адаптированную терапию.

В 1999 г. впервые было показано, что явление соматической гипермутации в перестроенных генах вариабельного региона иммуноглобулинов играет важную роль в предсказании течения болезни [1, 2]. Пациенты, клетки В-ХЛЛ которых экспрессируют немутированные гены иммуноглобулинов, имеют тенденцию к прогрессии заболевания и меньшую продолжительность жизни, по сравнению с теми, у которых гены иммуноглобулинов схожи с герминальными генами меньше, чем на 98%. Таким образом, наличие или отсутствие соматических мутаций позволяет выделить 2 подгруппы данного заболевания.

Молекулярный анализ генов тяжелой цепи вариабельного региона иммуноглобулинов (IgVH) показал значительные различия между клетками В-ХЛЛ и не-селектированными наивными В-клетками. Клетки В-ХЛЛ экспрессируют значительно суженный репертуар генов иммуноглобулинов, по сравнению с репертуаром В-клеток здоровых взрослых людей [3–5]. При В-ХЛЛ, в основном, перестраиваются гены семейств VH1, VH3 и VH4. Кроме того, ярко выражена специфичность на уровне использования генов — наиболее часто при В-ХЛЛ встречаются гены VH1-69, VH3-23, VH4-34. Шесть наиболее часто встречающихся при В-ХЛЛ генов наблюдаются в половине всех случаев В-ХЛЛ. Некоторые гены иммуноглобулинов гораздо чаще встречаются при немутированном варианте В-ХЛЛ (например, VH1-69, VH1-2), другие — при В-ХЛЛ с мутациями (VH4-34). Несмотря на то, что при обоих вариантах В-ХЛЛ частота использования семейств VH-генов приблизительно одинакова, исполь-

зование конкретных генов в значительной степени варьирует.

Кроме того, в разных странах частота использования VH-генов различна. Например, для скандинавских стран характерно очень высокое использование гена *VH3-21* — в 9% случаев [6, 7]. В странах Центральной и Южной Европы он встречается в 3 раза реже [5]. Интересно, что самые распространенные в Европе гены *VH3-21* и *VH1-69* практически не наблюдаются в азиатских странах [8, 9].

Некоторые группы исследователей показали наличие подгрупп В-ХЛЛ, содержащих очень близкие по гомологии («стереотипные») последовательности районов, определяющих комплементарность (CDR3), как среди случаев с генетическими мутациями, так и среди случаев без них [10–12]. Это поразительное сходство В-клеточных рецепторов в случаях, никак не связанных между собой и очень удаленных друг от друга географически, по-видимому, предполагает существование индивидуальных или структурно схожих антигенов [13].

Данное исследование посвящено изучению репертуара генов тяжелой цепи иммуноглобулинов у российских и белорусских пациентов с В-ХЛЛ.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование был включен 491 российский пациент с В-ХЛЛ, наблюдавшийся в Гематологическом научном центре с 2000 по 2012 г. Использовали также 56 образцов клеток пациентов с В-ХЛЛ, которые обследовались в гематологических отделениях 9-й городской клинической больницы г. Минска и в Республиканском научно-практическом центре гематологии и трансфузиологии МЗ Республики Беларусь в 2006–2010 гг. (ныне РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий). Большинство пациентов не получали лечения на момент взятия образца крови.

Выделение клеток. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте Ficoll-Нураque. Клетки российских пациентов мгновенно замораживали в жидком азоте и помещали на хранение при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. У белорусских пациентов источником клеток для получения нуклеиновых кислот служили свежевыделенные мононуклеары. ДНК хранили в 70% спирте при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выделение РНК и ДНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). Концентрацию определяли спектрофотометрически. Для обратной транскрипции использовали 2 мкг РНК каждого образца. Одноцепочечную кДНК синтезировали с использованием случайных гексамеров в качестве затравки и обратной транскриптазы М-MLV (Promega).

ДНК выделяли модифицированным солевым методом: клеточный осадок лизировали раствором, со-

держащим 100 mM Tris-Cl (pH 7,6), 40 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,2% SDS; насыщенным раствором ацетата аммония осаждали белки, после чего ДНК осаждали изопропанолом и промывали 70% этиловым спиртом.

Анализ генов IgVH. Для определения клональной перестройки IgVH, ДНК или кДНК пациентов амплифицировали в 6 отдельных реакциях с использованием праймеров, специфичных к VH-семействам, и консенсусного праймера JH [14]. Если с этим набором клональность установить не удавалось, использовались праймеры, рекомендованные BIOMED-2 [15]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 25 мкл, добавляя 5 пмоль каждого праймера и 2-кратную смесь для ПЦР, содержащую Taq-полимеразу (Promega). После первоначальной денатурации (5 мин при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$) цикл с условиями $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 с повторяли 35 раз, после чего выдерживали 10 мин при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клональный продукт очищали в 2% агарозном геле и элюировали с помощью набора Diatom DNA Elution (Биоком, Россия). ПЦР-продукт секвенировали с праймера, специфичного семейству перестроенного VH-гена или с JHcons с использованием набора Big Dye Terminator v3.1. (Applied Biosystems) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Полученные последовательности сравнивали с уже имеющимися в базе данных IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). Если последовательность клонального VH-гена совпадала с последовательностью одного из герминальных VH-генов на 98% и более, считали, что данный VH-ген соматической гипермутации не подвергался. При условии сходства последовательности клонального VH-гена менее 97,9%, считали, что клетка-предшественница клона В-ХЛЛ у данного больного подвергалась соматической гипермутации.

Результаты

Нами были проанализированы перестройки IgHV-D-J у 547 российских и белорусских пациентов с В-ХЛЛ. У части из них наблюдалось по 2 перестройки, одна из которых оказывалась непродуктивной — содержала стоп-кодон (данные не показаны). Использование границы в 98% сходства с герминальным геном выявило 192 (35%) пациента с мутированными VH-генами и 355 (65%) пациентов с немутированными. При этом 122 (63%) пациента с мутированными VH-генами имели меньше 95% гомологии с герминальными генами, 230 (65%) пациентов с немутированными генами обладали 100% сходством с герминальными генами.

Среди российских пациентов с отсутствием мутаций значительно преобладали мужчины (212 пациентов, 66%), среди пациентов с мутациями соотношение мужчин и женщин было приблизительно равным (45% женщин, 55% мужчин) (табл. 1). Медиана возраста не зависела от наличия мутаций генов *IgVH*.

Таблица 1. Распределение российских больных в зависимости от мутационного статуса генов варибельного региона иммуноглобулинов

	Варианты В-ХЛЛ				Все больные	
	Без мутаций		С мутациями			
Число больных	320		171		491	
Возраст (медиана)	59 (21–84)					
Пол (М:Ж)	212:108		94:77		306:185	
Наиболее часто используемые VH-гены	N	%	N	%	N	%
VH1-69	94	29	5	3	99	20
VH4-34	13	4	21	12	34	7
VH3-23	15	4,8	18	10	33	6,7
VH3-30	18	5,6	12	7	30	6
VH1-2	22	7	5	3	27	5,5

Среди белорусских пациентов соотношение мужчин и женщин было 2:1 в обеих подгруппах — с мутированными VH-генами и без мутаций. Медиана возраста в подгруппе без мутаций составила 63,5 года, в подгруппе с мутациями — 47 лет (табл. 2).

В 10 (2%) случаях из 547 не удалось определить ген *IgHD*, в 18 (3,2%) — *IgHJ*, 8 из этих случаев совпали. В группе с немутированными VH-генами было заметно существенное преобладание использования гена *JH6* (52%), в то время как в группе с мутированными VH-генами наблюдалось приблизительно одинаковое количество генов *JH4* (66 пациентов, 35%) и *JH6* (53 пациента, 27%).

Наиболее часто встречающиеся VH-гены различаются в подгруппах с разным мутационным статусом. Среди российских пациентов в группе с мутациями существенно преобладают VH-гены 3-го семейства (102 случая, 60%), в 3 раза реже встречаются гены 4-го семейства (38 случаев, 22%), в 14% — гены первого семейства. У пациентов без мутаций приблизительно с одинаковой частотой встречаются VH-гены первого (137 случаев, 43%) и 3-го (130 случаев, 40%) семейств. При этом в группе без мутаций наиболее распространены гены *VH4-34* (12%), *VH3-23* (10%), *VH3-30* (7%). В группе с высокой гомологией с герминальными VH-генами преобладают гены *VH1-69* (29%) и *VH1-2* (7%). Если рассматривать всю группу пациентов, то можно заметить что 7 наиболее распространенных VH-генов (*VH1-69*, *VH4-34*, *VH3-23*, *VH3-30*, *VH1-2*, *VH4-39*, *VH3-7*) наблюдаются в более чем половине всех случаев В-ХЛЛ (53%) (рис. 1).

Среди белорусских пациентов в группе без мутаций преобладают VH-гены первого семейства (54%), реже встречаются гены 4-го — в 31% случаев. В группе

Таблица 2. Распределение белорусских больных в зависимости от мутационного статуса генов варибельного региона иммуноглобулинов

	Варианты В-ХЛЛ				Все больные	
	Без мутаций		С мутациями			
Число больных	35		21		56	
Возраст (медиана)	63,5 (42–77)		47 (35–86)		63 (35–86)	
Пол (М:Ж)	23:12		14:7		37:19	
Наиболее часто используемые VH-гены	N	%	N	%	N	%
VH1-69	12	34	0	0	12	21
VH4-34	1	3	2	9,5	3	5
VH3-30	2	6	3	14	5	9
VH3-11	1	3	2	9,5	3	5
VH1-3	3	8,5	0	0	3	5

с мутациями, так же как и у российских пациентов, преобладают VH-гены 3-го семейства (67%), но распределение других семейств иное: гены первого встречаются в 19% и в 9,5% случаев — гены 4-го. Наиболее распространены следующие VH-гены: *VH1-69*, *VH3-30*, *VH4-34*, *VH3-23*, *VH1-2*, *VH3-11*, *VH3-9*.

Мы выделили 65 подгрупп стереотипных рецепторов у 198 (40%) из 491 российского пациента. Из них 21 подгруппа является подтвержденной — совпадает у 3 пациентов и более (110 пациентов из 192, 55%), 44 подгруппы — потенциальные — встречаются у 2 пациентов (88 случаев из 192, 45%). Следует отметить, что подавляющее большинство случаев подтвержденных стереотипных рецепторов встречается в подгруппе пациентов без мутаций генов *IgVH* (95%). Среди потенциальных подгрупп стереотипных рецепторов 15 пар пациентов с мутациями и без (34%), 7 пар пациентов с мутациями (16%) и 22 пары пациентов без мутаций генов *IgVH* (50%). Наиболее распространены следую-

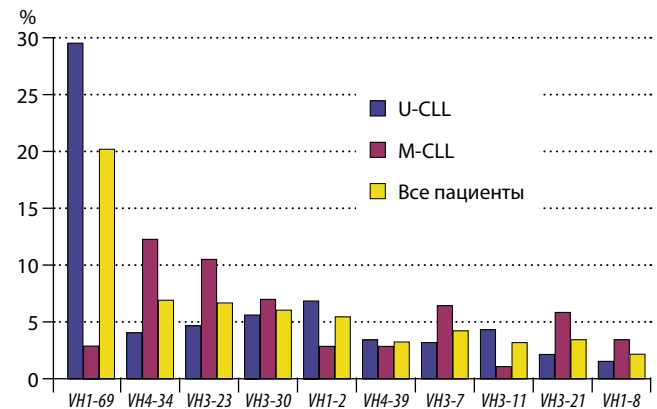


Рис. 1. Частота встречаемости наиболее распространенных VH-генов

Таблица 3. Частота встречаемости подтвержденных стереотипных антигенных рецепторов у российских пациентов

№	VH-ген	D-ген	JH-ген	Частота встречаемости
1	VH1-2	D1-26	JH6	5
2	VH1-2	D3-3	JH6	4
3	VH1-3	D6-19	JH4	4
4	VH1-69	D2-2	JH6	8
5	VH1-69	D3-10	JH6	6
6	VH1-69	D3-16	JH3	8
7	VH1-69	D3-22	JH4	4
8	VH1-69	D3-22	JH6	3
9	VH1-69	D3-3	JH4	3
10	VH1-69	D3-3	JH5	5
11	VH1-69	D3-3	JH6	24
12	VH3-11	D3-3	JH6	3
13	VH3-30	D3-10	JH6	3
14	VH3-33	D3-3	JH4	3
15	VH3-48	D2-2	JH6	3
16	VH3-48	D3-3	JH6	3
17	VH3-7	D3-3	JH6	3
18	VH4-34	D2-2	JH6	3
19	VH4-34	D3-22	JH4	4
20	VH4-34	D3-3	JH6	5
21	VH4-39	D3-3	JH5	3

щие стереотипные рецепторы: VH1-69/D3-3/JH6 (24 пациента, 5% всех пациентов с В-ХЛЛ); VH1-69/D3-16/JH3 (8 пациентов); VH1-69/D2-2/JH6 (8 пациентов); VH1-69/D3-10/JH6 (6 пациентов) (табл. 3).

Среди белорусских пациентов мы выделили только 4 подгруппы САР: 1 подтвержденную (4 случая) и 3 потенциальные. Подтвержденная (VH1-69/D3-3/JH6) и одна из потенциальных (VH1-69/D3-16/JH3) подгрупп входят в число наиболее распространенных подтвержденных групп САР российских пациентов. Остальные 2 потенциальные подгруппы (VH1-69/D2-15/JH6 и VH2-5/D2-2/JH6) у российских пациентов не наблюдались.

Обсуждение

В данном исследовании мы проанализировали и сравнили последовательности генов *IgVH* у 547 российских и белорусских пациентов с В-ХЛЛ. Наш анализ подтвердил и расширил представления о существующих закономерностях репертуара *IgVH* при В-ХЛЛ [3–5]. Распределение генов *IgVH* клеток В-ХЛЛ значительно отличается от репертуара *IgVH* нормальных В-клеток [3]. В статье [12] приводятся данные, свидетельствующие о том, что 10 наиболее распространенных VH-генов составляют около 62% всех случаев В-ХЛЛ, что подтверждает и наше исследование: гены *VH1-69*, *VH4-34*, *VH3-23*, *VH3-30*, *VH1-2*, *VH3-7*, *VH4-39*, *VH3-11*, *VH3-21*, *VH1-8* встречаются в 61,7% случаев у российских пациентов. У белорусских пациентов мы не обнаружили гены *VH3-7*, *VH4-39* и *VH3-21*, что, возможно, объясняется существенно меньшей выборкой, по сравнению с российской. Большинство выявленных нами подгрупп подтвержденных стереотипных рецепторов также соответствует ранее полученным данным международных исследовательских групп [16].

В то же время нельзя не отметить тот факт, что в разных странах частота использования VH-генов различна (рис. 2). Так, например, в России и Беларуси ген *VH1-69* встречается в 20% всех случаев В-ХЛЛ (т. е. фактически, этот ген обнаруживается у каждого 5-го пациента с В-ХЛЛ), причем практически всегда (95%) в немутированном варианте. Данные группы исследователей [17] показывают столь же высокую встречаемость гена *VH1-69* у украинских пациентов с В-ХЛЛ. В остальных европейских странах этот ген встречается реже: около 14% случаев в Швеции, Франции и Испании, 11% в Великобритании и около 6–7% в Греции и Италии [5, 12, 18]. При этом во всех вышеперечисленных странах этот ген также преобладает у пациентов с немутированными VH-генами. Для скандинавских стран характерно очень частое использование гена *VH3-21* — 9% случаев, в то время как в России и в странах Центральной и Южной Европы он встречается в 3 раза реже

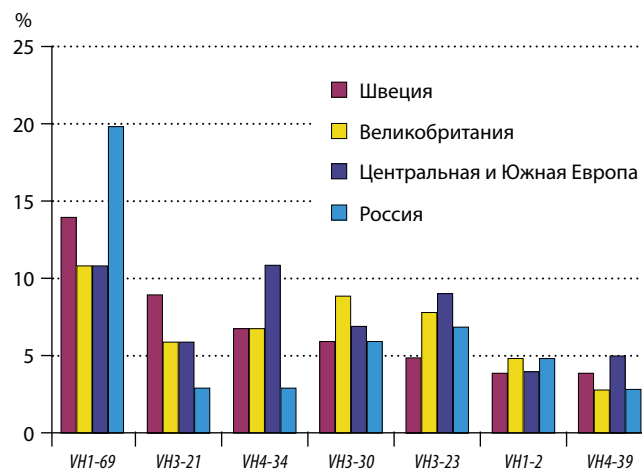


Рис. 2. Частота использования наиболее распространенных VH-генов в разных странах

(около 3%), а в белорусской выборке мы его не обнаружили [5–7]. Этот ген также известен тем, что он ассоциирован с плохим прогнозом течения В-ХЛЛ, независимо от мутационного статуса генов *IgVH*. Интересно, что в азиатских странах (Китай, Япония, Ирак) гены *VH1-69* и *VH3-21* практически не наблюдаются [8, 9, 19]. По данным исследований, в этих странах при В-ХЛЛ преобладают VH-гены 3-го и 4-го семейств, в то время как в Европе и США, в основном, преобладает 3-е семейство, а VH-гены первого и 4-го семейств встречаются либо приблизительно поровну, либо гены первого семейства обнаруживаются гораздо чаще [5–9, 16–21].

Заключение

Сужение репертуара генов Ig — специфическая особенность В-ХЛЛ. Эта его черта говорит о том, что развитие данного заболевания является не случайным процессом, а, по-видимому, связано с влиянием антигена, по крайней мере, в части случаев. Кроме того, можно предположить, что на развитие В-ХЛЛ также оказывают влияние какие-то специфические факторы географического микроокружения. Так или иначе, не исключено, что в дальнейшем принятие терапевтических решений будет основываться не только на данных мутационного статуса генов *IgVH*, но и на характеристиках непосредственно антигенного рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

- Damle R.N., Wasil T., Fais F. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840–7.
- Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A. et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1848–54.
- Fais F., Ghiotto F., Hashimoto S. et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998;102(8):1515–25.
- Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804–15.
- Ghia P., Stamatopoulos K., Belessi C. et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678–85.
- Tobin G., Thunberg U., Johnson A. et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003;101:4952–7.
- Tobin G., Thunberg U., Johnson A. et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99:2262–4.
- Nakamura N., Kuze T., Hashimoto Y. et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of 101 cases with peripheral B cell neoplasms and B cell chronic lymphocytic leukemia in the Japanese population. *Pathol Int* 1999;49:595–600.
- Farsangi M.H., Jeddi-Tehrani M., Sharifian R.A. et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain variable region gene expression in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007;48:109–16.
- Widhopf G., Rassenti L., Toy T. et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells of over one percent of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; 104(8):2499–504.
- Messmer B.T., Albesiano E., Efremov D.G. et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004;200:519–25.
- Tobin G., Thunberg U., Karlsson K. et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;104:2879–85.
- Damle R.N., Ghiotto F., Valetto A. et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087–93.
- Campbell M.J., Zelenetz A.D., Levy S., Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region repertoire. *Mol Immunol* 1992;29:193–203.
- van Dongen J.J., Langerak A.W., 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; 17:2257–2317.
- Stamatopoulos K., Belessi C., Moreno C. et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007;109:259–70.
- Kryachok I., Abramenko I., Bilous N. et al. IGHV gene rearrangements as outcome predictors for CLL patients: experience of Ukrainian group. *Med Oncol* 2012 Jun; 29(2):1093–101.
- Duke V.M., Gandini D., Sherrington P.D. et al. VH gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88:1259–71.
- Chen L., Zhang Y., Zheng W. et al. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2008;32:1491–8.
- Crespo M., Bosch F., Villamor N. et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764–75.
- Nardini E., Neri F., Vicenzi E. et al. Thymic function and immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer* 2003;107:958–61.