

Министерство образования и науки Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»
Физтех-школа биологической и медицинской физики
Кафедра молекулярной и клеточной биологии

Выпускная квалификационная работа бакалавра
**«Определение нуклеотидных последовательностей генов тяжелых
цепей иммуноглобулинов при хроническом лимфолейкозе методом
секвенирования нового поколения»**

Выполнил:

Студент группы 7113

Думпис Сергей Янович

Научный руководитель:

к.б.н. Бидерман Белла Вениаминовна

г. Долгопрудный, 2021 г.

Оглавление

Список используемых сокращений	3
Введение	4
Обзор литературы	6
<i>В-лимфоциты</i>	6
<i>Строение иммуноглобулинов на примере иммуноглобулина G</i>	6
<i>Созревание В-клеток и обеспечение разнообразия иммуноглобулинов</i>	7
<i>Хронический лимфолейкоз</i>	10
<i>Важнейшие прогностические и предиктивные факторы при ХЛЛ</i>	11
<i>Методики определения мутационного статуса генов IGHV и стереотипности BCR</i>	14
Материалы и методы	18
<i>Подготовка образцов крови</i>	18
<i>Выделение геномной ДНК</i>	18
<i>Определение В-клеточной клональности и клонально перестроенного семейства генов IGHV</i>	19
<i>Очистка ПЦР-продукта</i>	20
<i>Секвенирование по Сэнгеру</i>	20
<i>Анализ результатов секвенирования</i>	21
<i>Очистка ПЦР-продукта с помощью магнитных частиц AMPure</i>	22
<i>Секвенирование нового поколения</i>	22
<i>Предварительный анализ результатов NGS</i>	25
<i>Статистический анализ</i>	25
Результаты и обсуждение	26
<i>Выбор оптимальной методики амплификации</i>	26
<i>Выбор метода биоинформатического анализа результатов NGS</i>	27
<i>Исследование генетического материала пациентов с ХЛЛ методом секвенирования нового поколения</i>	29
<i>Заключение</i>	32
Выводы.....	33
Список литературы.....	34
Приложение	39

Список используемых сокращений

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГ/Ig – иммуноглобулин(ы)

IgG – иммуноглобулин G

И т. д. – и так далее

И пр. – и прочее

ЛПЗ – лимфопролиферативное заболевание

ПЦР – полимеразная цепная реакция

САР/SAR – стереотипные антигенные рецепторы

ХЛЛ/CLL – хронический лимфоцитарный лейкоз (лимфолейкоз)/chronic lymphocytic leukemia

BCR – B-cell receptor (рус. В-клеточный рецептор)

CDR – complementarity-determining region (рус. регион, определяющий комплементарность)

ERIC – European Research Initiative on CLL (Европейская Исследовательская Инициатива по ХЛЛ)

FCR – fludarabine-cyclophosphamide-rituximab (флударабин-циклофосфамид-ритуксимаб)

IGHV – immunoglobulin heavy-chain variable region gene (рус. ген тяжелой цепи иммуноглобулина)

M-CLL, U-CLL – mutated/unmutated (рус. мутированный/немутированный)

NGS – new generation sequencing (рус. секвенирование нового поколения)

SHM – somatic hypermutation (рус. соматическая гипермутация)

Введение

Хронический лимфоцитарный лейкоз, также часто называемый хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), является самым распространённым лимфопролиферативным заболеванием (ЛПЗ) у взрослых. По данным Всемирной организации здравоохранения заболеваемость ХЛЛ в мире составляет приблизительно 4,7 случаев на 100 тысяч человек [1]. В Российской Федерации ХЛЛ выявляется реже: в 2017 г. заболеваемость составила 2,95 случая на 100 тысяч человек [2]. Тем не менее, на территории РФ данное онкогематологическое заболевание также является наиболее распространенным ЛПЗ.

Частота заболеваний ХЛЛ растёт с возрастом и составляет более 20 случаев на 100 тысяч человек среди лиц старше 70 лет, медианный возраст составляет примерно 68–69 лет в России и странах Европы.

В сравнении с другими ЛПЗ ХЛЛ характеризуется зачастую индолентным течением и высокой ожидаемой продолжительностью жизни: пятилетняя выживаемость составляет не менее 80%, десятилетняя – не менее 59% [3]. Несмотря на это, заболевание является практически неизлечимым, однако возможно проведение терапии, подавляющей прогрессию и злокачественные симптомы. Заболевание имеет гетерогенный характер: некоторые пациенты не нуждаются в терапии на протяжении всей жизни, в то время как другие нуждаются в ней сразу после постановки диагноза в силу агрессивного течения быстро прогрессирующей болезни.

При постановке диагноза «хронический лимфолейкоз» крайне желательным является исследование мутационного статуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (MS IGHV). Количество мутаций в перестроенном локусе *IGHV* опухолевого клона после V(D)J рекомбинации является важнейшим предиктивным и прогностическим фактором ХЛЛ. Пациентов с отличием нуклеотидной последовательности *IGHV* опухолевого клона от герминальной более чем на 2% относят к группе мутированного ХЛЛ (M-CLL), характеризующегося более благоприятным течением заболевания и более высокой выживаемостью в сравнении с немутированным типом (U-CLL). Таким образом, для определения стратегии лечения больного необходимо знать мутационный статус генов *IGHV*.

В существующей лабораторной практике определение мутационного статуса основано на секвенировании методом Сэнгера, однако данная методика неприменима в некоторых случаях. В 15% случаев ХЛЛ происходит перестройка генов *IGHV* на двух хромосомах [4,5]. Если при этом перестраиваются одновременно гены одного семейства (по данным лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ Гематологии» МЗ РФ – 4% от всех случаев ХЛЛ в РФ), рутинная методика не даст адекватного результата. Также возможны

ситуации, когда высокий поликлональный фон не позволяет провести рутинный лабораторный анализ (как, например, происходит на ранних стадиях заболевания или в начале рецидива). Учитывая распространенность заболевания, число пациентов, которые не могут получить результат исследования мутационного статуса *IGHV* при существующей лабораторной практике, является весьма значительным.

В связи с этим было принято решение изучить возможность и целесообразность применения метода секвенирования нового поколения (NGS) для определения мутационного статуса генов *IGHV*. Данная выпускная квалификационная работа посвящена адаптации рутинной лабораторной методики к технологии NGS, а также анализу полученных результатов. Внедрение этой адаптированной методики в лабораторную практику позволяет разрешить значительное количество сложных случаев и получить достоверные результаты исследования. Кроме того, появилась возможность изучить особенности репертуара генов *IGHV* у пациентов с ХЛЛ с двумя клональными перестройками.

Цель работы: адаптировать методику определения мутационного статуса генов *IGHV* к технологии NGS и оценить возможность и целесообразность её использования в рутинной лабораторной практике в сложных случаях ХЛЛ

Задачи работы:

- 1) Выбрать оптимальную методику амплификации генетического материала пациентов с ХЛЛ для дальнейшего секвенирования методом NGS;
- 2) Получить библиотеки секвенирования и определить нуклеотидную последовательность перестроенного локуса *IGHV* методом NGS в тех случаях ХЛЛ, когда определение секвенирование по Сэнгеру не даёт результата;
- 3) Выбрать биоинформатический метод анализа результатов NGS и обработать полученные данные с его помощью;
- 4) Проанализировать данные о структуре перестроенного локуса *IGHV* у пациентов с ХЛЛ в сложных случаях и сравнить результаты с данными о репертуаре *IGHV* в общей выборке больных ХЛЛ в России.

Научная новизна работы: внедрение методики определения мутационного статуса генов *IGHV* с помощью NGS позволит получать корректные результаты, необходимые для уточнения терапии, большему числу пациентов. Также эта методика даст возможность лучше изучить особенности заболевания в сложных случаях.

Обзор литературы

В-лимфоциты

В-клетки, или В-лимфоциты – это компонент иммунной системы, ответственный за гуморальный иммунитет [6]. Основной функцией В-клеток является синтез молекул антител, которые не секретируются (за это ответственны эффекторные и плазматические клетки, образующиеся из В-клеток в результате дифференцировки), а остаются заякоренными в мембране клетки, формируя В-клеточный рецептор (BCR) [7]. В-клеточный рецептор является основной функциональной единицей распознавания специфического антигена, позволяя В-клетке связываться с ним и запускать комплексный иммунный ответ, включающий в себя активацию В-клеток, рекрутирование других компонентов иммунной системы и запуск системы комплемента. В-клеточные рецепторы образованы молекулами иммуноглобулинов (ИГ), представляющих собой трансмембранные белки 1-го типа [8]. Иммуноглобулины обладают характерной структурой, которая позволяет им выполнять необходимые специфичные функции.

Строение иммуноглобулинов на примере иммуноглобулина G

Иммуноглобулин G является основным классом иммуноглобулинов [9] (рис. 1). Молекулы IgG состоят из 4 полипептидных цепей – двух тяжёлых (H, heavy) и двух легких (L, light) – которые соединены между собой дисульфидными мостиками. Тяжёлые цепи взаимодействуют друг с другом со стороны C-концов, которые заякорены в мембране, и разделяются на N-концах, формирующих внеклеточный домен. На N-концах каждая из

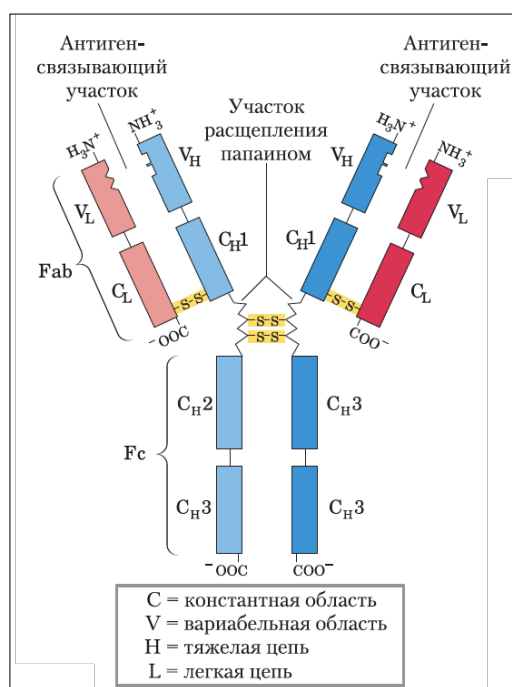


Рис. 1. Структура иммуноглобулина G [9].

тяжелых цепей взаимодействует с одной легкой цепью, формируя характерную Y-образную структуру. Таким образом, молекула IgG имеет два фрагмента: Fc-фрагмент (от англ. *crystallize*) и Fab-фрагмент (от англ. *antigen-binding*) [9].

Каждая полипептидная цепь иммуноглобулина состоит из нескольких доменов, которые подразделяются на переменные и константные. Легкая цепь состоит из одного переменного и одного константного домена, в тяжелую цепь входит три или четыре константных домена (их избыток в сравнении с легкой цепью позволяет сформировать Fc-фрагмент) [10]. Переменные домены тяжелой и легкой цепей, в которых наблюдается максимальное число аминокислотных замен, вместе образуют антиген-связывающий участок. Он формируется шестью так называемыми гипервариабельными петлями β -листов переменных доменов [11] (рис. 2). Три такие петли принадлежат доменам легкой цепи (V_L), а три – тяжелой цепи (V_H). Эти петли называют участками, определяющими комплементарность (англ. *complementarity-determining regions, CDRs*) [12]. Между CDR расположены так называемые каркасные регионы (англ. *framework regions, FRs*), формирующие структурные β -листы Fab-фрагмента. В то же время константные домены определяют принадлежность антитела к тому или иному классу, являются ответственными за возможную олигомеризацию (так, IgM имеют пентамерную структуру) и отвечают в том числе за взаимодействие с другими участниками иммунного ответа, в первую очередь, с системой комплемента [13].

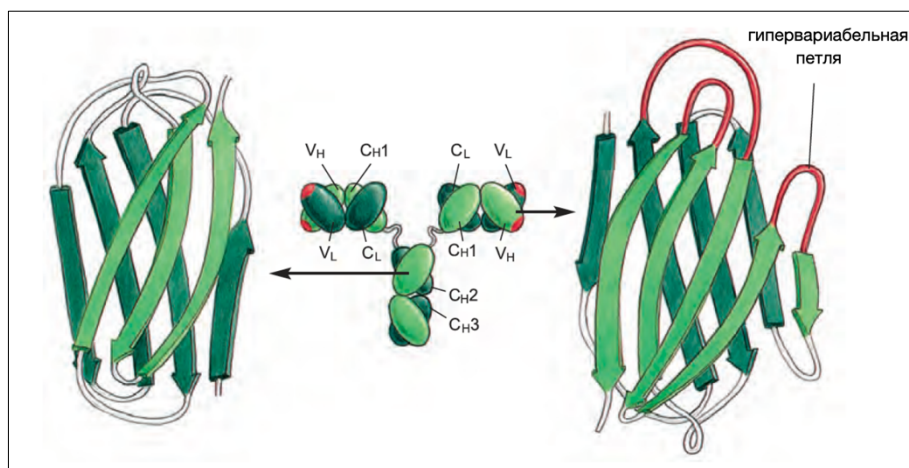


Рис. 2. Пространственная структура молекулы антитела IgG, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа [11].

Созревание В-клеток и обеспечение разнообразия иммуноглобулинов

Созревание В-клеток, или В-лимфоцитопоэз, представляет собой сложный процесс, начинающийся с гематопозитичных стволовых клеток костного мозга. Данные клетки сначала дифференцируют в мультипотентные прогениторные клетки, которые, в свою очередь, дифференцируют в про-В-клетки, с которых начинается уже специфичный

процесс созревания данного типа лимфоцитов, включающий в себя синтез уникального набора поверхностных белков – молекул иммуноглобулинов, кластеров дифференцировки и пр. Ключевой особенностью созревания про-В-клеток является V(D)J-рекомбинация – процесс, который и обуславливает создание огромного репертуара В- и Т-клеточных рецепторов в организме человека [14].

Локус тяжелой цепи иммуноглобулина человека содержит большое разнообразие генных сегментов трех типов: 76 V-сегментов (от англ. *variable*), 27 D-сегментов (от англ. *diversity*), 6 J-сегментов (от англ. *joining*) и упорядоченный кластер кодирующих последовательностей С-области, причем каждый кластер кодирует константные регионы тяжелых цепей определенного класса [11] (рис. 3). Локус легкой цепи устроен схожим образом, однако в нём отсутствуют D-сегменты.

V(D)J-рекомбинация представляет собой процесс перестройки сегментов ДНК, позволяющий создавать любые вариации из трех сегментов в случае тяжелой цепи и из двух в случае легкой [11] (рис. 4). Транскрипция и сплайсинг происходят таким образом, что в конечном полипептиде содержатся те сегменты, которые были включены в рекомбинацию. V(D)J-рекомбинация позволяет получить $76 \cdot 6 \cdot 27 = 12312$ вариантов тяжелых цепей, а также 320 вариантов легких, что в совокупности дает приблизительно 4 миллиона

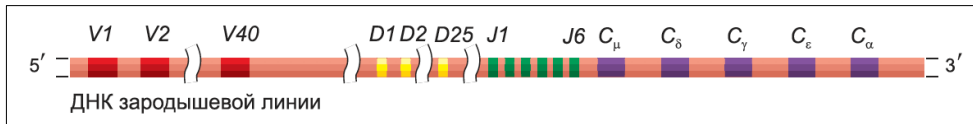


Рис. 3. Локус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов человека [11].

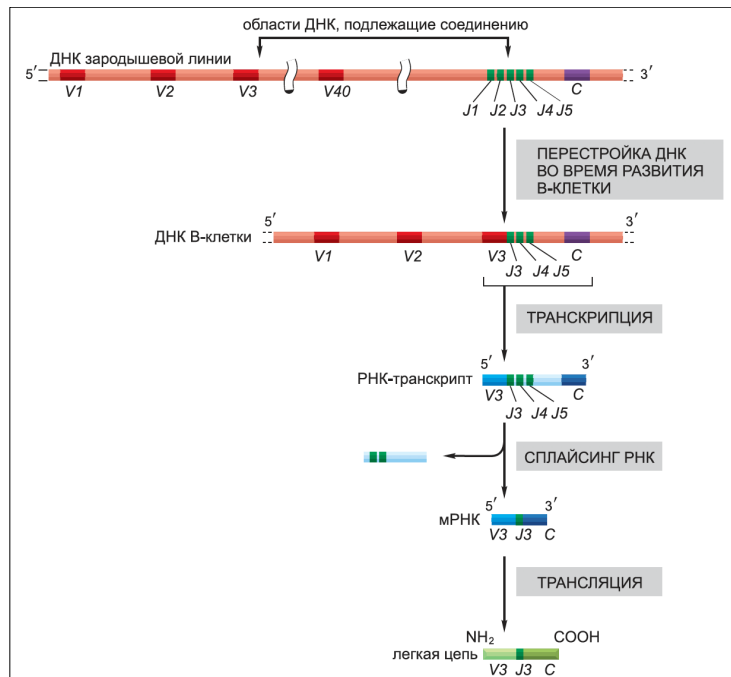


Рис. 4. Процесс соединения V–J как необходимое звено в ходе синтеза гена легкой к-цепи иммуноглобулина человека [11].

вариантов антител. V(D)J-рекомбинация протекает по-разному при созревании каждой отдельно взятой В-клетки, следовательно, она гарантирует моноспецифичность клетки по отношению к антигену [11]. Таким образом, этот процесс является ключевым для обеспечения разнообразия антител в организме человека и возможности иммунного ответа на широкий спектр антигенов.

Не менее важным явлением является соматическая гипермутация (англ. somatic hypermutation, SHM), представляющая собой еще один механизм, увеличивающий спектр антител и повышающий эффективность адаптивного иммунного ответа. Вносимые мутации наследуются только потомками конкретной В-клетки, в которой они происходят. Соматическая гипермутация происходит в уже взрослых В-клетках на этапе их вторичной дифференцировки, т. е. после связывания с антигеном [15]. Презентация В-клеткой антигена и её последующая активация Т-хелпером приводят к усиленной пролиферации, в ходе которых локус иммуноглобулина может претерпевать точечные мутации. При этом их частота составляет приблизительно 10^{-3} мутаций на азотистое основание, что на 5-6 порядков превышает частоту возникновения мутаций в других клетках организма [6]. Наиболее частым видом мутаций является замена нуклеотидов, а не вставки или делеции, причём наиболее часто они происходят в гипервариабельных участках – CDR. В результате SHM образуется целый кластер потомков исходной В-клетки с незначительно отличающимся строением В-клеточного рецептора. Данный процесс является направленным: в ходе вторичной дифференцировки отбираются и усиленно пролиферируют те клетки, мутации в которых привели к повышению аффинности антитела к антигену, а клетки с негативным эффектом от мутации впоследствии уничтожаются [16].

За внесение соматических мутаций отвечает фермент индуцированная активацией цитидиндезаминаза (англ. *activation-induced cytidine deaminase, AID*) [17,18]. Данная реакция приводит к замене пары оснований гуанин-цитозин на пару гуанин-урацил [19] (рис. 5). Это приводит к активации одного из двух процессов репарации ДНК: mismatch-репарации либо эксцизионной репарации оснований. Процессы репарации приводят к изменению последовательности ДНК, причем эффект от внесения мутаций зависит от

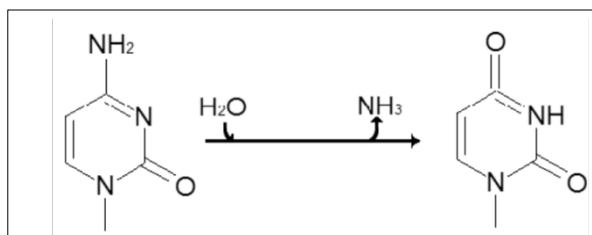


Рис. 5. Реакция дезаминирования цитозина с образованием урацила [19].

нуклеотидной последовательности, задействованного процесса репарации и прочих факторов. В частности, одним из факторов внесения мутаций является некорректная работа ДНК-полимераз, задействованных в репарации.

В редких случаях соматическая гипермутация может затрагивать участки генома, отличные от кодирующих вариабельные участки иммуноглобулинов. В таком случае SHM называют абберрантной (aSHM). В частности, нетаргетная соматическая гипермутация может приводить к мутациями и транслокациям различных онкогенов [20]. Таким образом, aSHM является фактором риска возникновения различных злокачественных заболеваний, в том числе и В-клеточных лимфом [21].

Хронический лимфолейкоз

Самым распространённым ЛПЗ в Европе и Северной Америке является хронический лимфолейкоз (ХЛЛ, или англ. *chronic lymphocytic leukemia* или *CLL*). Наряду с острым миелоидным лейкозом он является одним из самых распространенных онкогематологических заболеваний по данным Американского Онкологического Общества [22]. При ХЛЛ происходит накопление в крови (а также в костном мозге, лимфатических узлах и других лимфоидных органах) зрелых CD19/CD5/CD23-экспрессирующих В-клеток [16]. Необходимым критерием для постановки диагноза ХЛЛ считается повышение концентрации В-лимфоцитов в крови до 5000 клеток/мкл, но в большинстве случаев она составляет 30000 клеток/мкл и выше, что превышает норму в 10 раз и более. Таким образом, выраженный лимфоцитоз в периферической крови является ярким симптомом развития ХЛЛ. При этом опухолевые лимфоциты морфологически неотличимы от нормальных [23].

Основные отличительные особенности и симптомы хронического лимфолейкоза были выделены в 1960-х Галтоном и Дамешекком [23,24]. Так как на момент постановки диагноза большинство пациентов не имеет ярко выраженных специфичных симптомов, то стратегия ведения пациентов сводилась к наблюдению и ожиданию. В случае прогрессии заболевания и серьезных клинических показаний для лечения применялись пероральные алкилирующие агенты и лучевая терапия [25]. За прошедшее время понимание особенностей ХЛЛ и развитие терапевтических решений привели к существенному улучшению прогноза: средняя пятилетняя выживаемость выросла с 67,5% в 1975 году до 87,9% в 2007 году [26]. Одним из основных терапевтических протоколов сейчас является FCR (fludarabine-cyclophosphamide-rituximab), представляющий собой комбинированное лечение иммуносупрессорами, алкилирующим цитостатиком и моноклональными антителами к CD20 [25].

Начало заболевания, чаще всего, диагностируется в пожилом возрасте – медианный возраст пациентов с ХЛЛ составляет около 72 лет. Мужчины заболевают ХЛЛ существенно

чаще, чем женщины (соотношение 1,7:1) [27]. В сравнении с иными ЛПЗ ХЛЛ характеризуется индолентным течением и частым отсутствием заметных симптомов на ранних стадиях (кроме лимфоцитоза). Другой отличительной особенностью данного заболевания является очень гетерогенное течение у разных больных [28].

В подавляющем большинстве случаев популяция опухолевых клеток ХЛЛ является моноклональной. Это означает, что строение В-клеточного рецептора опухолевого клона одинаково во всех опухолевых клетках, и он является опознавательным маркером каждого конкретного случая заболевания. Иногда могут встречаться так называемые субклональные минорные популяции В-клеток с несколько отличающимся строением BCR [29].

Наиболее распространёнными генетическими нарушениями в опухолевых клетках ХЛЛ являются делеция 13q14, делеция 11q22-23, делеция 17p13 и трисомия 12 хромосомы. Хотя бы одна из этих четырёх хромосомных aberrаций встречается у 80% пациентов [30]. Делеция 13q14 встречается более чем у половины пациентов. Также достаточно часто встречаются мутации в генах *TP53* (транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, ген-супрессор), *NOTCH1* (один из notch-рецепторов) и *SF3B1* (фактор сплайсинга).

Важнейшие прогностические и предиктивные факторы при ХЛЛ

Некоторые вышеуказанные генетические факторы имеют большое прогностическое и предиктивное¹ значение. Согласно рекомендациям International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) исследование на наличие упомянутых выше четырёх распространённых хромосомных aberrаций является обязательным при постановке диагноза «хронический лимфолейкоз», так же как и поиск мутаций в гене *TP53*, так как эти нарушения существенно влияют на прогноз и на эффективность лечения [31]. В частности, мутации в гене *TP53* приводят к значительному снижению ожидаемой продолжительности жизни и ассоциируются с агрессивным и быстро протекающим ХЛЛ [32]. Делеции 11q и, в особенности, 17p13 также являются крайне негативными факторами при ХЛЛ: медианная продолжительность жизни составляет 79 и 32 месяца против 111 месяцев при нормальном кариотипе [33]. Более того, опухолевые клоны с такой мутацией часто бывают устойчивы к общепринятым схемам химиотерапии, что существенно осложняет лечение [26]. В то же время, делеция 13q, напротив, характеризуется более благоприятным прогнозом со средней общей выживаемостью в 133 месяца [33].

Одним из наиболее важных генетических факторов прогноза ХЛЛ является мутационный статус генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов (*MS IGHV*). В зависимости от него ХЛЛ делится на два подтипа: мутированный (англ. *mutated CLL*, *M-CLL*) и

¹ Термин «прогностический» относится к характеру протекания заболевания вне зависимости от терапии, термин «предиктивный» используется касательно эффективности терапевтической стратегии.

немутированный (англ. *unmutated CLL, U-CLL*). К мутированному типу относят те случаи ХЛЛ, когда гомология нуклеотидной последовательности перестроенного гена *IGHV* опухолевого клона с герминальным геном составляет менее 98%. В противном случае ХЛЛ считается немутированным.

Случаи U-CLL характеризуются существенно более агрессивным и быстро прогрессирующим течением заболевания, чем M-CLL. Медианная продолжительность жизни составляет по данным разных исследований 75-95 месяцев для пациентов с U-CLL против 215-290 для пациентов с M-CLL [34,35] (рис. 6). При использовании широко распространённого иммунохимиотерапевтического протокола лечения ХЛЛ – FCR (fludarabine-cyclophosphamide-rituximab) – пациенты с M-CLL также демонстрируют существенно лучший ответ на терапию, чем пациенты с U-CLL [36] (рис. 7). Некоторые

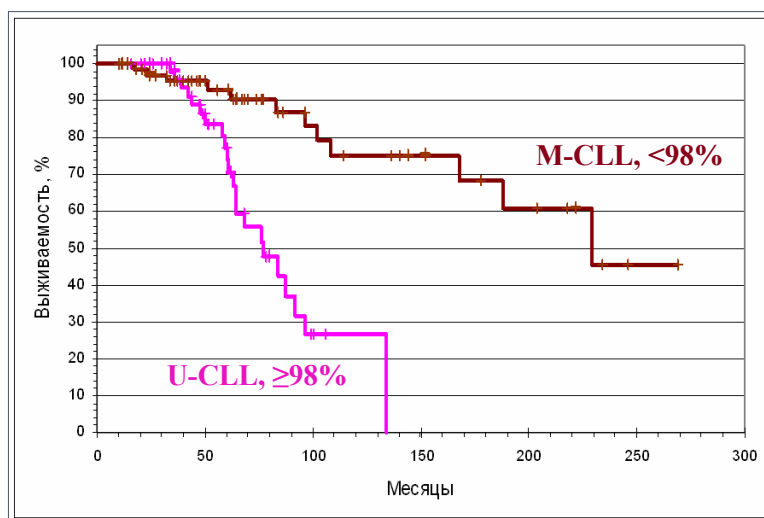


Рис. 6. Кривые выживаемости пациентов с разными типами ХЛЛ у российских пациентов, 2007 г [35].

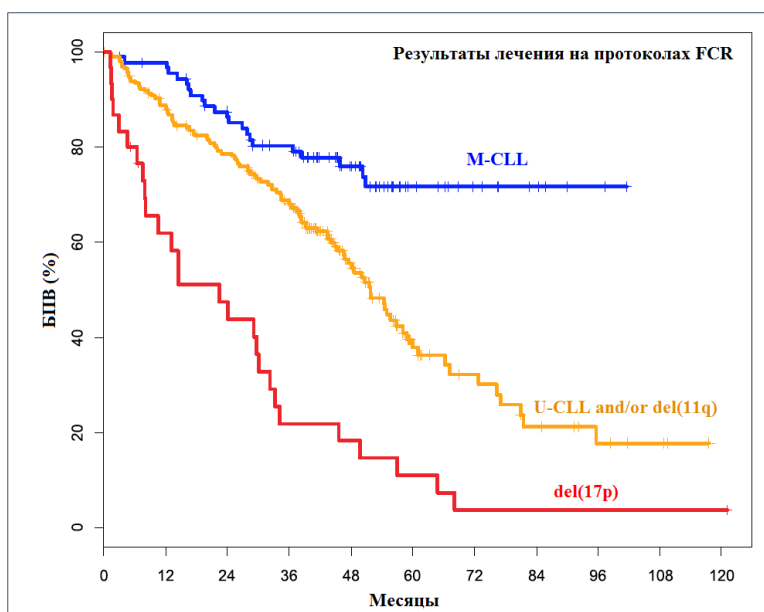


Рис. 7. Ответ пациентов с разными типами ХЛЛ на терапию по протоколу FCR [36].

исследователи считают, что ХЛЛ подразделяется на два отдельных В-клеточных онкопролиферативных заболевания, одно из которых чаще всего развивается из наивной В-клетки (U-CLL), а другое – из клеток памяти, претерпевших соматическую гипермутацию (M-CLL) [34]. Тем не менее, в настоящее время всё чаще отдельно выделяют так называемую граничную, или «серую», зону, лежащую между 97% и 98% гомологии опухолевого и герминального генов *IGHV*, так как в данном случае нельзя с уверенностью говорить о прогнозе и клиническом ответе на терапию [37].

Влияние мутационного статуса *IGHV* на течение ХЛЛ является одним из признаков того, что в развитии В-клеточных онкопролиферативных заболеваний существенную роль играет столкновение иммунной системы человека с определённым набором антигенов [38]. ХЛЛ (и, как впоследствии было показано, некоторые другие ЛПЗ) характеризуется сужением репертуара генов *IGHV*: было продемонстрировано наличие существенных различий в частоте появления различных генов *IGHV* в В-клетках здоровых людей и пациентов с ХЛЛ [39]. Более того, с накоплением данных о структуре перестроенного локуса генов тяжёлых цепей ИГ у пациентов с ХЛЛ стало понятно, что В-клеточный рецептор нередко можно отнести к тому или иному классу квазиидентичных рецепторов, впоследствии названных стереотипными. Каждый из данных классов характеризуется определённым строением CDR3 *IGHV*, которое является высокомолекулярным у В-клеточных рецепторов больных ХЛЛ, не связанных между собой. На данный момент определено более 200 групп стереотипных В-клеточных рецепторов, которые встречаются суммарно не менее чем у 20-30% пациентов [40,41]. Наиболее распространённые 19 таких групп встречаются у 12,5% пациентов и называются основными стереотипными группами [42]. Некоторые стереотипные группы BCR характеризуются тем или иным биологическим бэкграундом, включающим в себя схожие генетические нарушения, профили генетической экспрессии и эпигенетической регуляции, паттерны Toll-like сигналинга и пр. [43]. В результате различные стереотипные В-клеточные рецепторы ассоциированы с различными картинами протекания заболевания. Наиболее распространёнными и важными являются подтипы CLL#1 и CLL#2, которые характеризуются агрессивным течением и частой резистентностью к общепринятым методам терапии, а также CLL#4, характеризующийся сравнительно индолентным течением, особенно у более молодых пациентов [44]. Из спектра стереотипных рецепторов также выделяется CLL#8, обладающий наивысшим риском так называемой трансформации Рихтера, при которой CLL переходит в агрессивную и быстро растущую диффузную В-крупноклеточную лимфому [45]. Таким образом, при постановке диагноза ХЛЛ необходимо проанализировать принадлежность В-клеточного рецептора к одному из стереотипных классов.

Методики определения мутационного статуса генов *IGHV* и стереотипности *BCR*

В настоящее время рутинная лабораторная практика определения мутационного статуса *IGHV* и возможной стереотипности рецептора опухолевого клона основана на методе секвенирования по Сэнгеру. В большинстве случаев эта методика работает корректно, однако иногда ограничения метода Сэнгера не позволяют дать адекватный ответ в данном исследовании.

Процесс V(D)J-рекомбинации в клетке тщательно контролируется [28]. Крайне важным является контроль продуктивности перестройки – отсутствия стоп-кодонов и сдвигов рамки считывания в результате различных процессов [5]. Также к появлению непродуктивной перестройки может привести соматическая гипермутация [46]. Вторая аллельная V(D)J-перестройка обычно проводится лишь в том случае, если первая оказалась непродуктивной, чтобы получить функциональный В-клеточный рецептор. В случае отсутствия продуктивной перестройки В-клетка подвергается апоптозу, так как оказывается не способна выполнять свои функции. Иногда некорректное аллельное исключение приводит к образованию двух продуктивных перестроек внутри одной клетки. По разным оценкам, доля пациентов с двумя перестройками достигает 15%, причем 4-5% из них составляют пациенты с двумя продуктивными перестройками, которые детектируются через использование кДНК [5,47]. Лабораторная практика показывает, что около 3,5–4% пациентов с ХЛЛ имеют две клональные перестройки с использованием одного семейства генов *IGHV* (рис. 8).

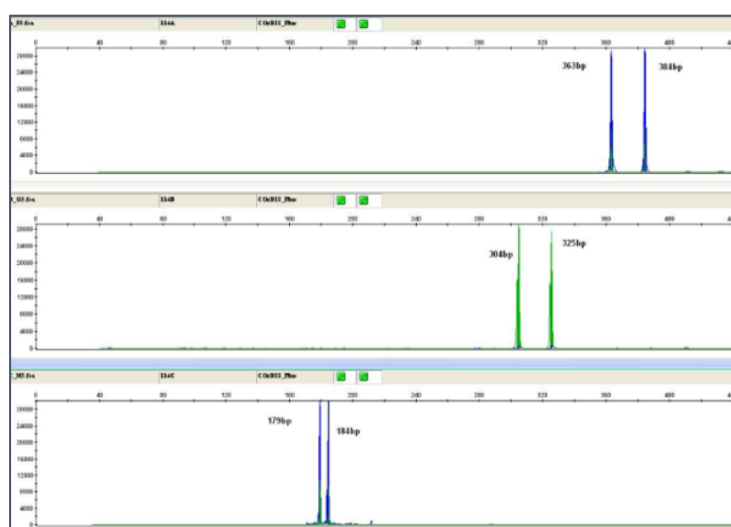


Рис. 8. Фореграмма фрагментного анализа генов *IGHV* при ХЛЛ в случае двух клональных перестроек с использованием генов одного семейства.

Одним из существенных недостатков секвенирования по Сэнгеру является невозможность комбинировать несколько образцов ДНК в одной пробирке – данная методика рассчитана на прочтение одного гомогенного продукта. Секвенирование по Сэнгеру не даёт возможности проанализировать субклональный состав В-клеточной популяции и является чувствительным к повышенному поликлональному фону [48]. Поэтому в описанном выше случае двух клональных перестроек с использованием одного семейства генов *IGHV* секвенирование по Сэнгеру является неинформативным и не позволяет определить нуклеотидную последовательность перестроенного локуса *IGHV* (рис. 10). Кроме того, секвенирование по Сэнгеру чувствительно к количеству генетического материала для анализа, и в случае недостаточно явной клональной экспансии опухолевых клеток (рис. 9) стандартная методика тоже может оказаться неэффективной.

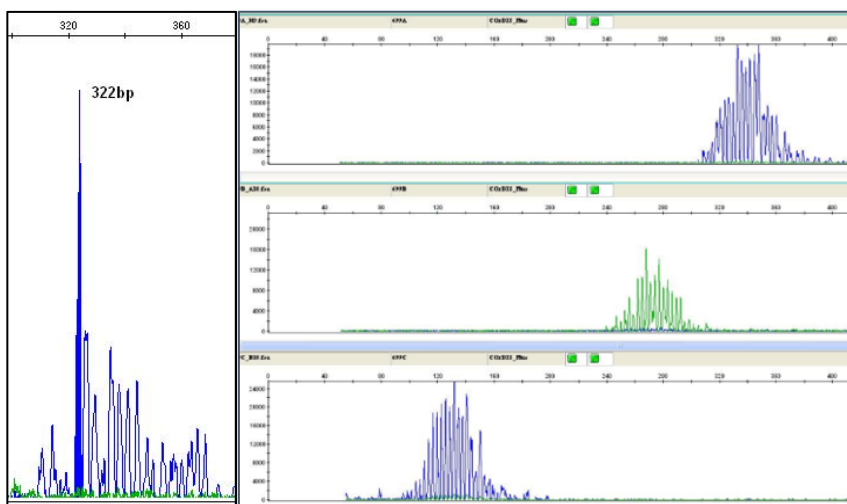


Рис. 9. Фореграммы фрагментного анализа генов *IGHV* при ХЛЛ в случае недостаточно выраженной клональной экспансии либо её отсутствия.

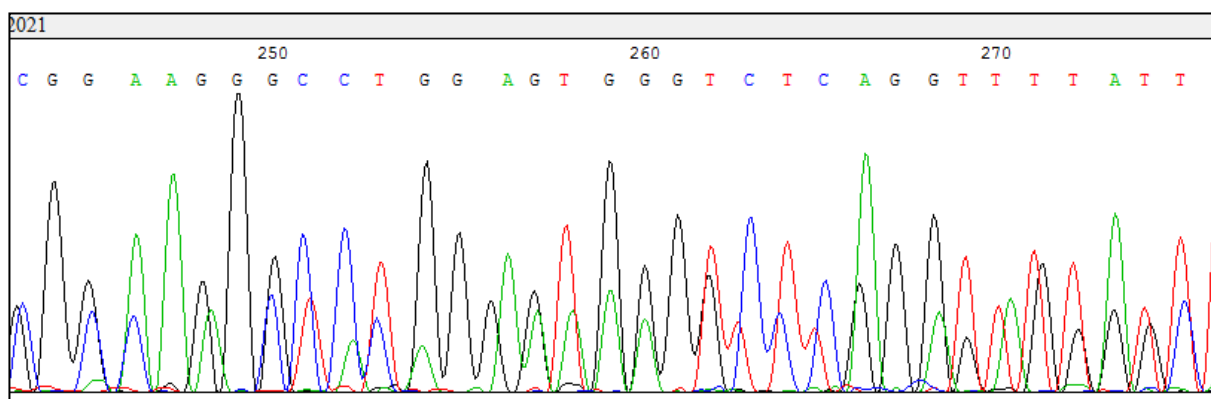


Рис. 10. Результаты секвенирования по Сэнгеру генов *IGHV* при ХЛЛ в случае двух клональных перестроек с использованием генов одного семейства.

Секвенированием нового поколения (англ. *next generation sequencing, NGS*) называют семейство методов, которые отличаются от секвенирования по Сэнгеру существенно более высокой производительностью, из-за чего их также называют высокопоточными. Отличительной особенностью этих методов является одновременное секвенирование

огромного количества небольших фрагментов ДНК, называемых в совокупности библиотекой. Затем эти фрагменты выравниваются с использованием методов биоинформатики для получения нуклеотидной последовательности, точность которой растёт с числом покрытий каждой позиции в геноме индивидуальными прочтениями [49]. В случае последовательности ДНК большого размера или большого количества анализируемых образцов проведение секвенирования нового поколения является более дешевым и быстрым методом, чем секвенирование по Сэнгеру. Однако даже в тех ситуациях, когда образцов немного и секвенирование по Сэнгеру провести проще, методы NGS всё равно обладают преимуществами, связанными с возможностью анализировать несколько образцов разного характера одновременно, а также меньшими требованиями к количеству генетического материала. В случае анализа мутационного статуса генов *IGHV* при ХЛЛ методы NGS дают возможность проанализировать субклональную структуру В-клеточной популяции, что позволяет эффективно работать в описанных выше случаях двух клональных перестроек с использованием одного семейства генов *IGHV* или низкой клональной экспансии при высоком поликлональном фоне [48]. Таким образом, адаптация методики анализа мутационного статуса генов *IGHV* при ХЛЛ к технологии секвенирования нового поколения позволит избегать проблем, которые возникают при использовании секвенирования по Сэнгеру. В данной работе используется метод секвенирования Illumina/Solexa.

Метод секвенирования нового поколения Illumina/Solexa относится к методам секвенирования синтезом [50]. Первым этапом является подготовка библиотеки секвенирования. Для этого ДНК фрагментируется и тагментируется – к концам фрагментов пришиваются частично комплементарные олигонуклеотиды – адаптеры. Далее в ходе специальной ПЦР к адаптерам добавляется индексная последовательность, которая метит молекулы ДНК для их распределения внутри ячейки [51] (рис. 11). На этапе мостиковой амплификации ДНК плавится и в одноцепочечном состоянии закрепляется адаптерами с обоих концов на праймерах, иммобилизованных на подложке внутри канала проточной ячейки. После этого возможно секвенирование синтезом с использованием флуоресцентно меченых олигонуклеотидов. Каждый из четырёх видов нуклеотидов помечается флуорофором, который при освещении лазерным импульсом светится тем или иным светом, что позволяет секвенатору на каждом этапе определять очередной добавленный нуклеотид. Затем флуорофор вымывается специальным реагентом, а к 3'-концу растущей цепи присоединяется новый меченый нуклеотид [52,53].

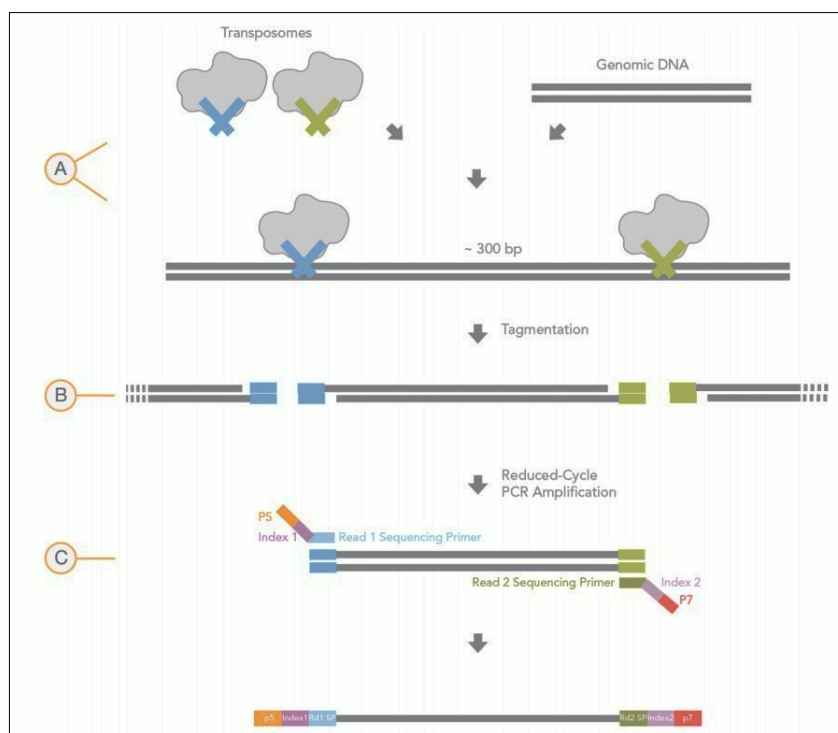


Рис. 11. Сшивка фрагментированной ДНК и адаптеров по протоколу Nextera XT (Illumina, США) [51].

Данный метод называют методом парных прочтений, т. к. в процессе считывается не только прямая, но и обратная цепь, что повышает точность секвенирования. На используемом нами секвенаторе Illumina MiSeq (Illumina, США) средняя длина прочтения, согласно данным производителя, составляет 300 пар оснований. Полученные сырые данные секвенирования как прямых, так и обратных цепей выгружаются в форме архива, после чего производится выравнивание индивидуальных прочтений и анализ нуклеотидной последовательности методами биоинформатики.

Материалы и методы

Подготовка образцов крови [54]

1. Кровь (10мл) забирали в пластиковую одноразовую пробирку с добавлением антикоагулянта (ЭДТА, 4% цитрат натрия).
2. К 1 объему венозной крови с антикоагулянтом добавляли 3 объема раствора 1 (ELS). Перемешивали в течение 5–10 мин.
3. Центрифугировали 5–10 мин при 2000g и удаляли супернатант.
4. Добавляли 5 мл раствора 1 (ELS).
5. Перемешивали встряхиванием и переносили в две пробирки на 1,5 мл.
6. Центрифугировали 5 мин при 2000g и удаляли супернатант.
7. Клеточный осадок использовали для выделения геномной ДНК.

Выделение геномной ДНК [54]

1. Перемешивали клеточный осадок встряхиванием и добавляли 600 или 900 мкл раствора 3 для лизиса. Содержимое тщательно перемешивали многократным пипетированием до состояния гомогенности.
2. Добавляли 200 или 300 мкл раствора 4 для осаждения белков и перемешивали 10 сек на Vortex.
3. Центрифугировали 10 мин при 12000 g и переносили 800 мкл супернатанта в чистую пробирку на 2 мл.
4. Добавляли 800 мкл изопропанола. Перемешивали на Vortex.
5. Центрифугировали 10 мин при 12000 g и удаляли супернатант.
6. Добавляли 1000 мкл 70% этилового спирта.
7. Центрифугировали 5 мин при 12000 g и удаляли супернатант насухо.
8. Осадок подсушивали 10 мин при комнатной температуре при открытых крышках пробирок.
9. Осадок ДНК растворяли в 50–100 мкл деионизированной H₂O.

Таблица 1. Состав растворов для подготовки образцов геномной ДНК.

Раствор 1 (20 ^X Erythrocyte Lysing Solution, ELS) – 20-кратный раствор для лизиса эритроцитов	В 1 литре воды: 166 г NH ₄ Cl, 20 г KHCO ₃ , 0,749 г EDTA, 0,1 Tryban Blue
Раствор 3 (WLCB, white cell lysis buffer) – раствор для лизиса лейкоцитов	100 мМ буфер Tris-Cl (pH 7.6), 40 мМ EDTA (pH 8.0), 50 мМ NaCl, 0.2% SDS
Раствор 4	Насыщенный раствор NH ₄ Cl

Определение В-клеточной клональности и клонально перестроенного семейства генов *IGHV*

Для определения клональной перестройки генов *IGHV* ДНК, полученную из мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ХЛЛ, амплифицировали в 6 отдельных полимеразных цепных реакциях с использованием двух систем праймеров, рекомендованных Европейской Инициативой Изучения ХЛЛ (ERIC). Лидерная система праймеров позволяет амплифицировать весь перестроенный локус *IGHV* [55]. 5'-праймеры данной системы комплементарно отжигаются на лидерном регионе одного из 6 семейств генов *IGHV*, 3'-праймер отжигается на регионе *IGHJ*. Система праймеров BIOMED-2 позволяет амплифицировать меньший участок и используется, если не срабатывает лидерная система. Её 5'-праймеры комплементарны региону V_H-FR1 (framework 1) гена тяжелой цепи [56]. Локализация 3'-праймера для данной системы аналогична лидерной [57] (рис. 12). Последовательности праймеров указаны в таблице 2.

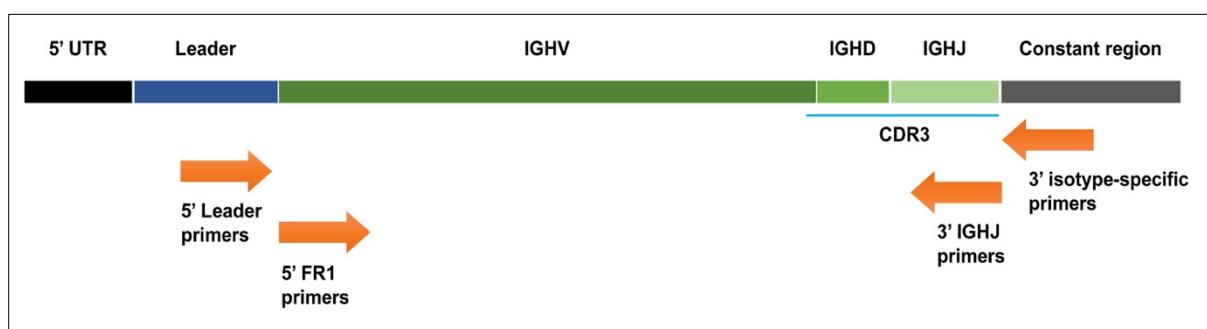


Рис. 12. Системы праймеров, амплифицирующие локус *IGHV* [57].

Таблица 2. Последовательности праймеров для определения мутационного статуса генов *IGHV*.

Источник	Праймер	Последовательность
Праймеры к лидерному региону (<i>Campbell et al., 1992</i>)	VH1/7	5' - CTCACCATGGACTGGACCTGGAG - 3'
	VH2	5' - ATGGACACACTTTGCT(A\C)CAC(G\A)CTC -3'
	VH3	5' - CCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG -3'
	VH4	5' - ACATGAAACA(C\T)CTGTGGTTCTTCC -3'
	VH5	5' - ATGGGGTCAACCGCCATCCT(C\T)G -3'
	VH6	5' - ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTC -3'
	JHcons	5' -CTTACCTGAGGAGACGGTGAC-3'
BIOMED-2 (<i>van Dongen et al., 2003</i>)	VH1-FR1	5' - GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG - 3'
	VH2-FR1	5' - GTCTGGTCCTACGCTGGTCAAACCC - 3'
	VH3-FR1	5' - CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG - 3'
	VH4-FR1	5' - CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG - 3'
	VH5-FR1	5' - CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT- 3'
	VH6-FR1	5' - TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG - 3'
	JHcons	5' - CTTACCTGAGGAGACGGTGACC - 3'

ПЦР проводили в объёме 25 мкл. В реакционную смесь добавляли 3 мкл ДНК (оптимально с концентрацией 100-300нг/мкл), 5 пмоль каждого праймера и 2-кратную

смесь для ПЦР, содержащую Taq-полимеразу (Promega, США), согласно инструкции производителя. Параметры ПЦР указаны в таблице 3.

Таблица 3. Параметры ПЦР для определения клональной перестройки.

Стадия	Число циклов	Температура	Время
Предварительная денатурация	1	95 °С	7 мин
Денатурация	35	95 °С	20 с
Отжиг		60 °С	25 с
Элонгация		72 °С	25 с
Финальная элонгация	1	72 °С	10 мин
Хранение	1	4 °С	∞

Полученный ПЦР-продукт анализировали методом гель-электрофореза для определения использованного в перестройке семейства (семейств) генов *IGHV*. Выбранный после гель-электрофореза ПЦР-продукт использовали для дальнейшей работы.

При выборе оптимальной методики для амплификации полученный ПЦР-продукт контролировали методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт аналитического машиностроения РАН, Россия). Для этого использовали обратный праймер JHcons с флуоресцентной меткой FAM на 5'-конце. ПЦР-продукт разводили в 20–50 раз, 2мкл разведенного продукта смешивали с 10 мкл деионизованного формамида (Thermo Fisher Scientific, США) и 0,5 мкл размерного стандарта СД-450 (Синтол, Россия). Полученные пробы денатурировали в амплификаторе. Использовали стандартные модули для фрагментного анализа для капилляров длиной 35см, время инъекции 10 сек. Фореграммы анализировали с помощью программного обеспечения «Фрагментный анализ» (Синтол, Россия).

Очистка ПЦР-продукта

Применяли ферментативную очистку набором ExoProStar™ (*Illustra™, Cytivia, USA*). Смешивали 6 мкл ПЦР-продукта с 2 мкл реагента и инкубировали 15 мин при 37 °С, затем 15 мин при 82 °С.

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование ПЦР-продуктов производили с использованием набора Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно инструкции производителя.

Таблица 4. Протокол реакции секвенирования.

Стадия	Число циклов	Температура	Время
Предварительная денатурация	1	95 °C	7 мин
Денатурация	25	95 °C	10 с
Отжиг		50 °C	5 с
Элонгация		60 °C	4 мин
Хранение	1	4 °C	∞

Состав реакционной смеси:

- BidDye 1.1 – 1 мкл
- Буфер для секвенирования – 1,5 мкл
- Прямой праймер соответствующего семейства генов *IGHV* или обратный праймер JHcons (концентрация 5пкмоль/мкл) – 1 мкл
- Очищенный ПЦР-продукт – 2 мкл
- H₂O Milli-Q – 4,5 мкл

Протокол реакции секвенирования указан в таблице 4.

Очистку производили с помощью набора BidDye xTerminator (Thermo Fisher Scientific, США). В исходный набор входит два флакона: раствор XTerminator™ удаляет не инкорпорированные терминаторы красителя и избыток свободных солей из пост-реакционной смеси, SAM™ повышает эффективность работы XTerminator™ и стабилизирует очищенную смесь. Данные два раствора смешивали целиком и хранили при температуре 4 °C. Для очистки на 10 мкл продукта реакции секвенирования вносили 55 мкл полученной смеси. После этого плашку либо пробирки помещали в шейкер и перемешивали на протяжении 20–30 минут. Затем их центрифугировали в плашечной центрифуге (Eppendorf, Германия) на протяжении 5 мин на скорости 3000об/мин до полного осаждения частиц XTerminator™.

Капиллярный электрофорез производили на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт Аналитического Приборостроения РАН, Россия) с использованием модулей для секвенирования на капиллярах 35 см с режимом неполного погружения капилляров, время инъекции 1 или 3 сек.

Анализ результатов секвенирования

Полученные хроматограммы предварительно автоматически обрабатывали в программе SeqAnalysis (Thermo Fisher Scientific, США). Затем мутационный статус генов *IGHV* анализировали в базах данных IgBLAST [58] или IMGT-V\QUEST [59] (предпочтительнее), а также исследовали на стереотипность рецептора в базе данных ARResT [60] – согласно

рекомендациям ERIC [4]. Данное программное обеспечение даёт возможность проанализировать нуклеотидную последовательность в формате FASTA и получить данные по использованным при рекомбинации генетическим сегментам, гомологии с герминальными генами и возможными стереотипными рецепторами.

Очистка ПЦР-продукта с помощью магнитных частиц AMPure

Процедура

1. Центрифугировали стрипы с продуктом амплификации ПЦР и переносили 50 мкл супернатанта в новые пробирки 1,5 мл
2. Для очистки использовали 1,8 объема магнитных частиц AMPure XP beads (Illumina, США) на 1 объем ампликонов (90 мкл)
3. Перемешивали переворачиванием пробирки и инкубировали 5 мин при комнатной температуре.
4. Помещали пробирки в магнитный штатив примерно на 2 минуты, пока раствор не становился полностью прозрачным
5. Удаляли супернатант с помощью дозатора и 2 раза промывали 200 мл 80% этанола, снимая со штатива. При повторном удалении этанола особенно внимательно удаляли капли на дне пробирки.
6. Подсушивали магнитные частицы 15 минут при комнатной температуре (не снимая со штатива, пробирки были открыты)
7. Снимали пробирки со штатива.
8. Добавляли 52,5 мкл RSB (ресуспензирующий буфер, Illumina, США) к частицам и встряхивали.
9. Инкубировали 2 минуты при комнатной температуре.
10. Помещали в магнитный штатив, инкубировали 2 минуты, пока раствор не становился полностью прозрачным.
11. Переносили 50 мкл супернатанта в чистые пробирки.

Закрытые пробирки могли хранить в морозилке (-15–25 °C) до 7 дней (точка безопасной остановки).

Секвенирование нового поколения

1) Тагментирование ДНК

С тагментирования ДНК начинается подготовка библиотеки для секвенирования нового поколения. На данном этапе амплифицированная ДНК фрагментируется и метится.

Процедура тагментирования

1. Добавляли в пробирки в стрипах (строго в соответствующем порядке):
 - TD (буфер для тагментирования ДНК, Illumina, США) – 10 мкл

- 1нг очищенного ПЦР-продукта – обычно 5 мкл
2. Пипетировали смесь.
 3. Добавляли 5 мкл АТМ (микс для тагментирования ампликонов, Illumina, США) в каждую пробирку.
 4. Пипетировали 10 раз смесь.
 5. Центрифугировали при 280g на протяжении 1 мин при комнатной температуре
 6. Помещали стрипы в амплификатор и инкубировали 5 минут при 55°C, после чего охлаждали до 10 °С и немедленно переходили к пункту 7.
 7. Добавляли 5 мкл NT (нейтрализирующий буфер для тагментирования, Illumina, США) в каждую пробирку и перемешивали.
 8. Пипетировали 10 раз.
 9. Центрифугировали при 280g на протяжении 1 мин при комнатной температуре
 10. Инкубировали при комнатной температуре 5 минут.

2) Амплификация библиотеки секвенирования

На данном этапе пробоподготовки для NGS добавляются индексы и амплифицируется тагментированная ДНК для проведения секвенирования.

Таблица 5. Программа NXT PCR для амплификатора.

Стадия	Число циклов	Температура	Время
Предварительная активация	1	72 °С	3 мин
Предварительная денатурация	1	95 °С	30 с
Денатурация	12	95 °С	10 с
Отжиг		55 °С	30 с
Элонгация		72 °С	30 с
Финальная элонгация	1	72 °С	5 мин
Хранение	1	10 °С	∞

Нагрев крышки амплификатора до 100 °С. Объем реакции 50 мкл.

Процедура

1. Добавляли к образцам по 5 мкл индексов i5 и i7 в каждую пробирку.
2. Добавляли 15 мкл NPM (Nextera микс для ПЦР, Illumina, США) в каждую пробирку.
3. Пипетировали 10 раз.
4. Центрифугировали при 280g на протяжении 1 мин при комнатной температуре.
5. Помещали стрипы в амплификатор и запускали программу NXT PCR (таблица 5).

Полученный продукт мог храниться в холодильнике (2–8 °C) до 2 дней, либо сутки храниться в амплификаторе (точка безопасной остановки).

3) Очистка библиотеки секвенирования

Проводится на магнитных частицах AMPure XP beads (Illumina, США) аналогично описанному выше протоколу очистки ПЦР-продукта.

Концентрацию библиотеки определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Все библиотеки разводили до 4 нМ и смешивали в равном количестве.

4) Подготовка библиотеки секвенирования к запуску

Денатурация 4 нМ библиотеки

1. В пробирке 1,5 мл смешивали 5 мкл 4 нМ библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 N раствора NaOH.
2. Кратко встряхивали и центрифугировали при 280g на протяжении 1 мин.
3. Инкубировали при комнатной температуре на протяжении 5 мин.
4. Добавляли 990 мкл гибридизационного буфера HT1 в пробирку с денатурированной библиотекой.

Результатом являлся 1 мл раствора с денатурированной библиотекой концентрацией 20 пМ.

Разведение денатурированной 20 пМ библиотеки

1. Разводили 20 пМ библиотеку до требуемой концентрации при помощи буфера HT1 в объеме 600 мкл (оптимальная концентрация 10 пМ: 300 мкл библиотеки и 300 мкл буфера).
2. Перемешивали переворачиванием пробирки и кратко центрифугировали.
3. Добавляли 30 мкл денатурированного 20 нМ PhiX контроля.

5) Подготовка запуска секвенирования на системе Illumina MiSeq

Образец загружали в ячейку с маркировкой *Load Sample* в картридж с реактивами MiSeq Reagent Kit v2 Micro (Illumina, США), предварительно размороженный и подготовленный согласно инструкции производителя. Проточную ячейку тщательно промывали водой и спиртом от избытка буферных солей и высушивали безворсовой салфеткой согласно инструкции производителя, после чего загружали в секвенатор в соответствующий отсек. Также в соответствующие отсеки секвенатора загружали буфер для секвенирования PR2, пустую емкость для сброса и подготовленный картридж с загруженной библиотекой

После того, как все реагенты были загружены в секвенатор, создавали протокол, содержащий информацию об образцах, и начинали запуск.

Предварительный анализ результатов NGS

Полученные архивированные результаты секвенирования (формат .fastq.gz) анализировали при помощи программного обеспечения MixCR (MiLaboratory, Россия, [61]), которое было создано для анализа результатов секвенирования нового поколения при изучении адаптивного иммунитета. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали согласно стандартному лабораторному протоколу при секвенировании по Сэнгеру. Для предварительного обрезания адаптеров перед анализом собственно нуклеотидной последовательности VCR использовали утилиту Cutadapt (National Bioinformatics Institute Sweden, [62]).

Созданный на основе данных утилит shell-скрипт (см. «Результаты») обрезает адаптеры секвенирования со всех единичных прочтений, где это необходимо, после чего осуществляет выравнивание прочтений на перестроенный локус *IGHV*, анализирует наличие клональных экспансий и выдаёт результат в виде таблицы в формате .txt, содержащей всю информацию по имеющимся клонам, строению их VCR и субклональной архитектуре.

Статистический анализ

Описательная статистика для дискретных переменных включает абсолютное и относительное (в процентах) распределения. Значимость двумерных взаимосвязей между переменными оценивали с помощью критерия χ^2 с последующим определением уровня значимости. Для всех сравнений был установлен уровень значимости $p=0,05$, статистически значимые различия обозначены *.

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальной методики амплификации

Первым шагом при адаптации системы анализа мутационного статуса к технологии секвенирования нового поколения был выбор оптимальной системы наработки генетического материала. В отличие от рутинной методики, основанной на секвенировании по Сэнгеру, в случае использования NGS нет необходимости ставить отдельные ПЦР специфично по семействам генов *IGHV*. Следовательно, вместо постановки шести различных реакций процесс может быть упрощен за счет использования мультиплексной ПЦР. Таким образом, при использовании метода NGS не обязательно знать, какое конкретно семейство генов *IGHV* было использовано при V(D)J-рекомбинации в ходе постановки, для запуска секвенирования. Эта информация, тем не менее, будет получена позднее в ходе биоинформатического анализа.

Для определения наилучшего метода амплификации генетического материала пациентов мы проверили работу двух мультиплексных систем, основанных на системах праймеров Leader и BIOMED-2 (см. «Материалы и методы») на материале пациентов с двумя клональными перестройками внутри одного семейства генов *IGHV*, на поликлональных образцах ДНК и образцах со слабо выраженной клональной экспансией. Эффективность мультиплексной системы в каждом случае сравнивалась с результатом классической амплификации через ПЦР, специфичные к семействам генов *IGHV*. В качестве отрицательного контроля использовалась вода, в качестве положительного контроля –



Рис. 13. Фореграмма фрагментного анализа: две клональных перестройки, *IGHV3*, ПЦР на праймерах Leader.

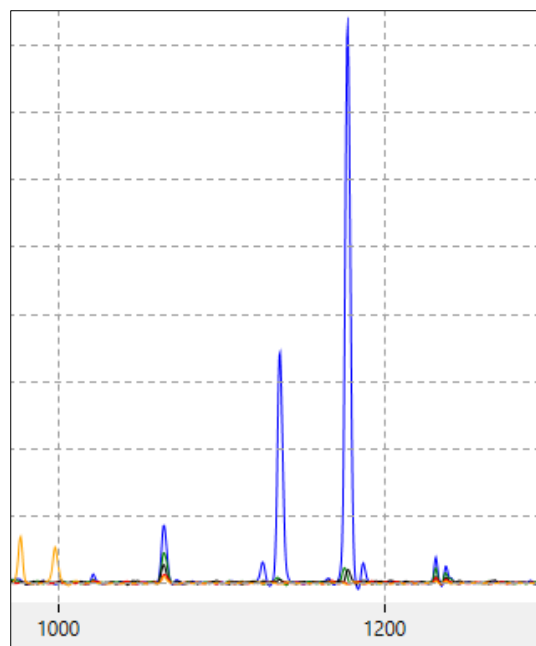


Рис. 14. Фореграмма фрагментного анализа: две клональных перестройки, мультиплексная ПЦР на праймерах Leader.

смесь генетического материала трёх пациентов, в которой присутствовали перестройки с использованием всех семейств генов *IGHV*.

Описанные выше образцы амплифицировали с использованием классической и мультиплексной ПЦР, после чего проводили фрагментный анализ. Было определено, что в случае достаточной клональной экспансии при двух перестройках внутри одного семейства генов *IGHV* лидерные праймеры амплифицируют перестроенный локус на уровне, соответствующем рутинной лабораторной методике, так же как и праймеры BIOMED-2 (рис. 13, рис. 14).

В случае поликлональных образцов амплификация проходила должным образом лишь при использовании мультиплексной системы праймеров BIOMED-2, в то время как праймеры Leader не давали должного результата (рис. 15, рис. 16).

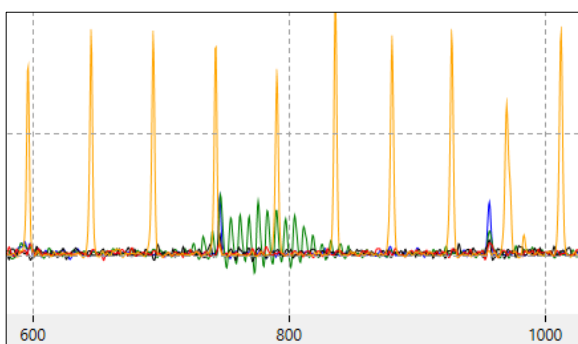


Рис. 15. Фореграма фрагментного анализа: поликлональный образец, мультиплексная ПЦР, праймеры BIOMED-2.

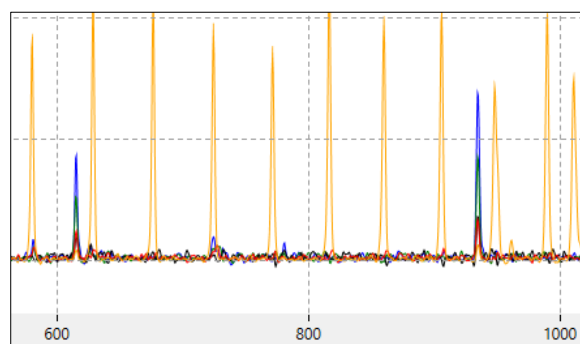


Рис. 16. Фореграма фрагментного анализа: поликлональный образец, мультиплексная ПЦР, праймеры Leader.

На основании полученных результатов было принято решение всегда использовать обе системы амплификации и проверять успешность ПЦР на геле-электрофорезе. В случае, когда амплификация проходит с использованием обеих мультиплексных систем праймеров, для приготовления библиотеки секвенирования следует использовать оба ПЦР-продукта в соотношении 1:1. В случае же, когда амплификация проходит успешно только с праймерами BIOMED-2, используется только этот ПЦР-продукт, причём в количестве, вдвое большем по сравнению с предыдущим случаем.

Дальнейшая работа показала, что данная стратегия является правильной. Не было обнаружено ни одного случая, когда ПЦР с праймерами Leader проходила успешно, а с праймерами BIOMED-2 нет. В случае, когда обе мультиплексные системы не способны амплифицировать генетический материал пациента, определение мутационного статуса не представляется возможным.

Выбор метода биоинформатического анализа результатов NGS

Для анализа результатов секвенирования нового поколения было выбрано программное обеспечение MiXCR, разработанное группой исследователей из Института

биоорганической химии РАН и РНИМУ им. Пирогова [61]. Данное программное обеспечение представляет собой набор команд UNIX-консоли, которые исходно работают с форматом .fastq (либо с архивированным .fastq.gz) и позволяют производить выравнивание прочтений NGS на locus перестроенного В-клеточного рецептора с последующим анализом субклональной архитектуры генетического материала, выделения клональной экспансии, а также определения использованных в V(D)J-рекомбинации генетических сегментов, структуры CDR3 и пр. Утилиты MiXCR предполагают включение индексов секвенирования (англ. *unique molecular identifier*, *UMI*) в праймеры системы амплификации (будь то мультиплексная ПЦР или 5'-быстрая амплификация концов). Так как мы использовали систему Nextera XT, которая предполагает отдельный шаг сшивки адаптеров при пробоподготовке, то перед использованием MiXCR необходимо избавиться от присутствующих в отдельных прочтениях адаптеров. Это позволяет сделать UNIX-утилита Cutadapt от Шведского национального института биоинформатики [62].

Для ускорения анализа результатов NGS был написан Shell-скрипт, содержащий все необходимые команды для командной строки (рис. 18). Использование данного скрипта предполагает определённую структуру названия файлов с данными секвенирования: при запуске скрипта вводится только код пациента в лабораторной базе данных, а также номер данного образца. Таким образом, скрипт автоматизирует всю обработку от сырых данных до итоговой таблицы, содержащей различную информацию по обнаруженным клонам (рис. 17). Данные по используемым генетическим сегментам V, D и J перепроверяли при использовании базы IMGT вместе с определением мутационного статуса по полученной нуклеотидной последовательности BCR опухолевого клон(ов).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	clonId	cloneCount	cloneFractio	targetSequel	targetQualiti	allVHitsWith	allDHitsWith	allJHitsWith	allCHitsV
2		0 2016.0	0.522550544	TTTAAGAGG	[[[[[[[[[[[[[[[[[[IGHV3-33*0	IGHD3-9*00	IGHJ6*00(421)	
3		1 1671.0	0.433125972	GGTGATTCA	[[[[Y[[[[[[[[[[[[IGHV3-53*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(408)	
4		2 121.0	0.031363400	GTGTGAGG	[[[[[[[[[[[[[[[[[[IGHV3-53*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(406,8)	
5		3 23.0	0.005961638	CCTGTGCAG	[[[[[[[[[[Y[[[[[[IGHV3-53*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(391,5)	
6		4 19.0	0.004924831	CCAGGCAAG	[[[[[[[[[[[[[[[[[[IGHV3-33*0	IGHD3-9*00	IGHJ6*00(397,8)	
7		5 2.0	5.184033177	TGTGCGAGA	[[[[[[[[[[[[[[[[[[IGHV1-46*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(386)	
8		6 2.0	5.184033177	TGTGCGAGA	[[[[[[[[[[[[[[[[[[IGHV3-53*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(531)	
9		7 1.0	2.592016588	TGTGCGAGA	GGGGGGGG	IGHV1-46*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(351)	
10		8 1.0	2.592016588	TGTGCGAGA	GGGGGGGG	IGHV1-46*0	IGHD2-2*00	IGHJ6*00(231)	
11		9 1.0	2.592016588	TGTGCGAGA	FFFFFFFFF	IGHV3-53*0	IGHD1-1*00	IGHJ6*00(271)	
12		10 1.0	2.592016588	TGTGCGAGA	GGGGGGGG	IGHV1-2*00	IGHD3-9*00	IGHJ6*00(480)	

Рис. 17. Результат работы скрипта для анализа результатов NGS (часть таблицы для одного из пациентов).

```
#!/bin/bash
seq=$1
num=$2
name1=$seq"_ "$num"_ R1"
name2=$seq"_ "$num"_ R2"
cutadapt -a TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG -A
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG -m 80 -o $name1.fastq -p $name2.fastq
$name1.fastq.gz $name2.fastq.gz
reportname=$seq"_ report_"$num
name3=$seq"_ "$num
mixcr align --species hs -p kAligner2 --report $reportname.txt $name1.fastq $name2.fastq $name3.vdjca
mixcr assemble --write-alignments --report $reportname.txt $name3.vdjca $name3.clna
namefull=$seq"_ full_"$num
mixcr assembleContigs --report $reportname.txt $name3.clna $namefull.clns
mixcr exportClones -c IG -p fullImputed $namefull.clns $namefull.txt
```

Рис. 18. Shell-скрипт для анализа сырых данных NGS В-клеточных рецепторов.

Исследование генетического материала пациентов с ХЛЛ методом секвенирования нового поколения

В исследование был включен материал 95 пациентов с ХЛЛ, для которых секвенирование по Сэнгеру оказалось нерезультативным. Их генетический материал амплифицировали, после чего определяли нуклеотидную последовательность перестроенного локуса *IGHV* методом секвенирования нового поколения, как описано в «Материалах и методах». Данные, полученные в ходе NGS, подвергали анализу с использованием описанного в предыдущем разделе Shell-скрипта, а затем анализировали в базах данных IMGT/V-QUEST и ARResT/Assign [4,63,64]. При обработке результатов NGS отбирали те клоны, присутствие которых в образце было выше 5%, чтобы исключить из анализа поликлональный фон и возможные химерные продукты.

Результаты пациентов с двумя клональными перестройками *IGHV*

Среди данных 95 случаев ХЛЛ в 64 случаях было определено наличие двух клональных перестроек. Среди данных 95 случаев ХЛЛ в 64 случаях было определено наличие двух клональных перестроек. Лишь в одном из этих 64 случаев обе перестройки были продуктивными. В данном случае в обеих перестройках гомология с герминальным геном составила менее 98%, поэтому он был классифицирован как М-CLL. Остальные 63 случая демонстрировали ожидаемую картину с одной продуктивной и одной непродуктивной перестройкой. Так, нами был выявлен вариант U-CLL для 45 пациентов и М-CLL для 19 пациентов из этих 63. Также нами было найдено несколько важных случаев ХЛЛ со стереотипными В-клеточными рецепторами: 4 случая CLL#2 и 3 случая CLL#1 – наличие этих стереотипных рецепторов является дополнительным крайне неблагоприятным прогностическим фактором при ХЛЛ. В 60 случаях из 64 обе перестройки происходили с использованием одного семейства генов *IGHV*: *IGHV3* для 44 пациентов, *IGHV1* для 11

пациентов и IGHV4 для 5 пациентов. Ещё в двух случаях использовались первое и седьмое семейства (*IGHV1-69 + IGHV7-4* и *IGHV1-2 + IGHV7-4*), которые обычно амплифицируются с одним и тем же прямым праймером. У оставшихся двух пациентов наблюдались комбинации *IGHV3-15 + IGHV4-59* и *IGHV1-69 + IGHV3-73*.

В таблице 6 приведены ключевые статистические показатели выборки пациентов с двумя клональными перестройками генов *IGHV* одного семейства и общей лабораторной выборки пациентов с ХЛЛ. Распределение между М-CLL и U-CLL в этих двух группах практически совпадает. Распределение между семействами генов *IGHV* имеет ярко выраженный сдвиг от IGHV1 и IGHV4 в сторону IGHV3, однако размер выборки пока недостаточно велик, чтобы говорить о статистической значимости данных отличий. Также следует отметить, что среди пациентов с двумя клональными перестройками генов одного семейства в четыре раза чаще обнаруживается стереотипный рецептор CLL#2 ($p < 0.01^*$).

Таблица 6. Ключевые различия пациентов с ХЛЛ с двумя клональными перестройками генов одного семейства генов *IGHV* и пациентов в России в целом. * – статистически значимые различия.

	Исследованные случаи ХЛЛ с двумя клональными перестройками генов одного семейства	Общая статистика ХЛЛ в России	Критерий согласия χ^2
U-CLL	70,30%	68%	p = 0,7
M-CLL	29,70%	32%	
IGHV3	68,75%	41,3%	p < 0,0001*
IGHV1	17,20%	34,3%	
IGHV4	7,80%	19,2%	
CLL#1	4,70%	3,3%	p = 0,56
CLL#2	6,25%	1,4%	p = 0,003*
	N=64	N=1800	

Результаты пациентов с одной клональной перестройкой IGHV

В 27 случаях из 94 была идентифицирована только одна перестройка генов, которая являлась продуктивной. У 7 пациентов из этих 27 был выявлен вариант U-CLL, а у 20 – М-CLL. В 14 перестройках использовалось семейство IGHV3, в 5 случаях – IGHV3, в 7 случаях – IGHV4, ещё в одном случае была определена перестройка с использованием гена *IGHV2-5*. Несмотря на то, что секвенирование по Сэнгеру в описанных случаях было неэффективным, метод секвенирования нового поколения позволяет определить тип ХЛЛ и использованное семейство *IGHV* даже при наличии внутриклоновой гетерогенности. Вероятно, гетерогенность секвенирования по Сэнгеру в этих случаях была связана с небольшим количеством опухолевых клеток в образце и высоким поликлональным фоном.

Среди исследованных методом NGS случаев ХЛЛ с одной клональной перестройкой вариант М-CLL составил 74,1%, а вариант U-CLL – 25,9%. В отличие от общей статистики по России и от статистики по пациентам с двумя клональными перестройками (см. таблицу б), для данной группы пациентов наблюдается явный сдвиг в сторону М-CLL ($p < 0,0001^*$). Объяснением этому факту может служить то, что при ХЛЛ с одной клональной перестройкой секвенирование по Сэнгеру обычно является неэффективным из-за высокого поликлонального фона на ранних стадиях заболевания, при лимфоме из малых лимфоцитов (подвид ХЛЛ, характеризующийся накоплением опухолевых клеток в лимфатических узлах) и в случае начала рецидива. Первые два варианта чаще демонстрируют мутированный тип ХЛЛ.

Результаты пациентов с тремя и более клональными перестройками IGHV

Для 4 пациентов было идентифицировано 3 клональных перестройки. В двух случаях все три перестройки были продуктивными (семейства IGHV3 и IGHV4), а количество мутаций относительно герминального гена было высоким. Анализ истории болезни показал, что в одном из этих случаев наблюдается одновременное наличие двух опухолевых заболеваний – ХЛЛ и ЛКМ (лимфома из клеток мантии). Но, т. к. все перестройки были мутированными, то есть у пациентов был классифицирован вариант М-CLL.

В одном случае достаточно сложно сделать точный вывод о существенности двух перестроек из трех, так как они составляли около 5% от общего числа клонов. Основная (91%) перестройка у этого пациента содержала ген *IGHV3-53* и имела 100% совпадения с герминальной последовательностью, также как и слабовыраженная перестройка с *IGHV1-69*. Третья перестройка была непродуктивной.

У четвертого пациента наблюдалось 4 перестройки. При этом две перестройки (27,4% и 12,1%) содержали одинаковый набор VDJ-генов и имели 100% совпадения с герминальной последовательностью гена *IGHV1-69*. Однако, строение CDR3 для этих двух перестроек сильно отличалось, следовательно, в данном случае нельзя говорить о внутриклоновой гетерогенности. Ещё одна слабовыраженная (11%) перестройка совпадала с герминальным геном *IGHV3-23* на 96,68%. Четвёртая перестройка была непродуктивной. Точный диагноз для данного пациента не ясен, однако зафиксированная нами клональная архитектура даёт основания предполагать наличие двух патологических онкогематопролиферативных процессов.

Заключение

Наше исследование показало возможность использования одной из наиболее широко распространенных технологий NGS для определения мутационного статуса генов *IGHV*. Мы обнаружили, что в случаях с двумя перестройками с генами одного семейства *IGHV* чаще встречаются варианты семейства IGHV3 (68,75%), варианты без мутаций *IGHV* также встречаются чаще (70,3%). Также было продемонстрировано, что в случаях с одной клональной перестройкой, которая не может быть проанализирована с помощью секвенирования по Сэнгеру, преобладает вариант M-CLL. Это можно объяснить тем, что у большинства данных пациентов наблюдается начальная стадия ХЛЛ либо его разновидность – лимфома из малых лимфоцитов. Несмотря на то, что в настоящее время метод секвенирования по Сэнгеру более удобен для данного рутинного анализа, для значительного числа сложных случаев NGS позволит пациентам уточнить диагноз и получить соответствующее лечение. Также эта методика даст возможность лучше изучить особенности заболевания в сложных случаях.

Выводы

1. Система определения мутационного статуса генов *IGHV* адаптирована к технологии секвенирования нового поколения: выбран оптимальный метод амплификации генетического материала, оптимизирован биоинформатический анализ, получены результаты анализа генов *IGHV* для 95 пациентов с ХЛЛ.
2. Частота встречаемости мутированного и немутированного типов ХЛЛ у пациентов с двумя клональными перестройками с использованием генов *IGHV* одного семейства соответствует общей статистике по России. Распределение между семействами генов *IGHV* в данной группе имеет выраженный сдвиг от *IGHV1* и *IGHV4* в сторону *IGHV3*. Продемонстрирован сдвиг распределения в сторону М-CLL для обследованных пациентов с одной клональной перестройкой.
3. Показано, что в некоторых случаях возможно определение трёх и более клональных перестроек генов *IGHV* методом NGS, данный факт может быть связан с наличием двух параллельных В-клеточных онкогематологических заболеваний у одного пациента.

Список литературы

1. Union for International Cancer Control. Chronic lymphocytic leukemia. Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines, 2014.
2. Каприн А.Д., Старинский Г.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) // Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 250 с.
3. Pulte D. et al. Trends in survival of chronic lymphocytic leukemia patients in Germany and the USA in the first decade of the twenty-first century // J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol. – 2016. – Vol. 9.– № 1. – P. 28.
4. Rosenquist R. et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: Updated ERIC recommendations // Leukemia. – 2017. – Vol. 31.
5. Langerak A.W. et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases // Leukemia. – 2011. – Vol. 25. – № 6. – P. 979–984.
6. Murphy K. et al. Janeway's immunobiology. New York: Garland Science, 2012.
7. Alberts B. et al. B Cells and Antibodies // Mol. Biol. Cell 4th Ed. Garland Science, 2002.
8. Owen J.A. et al. Kuby immunology. 7th ed. // New York: WHFreeman, 2013. – 109 p.
9. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. В 3-х томах. Том 1. Основы биохимии, строение и катализ / Москва: Лабиринт, 2020.
10. Barclay A.N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains – a master superfamily of interaction molecules // Semin. Immunol. – 2003. – Vol. 15. – № 4. – P. 215–223.
11. Альбертс Б., Льюис Дж., Джонсон А. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. Т. III. // Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. – 1028 с.
12. Al-Lazikani B., Lesk A.M., Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins / Edited by I. A. Wilson // J. Mol. Biol. – 1997. – Vol. 273. – № 4. – P. 927–948.
13. Beale D., Feinstein A. Structure and function of the constant regions of immunoglobulins // Q. Rev. Biophys. – Cambridge University Press. – 1976. – Vol. 9. – № 2. – P. 135–180.
14. Walzem F., Kilsen R., Kerpan I. Microbiology III: Immunology // Cambridge Stanford Books – 443 p.
15. Teng G., Papavasiliou F.N. Immunoglobulin somatic hypermutation // Annu. Rev. Genet. – 2007. – Vol. 41. – P. 107–120.
16. Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia // N. Engl. J. Med. –

2005. – Vol. 352 – № 8. – P. 804–815.

17. Muramatsu M. et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme // *Cell*. – 2000. – Vol. 102. – № 5. – P. 553–563.

18. Revy P. et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2) // *Cell*. 2000. – Vol. 102 –№ 5. – P. 565–575.

19. Lightner J. Adaptive genetic changes by design: A look at the DNA editing by activation-induced cytidine deaminase (AID) // *Creat. Res. Soc. Q.* – 2016. – Vol. 52. – P. 265–274.

20. Odegard V.H., Schatz D.G. Targeting of somatic hypermutation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – № 8. – P. 573–583.

21. Khodabakhshi A.H. et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma // *Oncotarget*. – 2012. – Vol. 3 – № 11. – P. 1308–1319.

22. Jemal A. et al. Cancer Statistics, 2010 // *CA. Cancer J. Clin.* – 2010. – Vol. 60. – № 5. – P. 277–300.

23. Galton D.A. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia // *Can. Med. Assoc. J.* – 1966. – Vol. 94. – № 19. – P. 1005–1010.

24. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes // *Blood*. – 1967. – Vol. 29. – № 4. – P. Suppl: 566–584.

25. Rai K.R., Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) – Then and now // *Am. J. Hematol.* – 2016. – Vol. 91. – № 3. – P. 330–340.

26. Hallek M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 12. – P. 5446–5456.

27. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment // *Am. J. Hematol.* – 2019. – Vol. 94 – № 11. – P. 1266–1287.

28. Heyman B., Volkheimer A.D., Weinberg J.B. Double IGHV DNA gene rearrangements in CLL: influence of mixed-mutated and -unmutated rearrangements on outcomes in CLL // *Blood Cancer J.* – 2016. – Vol. 6. – № 7. – P. e440.

29. Hengeveld P.J. et al. Reading the B-cell receptor immunome in chronic lymphocytic leukemia: revelations and applications // *Exp. Hematol. Elsevier*. – 2021. – Vol. 93. – P. 14–24.

30. Gaidano G., Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2017. –

Vol. 2017. – № 1. – P. 329–337.

31. Hallek M. et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL // *Blood*. 2018. – Vol. 131. – № 25. – P. 2745–2760.
32. Zenz T. et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – № 29. – P. 4473–4479.
33. Döhner H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – № 26. – P. 1910–1916.
34. Hamblin T.J. et al. Unmutated Ig VH Genes Are Associated with a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia // *Blood*. – 1999. – Vol. 94. – № 6. – P. 1848–1854.
35. Nikitin E. et al. Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Leuk. Lymphoma*. – 2007. – Vol. 48. – P. 912–922.
36. Rossi D. et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia // *Blood*. 2015. – Vol. 126. – № 16. – P. 1921–1924.
37. Davis Z. et al. The outcome of Chronic lymphocytic leukaemia patients with 97% IGHV gene identity to germline is distinct from cases with <97% identity and similar to those with 98% identity // *Br. J. Haematol.* – 2016. – Vol. 173. – № 1. – P. 127-136.
38. Agathangelidis A., Psomopoulos F., Stamatopoulos K. Stereotyped B Cell Receptor Immunoglobulins in B Cell Lymphomas // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. – 2019. – Vol. 1956. – P. 139–155.
39. Fais F. et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. // *J. Clin. Invest.* 1998. – Vol. 102. – № 8. – P. 1515–1525.
40. Stamatopoulos K. et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 1. – P. 259–270.
41. Agathangelidis A. et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 19. – P. 4467–4475.
42. Darzentas N., Stamatopoulos K. The significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2013. – Vol. 27. – № 2. – P. 237–250.
43. Agathangelidis A. et al. Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL // *Blood*. – 2021. – Vol. 137. – № 10. –

P. 1365–1376.

44. Baliakas P. et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study // *Lancet Haematol.* – 2014. – Vol. 1. – № 2. – P. e74–84.
45. Rossi D. et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – № 13. – P. 4415–4422.
46. Hadzidimitriou A. et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia // *Blood.* – 2009. – Vol. 113. – № 2. – P. 403–411.
47. Rassenti L.Z., Kipps T.J. Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 185. – № 8. – P. 1435–1445.
48. Davi F. et al. Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia in the era of next generation sequencing // *Leukemia.* – Nature Publishing Group. – 2020. – Vol. 34. – № 10. – P. 2545–2551.
49. Behjati S., Tarpey P.S. What is next generation sequencing? // *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* – 2013. – Vol. 98. – № 6. – P. 236–238.
50. Fuller C.W. et al. The challenges of sequencing by synthesis // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27. – № 11. – P. 1013–1023.
51. Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide // Illumina, USA – 2012.
52. Shen R. et al. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 573. – № 1–2. – P. 70–82.
53. Bentley D.R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // *Nature.* 2008. Vol. 456, № 7218. P. 53–59.
54. Сидорова Ю. В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациентспецифической ПЦР/ Сидорова Ю.В, Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. // *Клиническая Лабораторная Диагностика.* – 2011. – № 12.
55. Campbell M.J. et al. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire // *Mol. Immunol.* – 1992. – Vol. 29. – № 2. – P. 193–203.
56. van Dongen J.J.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: 12 // *Leukemia.* – Nature Publishing Group. – 2003. – Vol. 17. – № 12. – P. 2257–2317.

57. Agathangelidis A. et al. Immunoglobulin Gene Sequence Analysis In Chronic Lymphocytic Leukemia: From Patient Material To Sequence Interpretation // *J. Vis. Exp.* – 2018. – № 141.
58. Ye J. et al. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – № Web Server issue. P. W34-40.
59. Brochet X., Lefranc M.-P., Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36. – P. W503-508.
60. Bystry V. et al. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy // *Bioinforma. Oxf. Engl.* – 2015. – Vol. 31. – № 23. – P. 3844–3846.
61. Bolotin D.A. et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat. Methods.* – Nature Publishing Group. – 2015. – Vol. 12. – № 5. – P. 380–381.
62. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads// *EMBnet.journal.* – 2011. – Vol. 17. – № 1. – P. 10–12.
63. Scaviner D. et al. Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions // *Exp. Clin. Immunogenet.* – 1999. – Vol. 16. – № 4. – P. 234–240.
64. Ghia P. et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia// *Leukemia.* – Nature Publishing Group. – 2007. – Vol. 21. – № 1. – P. 1–3.

Приложение

Таблица 7. Результаты анализа строения перестроенного локуса *IGHV* у пациентов с ХЛЛ с двумя клональными перестройками.

Номер пациента	Ген <i>IGHV</i>	Ген <i>IGHJ</i>	Ген <i>IGHD</i>	Продуктивность перестройки	Гомология с герминальным геном	Тип ХЛЛ	SAR	Комментарий
1	V3-73	J6	D3-9	unproductive	100%			
	V1-69	J6	D6-13	productive	100%	U-CLL		
2	V1-69	J6	D2-2	productive	100%	U-CLL		
	V1-69	J4	D2-15	unproductive	100%			
3	V3-9	J6	D3-16	productive	100%	U-CLL		
	V3-13	J1	D6-13	unproductive	100%			
4	V3-64	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-13	J4	D6-19	unproductive	100%			
5	V3-22	J4	D3-3	unproductive	79,59%			
	V3-30	J4	D6-19	productive	89,24%	M-CLL		
6	V3-11	J6	D3-10	productive	100%	U-CLL		
	V3-13	J4	D1-26	unproductive	100%			
7	V3-7	J5	D4-11	productive	94,19%	M-CLL		
	V3-33	J4	D3-9	unproductive	94,17%			
8	V3-7	J3	D1-26	productive	93,75%	M-CLL		
	V3-43	J2	D4-17	unproductive	85,71%			
9	V3-21	J6	D2-2	productive	98,76%	U-CLL	CLL#2	

	V3-49	J6	D2-15	unproductive	97,28%			
10	V3-35	J4	D3-3	unproductive	100%			
	V3-23	J5	D3-22	productive	100%	U-CLL		
11	V3-21	J6	D3-10	productive	99,16%	U-CLL		
	V3-21	J6	D3-10	unproductive	100%			
12	V3-21	J6	D2-2	productive	94,14%	M-CLL		
	V3-72	J4	D2-21	productive	94,22%	M-CLL		
13	V3-21	J6	none	potentially productive	98,73%	U-CLL	CLL#2	
	V3-7	J6	D3-3	unproductive	97,57%			
	V3-7	J6	D3-3	unproductive	96,88%			внутриклоновая гетерогенность
14	V1-2	J6	D2-15	productive	100%	U-CLL		
	V1-69	J5	D2-8	unproductive	100%			
15	V1-3	J4	D6-19	productive	100%	U-CLL	CLL#1	
	V1-8	J4	D6-6	unproductive	100%			
16	V3-23	J4	D6-6	productive	98,61%	U-CLL		
	V3-33	J4	D1-1	unproductive	96,88%			
17	V1-3	J3	D4-17	unproductive	100%			
	V1-69	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		
18	V1-69	J6	D5-12	productive	99,65%	U-CLL		
	V7-4	J5	D2-2	unproductive	100%			
19	V3-33	J6	D6-13	productive	100%	U-CLL		
	V3-66	J5	D6-19	unproductive	100%			
20	V3-23	J4	D4-23	productive	98,96%	U-CLL		
	V3-30	J4	D3-22	unproductive	97,92%			
21	V3-48	J6	D4-23	unproductive	98,79%			
	V3-21	J6	no res	potentially productive	98,50%	U-CLL	CLL#2	

22	V3-13	J4	D3-10	unproductive	100%			
	V3-48	J5	D3-22	productive	100%	U-CLL		
23	V1-69	J6	D3-22	productive	100%	U-CLL		
	V1-2	J4	D3-10	unproductive	100%			
24	V3-33	J5	D3-3	unproductive	87,50%			
	V3-66	J4	D5-24	productive	89,47%	M-CLL		
25	V3-11	J6	D3-22	unproductive	99,21%			
	V3-66	J5	D4-23	productive	96,80%	M-CLL		
26	V3-23	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-13	J5	D2-15	unproductive	100%			
27	V1-69	J6	D2-15	potentially productive	100%	U-CLL		
	V1-NL1	J3	D3-22	unproductive	100%			
28	V3-53	J6	D2-2	unproductive	99,65%			
	V3-21	J6	D3-9	productive	99,59%	U-CLL		
29	V4-59	J6	D3-22	potentially productive	100%	U-CLL		
	V4-34	J5	D2-21	unproductive	100%			
30	V3-48	J4	D7-27	productive	98,74%	U-CLL		
	V3-11	J4	D6-13	unproductive	97,21%			
	V3-48	J4	D7-27	productive	98,46%	U-CLL		внутриклоновая гетерогенность
	V3-11	J4	D6-13	unproductive	94,39%			внутриклоновая гетерогенность
31	V3-48	J6	D2-8	productive	95,82%	M-CLL		
	V3-49	J4	D6-19	unproductive	91,16%			
32	V1-69	J5	D1-26	productive	100%	U-CLL		
	V1-2	J4	D2-9	unproductive	100%			
33	V3-72	J6	D2-8	unproductive	100%			
	V3-30	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		

34	V3-7	J3	D1-7	productive	100%	U-CLL		
	V3-23	J2	D2-15	unproductive	100%			
	V3-64	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		Химерный либо субклональный продукт
35	V3-9	J6	D1-14	productive	98,26%	U-CLL		
	V3-53	J4	D1-26	unproductive	92,63%			
36	V1-3	J4	D6-19	productive	100%	U-CLL	CLL#1	
	V1-NL1	J4	D2-15	unproductive	93,94%			
	V1-NL1	J4	D2-15	unproductive	93,48%			внутриклоновая гетерогенность
37	V3-48	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-9	J5	D5-12	unproductive	100%			
38	V3-13	J5	D2-2	unproductive	89,56%			
	V3-74	J4	D3-10	productive	92,71%	M-CLL		
	V3-13	J5	D2-2	unproductive	91,16%			внутриклоновая гетерогенность
39	V4-39	J4	D1-1	potentially productive	97,93%	M-CLL		
	V4-34	J4	D2-8	unproductive	100%			
40	V3-33	J6	D2-2	unproductive	100%			
	V3-11	J4	D5-18	productive	100%	U-CLL		
41	V3-33	J4	D2-21	productive	99,31%	U-CLL		
	V3-30	J4	D2-2	unproductive	95,82%			внутриклоновая гетерогенность
	V3-33	J4	D2-21	productive	99,61%	U-CLL		
42	V7-4	J4	D6-19	productive	99,65%	U-CLL	CLL#1	
	V1-2	J5	D3-22	unproductive	100%			
43	V1-2	J5	D2-2	unproductive	92,86%			
	V1-69	J4	D3-3	productive	95,82%	M-CLL		
44	V3-15	J4	D5-24	productive	94,90%	M-CLL		

	V4-59	J6	D5-12	unproductive	95,72%			
45	V3-30	J4	D3-22	unproductive	92,65%			
	V3-33	J6	none	productive	93,72%	M-CLL	CLL#2	
46	V4-59	J4	D3-22	productive	97,88%	M-CLL		
	V4-4	J4	D6-13	unproductive	95,80%			
47	V3-30	J6	D3-9	productive	100%	U-CLL		
	V3-53	J6	D2-2	unproductive	100%			
48	V3-53	J4	D1-26	productive	97,89%	M-CLL		
	V3-66	J5	D2-15	unproductive	97,89%			
49	V3-21	J6	D4-17	productive	92,95%	M-CLL		
	V3-71	J4	D3-22	unproductive	91,18%			
50	V4-34	J6	D2-2	unproductive	100%			
	V4-38	J5	D3-3	productive	100%	U-CLL		
51	V3-30	J6	D3-16	unproductive	92,01%			
	V3-7	J4	D1-26	productive	95,49%	M-CLL		
52	V3-11	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-13	J4	D6-13	unproductive	100%			
53	V3-35	J4	D4-17	unproductive	99,59%			
	V3-30	J4	D4-17	productive	100%	U-CLL	CLL#202	
54	V3-9	J6	D3-22	unproductive	100%			
	V3-30	J4	D1-20	productive	100%	U-CLL		
55	V1-2	J6	D6-19	unproductive	100%			
	V1-63	J6	D6-6	productive	100%	U-CLL		
56	V1-18	J6	D3-9	unproductive	100%			
	V1-69	J6	D3-3	productive	100%	U-CLL	CLL#7H	
57	V3-33	J5	D3-9	unproductive	100%			
	V3-30	J4	D4-17	productive	100%	U-CLL		
58	V3-33	J3	D5-25	productive	93,06%	M-CLL		

	V3-23	J4	D3-9	unproductive	87,11%			
59	V3-13	J4	D6-19	unproductive	99,34%			
	V3-23	J4	D3-9	productive	100%	U-CLL		
60	V3-48	J4	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-7	J4	D3-22	unproductive	100%			
61	V3-23	J4	D2-21	productive	90,97%	M-CLL		
	V3-49	J4	D3-10	unproductive	93,46%			
62	V3-23	J4	D3-3	unproductive	98,95%			
	V3-7	J4	D6-6	productive	97,92%	M-CLL		
63	V3-23	J3	D3-3	productive	100%	U-CLL		
	V3-41	J4	D3-10	unproductive	99,65%			
64	V4-34	J6	D6-19	productive	100%	U-CLL		
	V4-55	J4	D3-3	unproductive	99,63%			