

Диагностическая значимость исследования реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов

Павлов К. И.

Резюме.

Исследование реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов имеет высокое диагностическое значение при хронических лимфобластных лейкозах и лимфомах. В статье обсуждается целесообразность исследования процессов реорганизации антигенраспознающих структур иммуноглобулинов в поликлональных популяциях лимфоцитов для изучения иммунопатогенеза вирусных инфекций. На примере лимфоцитарных популяций из крови здоровых добровольцев, пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита С и моноклональных контролей дана сравнительная оценка процессов генных реаранжировок в поликлональных популяциях В-клеток. Изложены способы интерпретации электрофоретической картины клональности и поликлональности.

Ключевые слова: гены тяжёлых цепей иммуноглобулинов, полимеразная цепная реакция, генные реаранжировки, хронический лимфобластный лейкоз

Введение.

Исследование процессов реаранжировок генов иммуноглобулинов, клонального статуса лимфоцитов представляет собой надёжный и наглядный тест, широко применяемый многими исследователями для диагностики тяжести многих гемобластозов, динамики течения заболевания и, главное, контроля излеченности. Данные исследования в последнее время всё более часто находят диагностическое применение, включаются в стандартные протоколы обследования пациентов. Значительный научный интерес представляет исследование клонального статуса и состояния реаранжировок генов иммуноглобулинов не только при гемобластозах, но и при иммунном ответе на инфекцию в «нормальных» поликлональных популяциях В-клеток.

Наличие специфических генных реанжировок и клональный статус используются как дополнительное к цитоморфологии и проточной цитометрии диагностическое исследование при хронических лимфобластных лейкозах и лимфомах [12]. При острых лимфобластных лейкозах предложены схемы анализа реанжировок генов иммуноглобулинов методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и Саузерн-блота [12]. К молекулярно-генетическому исследованию реорганизации генома прибегают для решения следующих трёх задач: 1) определение прогноза течения хронического лимфобластного лейкоза (исследование уровня соматических гипермутаций); 2) исследование динамики исчезновения опухолевого клона при химиотерапии; 3) детекция малых популяций лейкозных клеток, что важно для прогнозирования клинико-гематологических рецидивов и определения показаний к возобновлению химиотерапии. Последняя задача связана с определением так называемой минимальной резидуальной (остаточной)

болезни (МРБ) [14]. При острых и хронических лейкозах затруднительно выявить с помощью проточной цитометрии единичные оставшиеся после химиотерапии опухолевые клетки, которые могут в последствии дать генерацию для новой экспансии [1, 9]. При ПЦР-исследовании же достаточно небольшого количества клональных клеток лейкозной линии для того, чтобы после амплификации на электрофореграмме получить картину значительного отличия популяций лимфоцитов, содержащих клональный элемент и популяций, его не содержащих. [14]

Стабильность конфигурации В-клеточного рецептора может нарушаться не только в иммунопатогенезе гемобластозов, но и индуцироваться вирусно [1]. И, самое главное, качество реанжировок генов В-клеток может определять диапазон эффективности гуморального иммунного ответа, в частности, при противогриппозной иммунизации. Ведь в основе как лимфопролиферативных заболеваний, так и интенсивного поствакцинального ответа лежит схожий процесс массивной экспансии определённого моноклонального элемента в периферическую кровь [5]. Для анализа подобных ситуаций необходимо исследовать пограничные с клональностью состояния, либо полностью поликлональные популяции В-клеток, чтобы выявить, возможные механизмы снижения аффинности антител и возникающий в связи с этим скрытый иммунодефицит [1, 2, 3, 4].

Антитела - это белковые молекулы, способные к специфическому взаимодействию с конкретным антигеном. Они имеют Y-образную форму и состоят из 4-х цепей: двух лёгких и 2-х тяжёлых. То есть имеется два антигенраспознающих фрагмента и один участок взаимодействия с рецепторами собственных клеток. Остов молекулы определяется тяжёлыми цепями, при этом в распознавании антигена участвуют оба типа цепей [14]. Антигенная детерминанта оказывается зажата между гипервариабельными участками тяжёлых и лёгких цепей, при этом легкие цепи содержат остатки глицина, что позволяет добиваться высокой конформационной гибкости данных участков, а фрагменты тяжёлых цепей определяют основное стереохимическое соответствие [14].

Высокое разнообразие антигенраспознающих структур В-клеток достигается за счёт большого количества антигенных детерминант, закодированного множеством генов в разных хромосомах и, во-вторых, реорганизацией генома по мере функционального созревания В-клеток [6, 7, 8]. Совокупно, гены организованы в группы сцепления. Тяжёлые цепи имеют три группы сцепления, лёгкие - две группы сцепления. Нативная (Germinal line) форма соответствует максимально далёкому расположению групп сцепления генов, по мере же созревания В-лимфоцита, происходит делеции участков ДНК, разделяющих разные группы сцепления. Этот процесс называется соматической рекомбинацией (Gene rearrangement).

Реорганизация генома В-лимфоцитов в широком смысле, и реанжировки тяжёлых и лёгких цепей, как один из элементов этого явления – являются крайне сложным процессом, результирующим в образование высокоаффинных специфических антител при успешном исходе и

лимфопролиферативных заболеваниях при дисфункции. Причём интенсивность и скрупулёзность в изучении данной тематики зачастую открывала только массив новых вопросов и неясностей. Генетическая степень моноклональности является выраженным прогностическим признаком исходалимфопролиферативных заболеваний.

При изучении же специфического иммунного ответа не сопровождающегося иммунопролиферативной патологией роль исследования клональности В-клеток повышается, так как становятся не актуальны цитоморфологические методы исследования в силу отсутствия засилия кровяного русла бластными формами.

Иммунная система способна к специфическому ответу на всю совокупность как имеющихся в окружающей среде, так и новосинтезированных вариантов антигена. Однако, учитывая всё стереохимическое и конформационное разнообразие возможных антигенных детерминант, для кодирования всех ответных антителораспознающих структур по принципу «один ген – один белок» понадобился бы не только весь геном, но и, фактически, вся биомасса организма. Соответственно, синтез антигенраспознающих структур происходит с отходом от этого правила и определённой реорганизацией ряда фрагментов генома. Генетический механизм, лежащий в основе этой реорганизации открыли молекулярные биологи Судзуми Тонегава и Нобумиши Ходзуми в сериях экспериментов по сравнению ДНК В-лимфоцитов мышинных эмбрионов и взрослых животных [8, 13]. Разнообразие антигенраспознающих фрагментов антител связано с многочисленными свободными перетасовками (реаранжировками) групп генов, последовательным рядом делеций, процессинга и сплайсинга как на стадии линейной ДНК, так и посттранскрипционно.

Цель исследования: Охарактеризовать различия клональных и поликлональных популяций В-клеток. Оценить топографию продуктов генных реаранжировок тяжёлых цепей иммуноглобулинов в поликлональных популяциях лимфоцитов. На основе данных о качестве реаранжировок (длине ДНК-фрагментов, случаев отсутствия аллельного исключения, числе возможных субклонов, неспецифической дубликации ПЦР-продуктов) разграничить возможные формы внутри «нормальной поликлональной картины».

Материалы и методы.

Нормальная топография клонального статуса была исследована у 24-х здоровых добровольцев без системных и острых заболеваний возрастом от 18 до 31 года при соотношении мужчин и женщин 1:4. Также был исследован клональный статус у 10 пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита С в широком возрастном диапазоне (25-79 лет). Для исследования брались образцы венозной крови объёмом 4 мл. Мононуклеарные лейкоциты выделялись путём центрифугирования на градиенте Ficoll-Paque, и

концентрировались в количестве не менее 50 млн клеток в 100 мкл буферного раствора. Экстракция ДНК проводилась набором «Нуклеосорб-В» (РФ) в соответствии с инструкцией изготовителя. Качество и количество полученной ДНК определялось методом агарозного гель-фореза. Определение клональных реанжировок В-лимфоцитов проводилось с использованием праймеров набора ISH Somatic Hypermutation Assay (Invivoscribe Technologies, USA) после тестирования качества ДНК праймерами Specimen Control Size Ladder (Invivoscribe Technologies, 2-096-0020). ПЦР реакция проводилась по стандартной схеме с использованием не менее 1,0 U SynTaq полимеразы («Синтол», РФ), 7 мкл исследуемого образца ДНК и длительностью в 34 цикла [14]. Детекция результатов производилась путём гель-фореза в 1 % и «вязкой» 3 % агарозе с этидием бромидом и учётом на трансиллюминаторе. В качестве стандартного клонального контроля использована ДНК линии IVS-0013 Clonal Control (DNA № 4-088-0730, Invivoscribe Technologies). В качестве поликлонального контроля была использована ДНК линии IVS-0000 Polyclonal Control, (DNA № 4-092-0010, Invivoscribe Technologies). Съёмка фореграмм проводилась на цифровую фотокамеру с разрешением 14 мегапикселей, сохранением в формате .jpg и последующим анализом пакетом программ GelAnalyzer.

Результаты.

В группу сцепления генов тяжёлых цепей входят следующие гены:

- 1) V-вариабельные гены, которых более 120, причём каждый из них имеет собственный L-фрагмент, кодирующий свой собственный лидерный пептид;
- 2) D (diversity)-мини-гены, которых имеется около 27-ми вариантов. По длине разные варианты D-генов не одинаковы: 10, 17 и 23 основания, что также создаёт предпосылки для широкого диапазона ПЦР-продуктов V(D)J-рекомбинаций в разных клонах В-клеток;
- 3) J (joining)-мини-гены в 6-ти вариантах, два из которых-псевдогены;
- 4) C-гены (constant) в 10-11 (два псевдогена) возможных вариантах, определяющие изотип иммуноглобулина.

При созревании В-лимфоцитов сперва происходит произвольная D-J рекомбинация с последующей делецией всех иных фрагментов (Первое рекомбинационное событие), далее происходит делеция между уже сформированным D-J рекомбинантом и одним из LV-участков (Второе рекомбинационное событие). Совокупно, V(D)J-фрагмент определяет вариабельный домен тяжелой цепи. С типом присоединяемого далее константного фрагмента связан класс получающегося иммуноглобулина. Вначале происходит сплайсинг предшественника матричной РНК V(D)J фрагмента с аналогичной РНК C_μ-гена, что приводит к синтезу иммуноглобулинов класса М, в дальнейшем, при функциональном созревании В-клетки, происходит присоединение других константных фрагментов (α , γ , δ , ϵ типа) и образование иных субклассов

иммуноглобулинов (А, G, D, Е – соответственно), при сохранении специфического переменного домена. Разнообразие V(D)J-экзонов определяется не только типом генов но и случайным захватом близлежащих к этим генам областей, что сказывается как на длину транскрибируемой ДНК, так и, следовательно, на конечный полипептид.

Переменный домен тяжелой цепи, образовавшийся после делеции между D-J рекомбинантом и одним из LV-участков, готов к транскрипции. Он содержит 4 фрагмента разной длины. Строение переменного фрагмента (V) переменного домена также не однородно, он содержит 3 каркасные области (framework) и две определяющие комплементарность CDR-гиперпеременные области (Complementarity Determining Regions). Третья гиперпеременная область представлена целиком D-фрагментом (Рисунок 1). FR-области во первых, связывают между собой гиперпеременные фрагменты молекулы, и во вторых обеспечивают взаимодействие как между второй тяжелой цепью и одноименной легкой цепью [5, 7, 10, 11].

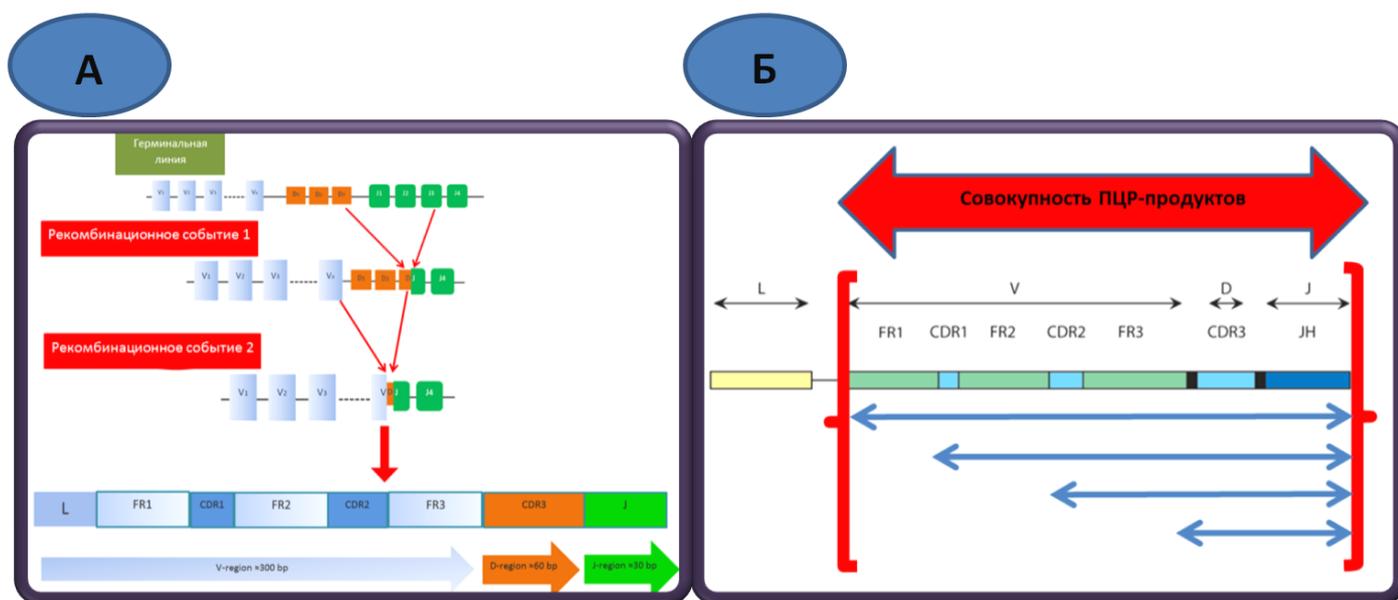
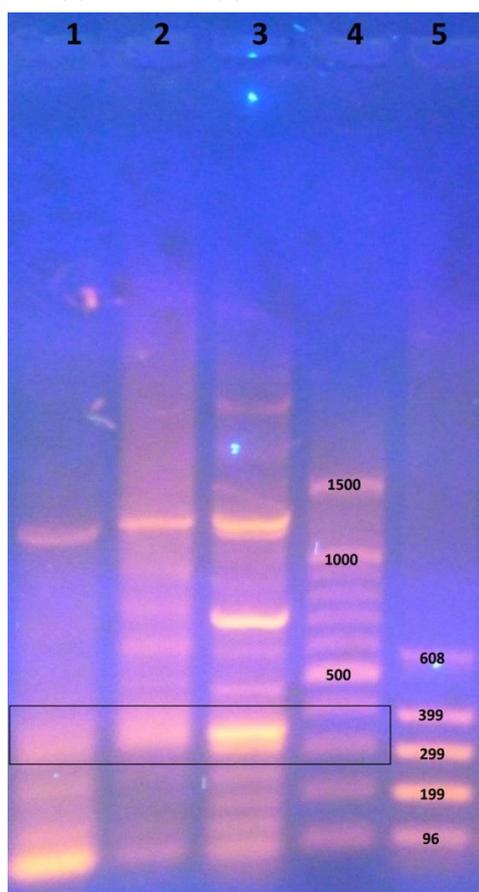


Рисунок 1 – Исследование реорганизации генома В-лимфоцитов:

А – Схематическое изображение двух ключевых событий (Рекомбинационные события 1 и 2) в процессе образования V(D)J-реаранжировок тяжелой цепи иммуноглобулина; Б – фрагменты образуемых ПЦР-продуктов при использовании стандартного диагностического микса праймеров.

Учитывая все перечисленные механизмы разнообразия в формировании как переменного домена тяжелой цепи, так и всего конечного белкового продукта иммуноглобулина в целом, следует говорить о том, что продукт генных реаранжировок уникален по длине и нуклеотидной последовательности для каждой специфической клетки. Таким образом, исследуя ПЦР продукт уникальных V(D)J-рекомбинаций возможно описание

специфических клонов В-клеток и общая характеристика групп этих клонов, топографию отдельных V(D)J-фрагментов. Непосредственно сами праймеры подбираются из комплиментарности к константным фрагментам переменного домена тяжелой цепи. Тогда образуемый ампликон при L-специфичном прямом праймере будет отражать весь V(D)J-фрагмент, а при FR1-специфичном праймере - переменный домен без лидирующего (L) фрагмента. В силу высокого различия V-переменных генов, рационально использовать микст из нескольких праймеров, причём даже на протяжении всего фрагмента, с последующим определением клональности по наиболее интенсивному банду при наложении ампликонов. То есть на конечной фореграмме мы будем наблюдать общий V(D)J-фрагмент (FR1-JH) и два других участка (FR2-JH и FR3-JH). Исходя из того, что длина среднего V гена составляет около 300 нуклеотидных пар, J гена - 46-63, а D-гена - 17-37 нуклеотидных пар, длина конечного продукта реаранжировок будет колебаться от 360 до 400 нуклеотидных пар [14]. Без L-фрагмента длина будет соответственно между 300-390 нуклеотидных пар. FR3-JH фрагмент реаранжировок имеющий наиболее консервативную последовательность даже при наличии доминирующего лейкозного клона имеет довольно высокий диапазон длины - от 90 и до 200 оснований (*Рисунок 2*).



*Рисунок 2 – Отличия форетической картины клональных и поликлональных популяций В-лимфоцитов: **Полоса 1** – Продукт генных реаранжировок поликлональной популяции В-лимфоцитов, **Полоса 2** - Поликлональный контроль – IVS-0000 Polyclonal Control, **Полоса 3** - клональный контроль –*

IVS-0013 ClonalControl, классификации *InvivoscribeTechnologies*). **Полоса 4** – стандартный маркер молекулярного веса с шагом в сто оснований; **Полоса 5** – дополнительный контроль из ПЦР-продуктов *housekeeping*-генов в 96, 199, 299, 399, 608 пар оснований.

Отличие клональной и поликлональной картины наглядно показано на *Рисунке 2*. Так как каждый конечный продукт реаранжировок для каждого отдельного клона В-клеток пусть и на несколько пар оснований, но отличается от любого другого, то на электрофореграмме мы видим не отдельный ампликон, а целую полосу из сходных по длине, но не одинаковых ПЦР-продуктов. При гемобластозе же, в кровяном русле присутствует определённое количество клеток, потомков одного и того же клона и ПЦР-продукты V(D)J-реаранжировок получаются идентичными, что и результируется в выраженную яркую полосу на всём шмере полученных ампликонов [6, 11].

При анализе поликлональных популяций лимфоцитов были выявлены образцы с определёнными чертами клональности. В диапазоне от 300 до 400 пар оснований, где должны быть ампликоны полного продукта реаранжировок ряд образцов имел выраженную полосу, как при наличии моноклонального элемента. Наиболее постоянный, устойчивый характер носили продукты небольшого размера в диапазоне от 80 до 120 пар оснований. Были отмечены образцы, не имевшие интенсивных ампликонов в диапазоне 350-400 пар оснований, а большинство реаранжировочных продуктов отмечалось в интервале 80-250 пар оснований с наиболее интенсивными пиками в районе 100 и 250 нуклеотидных пар (*Рисунок 3*).

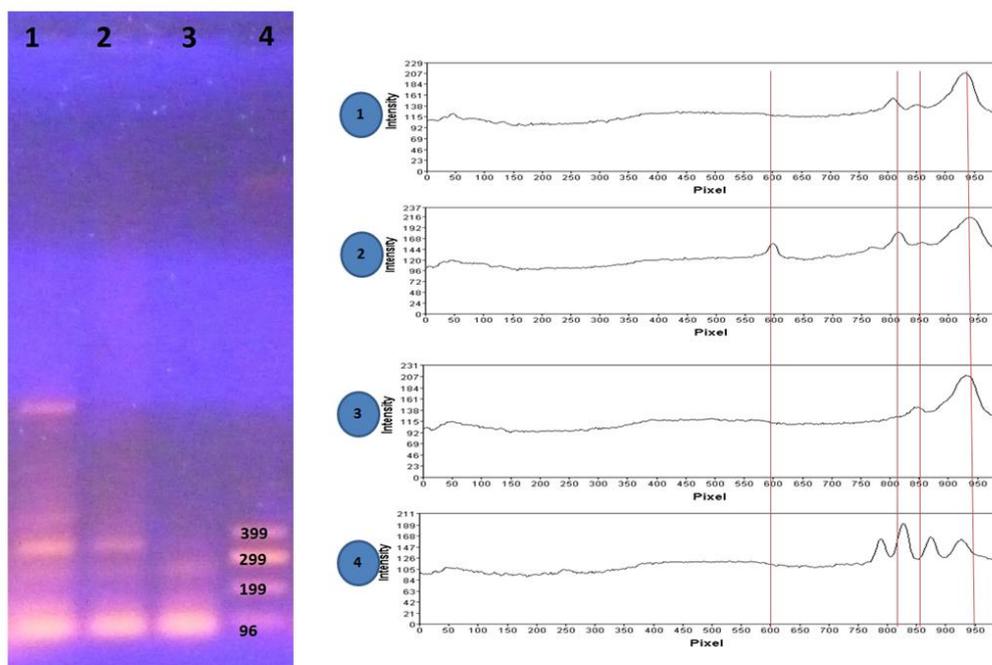


Рисунок 3 – Оценка яркости полос образуемых ПЦР-продуктов поликлональных популяций В-лимфоцитов с помощью программы GelAnalyzer.

Топография образующихся фрагментов может не чётко укладываться в приведённые схемы клоальности. К тому же, как указано у, выраженные маркёры клоальности не исключают определённого фона из весьма широкого диапазона ПЦР-продуктов от 50 до 1500 пар оснований, многие из которых также оформлены в выраженные полосы свечения. Возможные причины и варианты появления подобных вариантов реаранжировок приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Оценка клоального статуса генных реаранжировок по ПЦР-исследованию V(D)J-рекомбинации [9].

Электрофоретическая картина	Наблюдаемый результат	Интерпретация	Статус
Узкий выраженный банд в диапазоне 360-400 нуклеотидных пар	Моноклоальная клеточная популяция	1 реанжировка на локус	Моноаллельная моноклоальность
Два рядом лежащих узких выраженных банд в диапазоне 360-400 нуклеотидных пар	Моноклоальная клеточная популяция	2 реанжировки на локус	Биаллельная моноклоальность
Два узких выраженных банд в диапазоне 360-400 нуклеотидных пар не обязательно лежащих рядом	Биклоальная клеточная популяция	2-4 реанжировки на локус	Биклоальность
Широкий банд в диапазоне 360-400 нуклеотидных пар, либо несколько сливающихся узких бандов	Многочисленные клоны	Более 4-х реанжировок на локус	Олигклоальность
Широкий банд в диапазоне 360-400 нуклеотидных пар	Разнообразный репертуар	Многочисленные реанжировки	Поликлоальность
Широкие либо узкие банды нестандартной длины	Патологический материал	Непродуктивные клоальные реаранжировки	Псевдоклоальность

Данная классификация типов клоальности во всяком случае позволяет четко дифференцировать ситуации с доминированием определённого В-клеточного клона и популяции с широким клоальным разнообразием, то есть отличать лимфопролиферативный процесс от нормы с высокой степенью чувствительности и прогностичности [11]. Это, на данном этапе, понятная утилитарная задача подобных тестов [11]. Существует также вопрос – как воспринимать ситуации с 2-4-мя узкими «клоальными» бандами: как истинную биклоальность, или как биаллельную моноклоальность (две аллельные реаранжировки в пределах одного клона. Наличие длинных ампликонов можно интерпретировать и как особенности

сплайсинга, и как истинные дубликаты, и как артефакты ПЦР-реакции [11]. Если выраженных ПЦР-продукта V(D)J-рекомбинаций только два и они не пропорциональны по длине, то первоначальная рекомбинация могла оказаться не продуктивной и последовала реанжировка генов в гомологичной хромосоме [5]. Последняя рекомендация даётся для интерпретации образовавшихся ПЦР-продуктов при работе с наборами праймеров InVivoScribeTechnologies. Таким образом, можно сделать вывод, что в отличие от моно-би-олиго-клональных лейкозных и лимфомных линий, поликлональные популяции В-лимфоцитов гораздо менее описаны и классифицированы, при том, что эти варианты нормы неоднородны и имеют весьма разнообразную топографию ПЦР-продуктов (*Рисунок 3*). Закономерно в этом смысле, как раз, изучение клонального статуса и топографии ПЦР-продуктов в процессе нормального противoinфекционного специфического иммунного ответа, то есть, описание диапазона изменений в поликлональной популяции.

Выводы.

1. Исследование процессов реорганизации генетических детерминант, определяющих разнообразие антигенраспознающих структур иммуноглобулинов в поликлональных популяциях лимфоцитов актуально для изучения иммунопатогенеза вирусных инфекций и характеристики интенсивности и протективности иммунного ответа.
2. Исследованные результаты реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов у здоровых добровольцев и пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита С имеют черты поликлональности, в то же время были выявлены образцы с признаками присутствия моноклонального элемента.
3. Были отмечены формы топографии V(D)J-реаранжировок, не имевшие интенсивных ампликонов в диапазоне 350-400 пар оснований, соответствующих полному стандартному результату, а большинство реаранжировочных продуктов было смещено в интервал 80-250 пар оснований с наиболее интенсивными пиками в районе 100 и 250 нуклеотидных пар.

Использованная литература:

1. Титов, Л. П. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ нуклеотидных замен в CDR и FR-фрагментах в VH генах иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах/ Л. П. Титов, Т. А. Столярова, Е. А. Столярова, // Вести НАН РБ. Медицинская серия.- 2010.-№3. стр. 10-18.

2. Титов, Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология./ Л. П. Титов, И. А. Карпов // мед журнал.-2007.-№1.-С.4-14.
3. Титов, Л.П. Вирусы и эукариотические клетки: стадии взаимодействия, стратегия геномов, репродукция и исходы инфекции./ Л. П. Титов// Мед. журнал. -2008.-№1.-С.10-16.
4. Титов Л.П. Иммунология: терминологический словарь. Москва. МИА. 2008. 521С.
5. Honjo, T. Molecular Biology of B Cells/ T. Honjo, F. W. Alt, M. S Neuberger // Elsevier Academic Press, London, UK, 2004. P. 629.
6. Cobb, R. M. Accessibility control of V(D)J recombination / R. M. Cobb //Adv Immunol. 2006; P. 45-109
7. Honjo, T., Immunoglobulin heavy chain loci of mouse and human. In Immunoglobulin genes,/ T. Honjo, F. Matsuda, F. W. Alt // London, Academic Press, 1995, pp. 145–171.
8. Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions / N., Hozumi, S. Tonegawa // ProcNatlAcadSci., 1976 Oct; 73 (10): pp. 3628-32
9. Langerak A. W., Jacques J. M. van Dongen. Multiple clonal Ig/TCR products: implications for interpretation of clonality findings /A. W. Langerak, J. M. Jacques, J. M. van Dongen// J. Hematopathol, 2011 pp. 65-70
10. Matsuda, F. The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus / F. Matsuda, et al. // J Exp Med 188, 1998, pp. 2151–2162.
11. Miller, J. E. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay/ . J. E. Miller // Mol. Diag. 1999, 4, pp. 101-117.
12. Nayyar A., Detection of Immunoglobulin Gene Rearrangement in Acute Lymphoblastic Leukemia by Polymerase Chain Reaction/ A. Nayyar., A. Suhaib //International Journal of Pathology; 2011; 9(2): pp. 52-54
13. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity/S. Tonegawa // Nature 302, 1983, P. 575
14. Van der Velden, V. H. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR / V. H. Van der Velden // Leukemia (2002), 16, pp. 928–936

Diagnostic significance of immunoglobulin heavy chains genes rearrangement analysis.

Pavlov K. I.

Abstract.

Immunoglobulin heavy chains genes rearrangements analysis has high value for chronic lymphocytic leukemia and lymphomas diagnostic. So in this article discusses the feasibility of studying the processes of immunoglobulin genes reorganization in polyclonal lymphocyte populations for study the pathogenesis of viral infections. Comparative evaluation of gene rearrangements processes in polyclonal populations of B cells were performed on the example of lymphocyte populations from blood of healthy volunteers, patients with chronic hepatitis C infection and monoclonal controls. Outlined ways to interpret the electrophoretic pattern of clonality and polyclonality.

Key words: immunoglobulin heavy chains genes, polymerase chain reaction, gene rearrangements, chronic lymphocytic leukemia.