

Možnosti molekulární identifikace individuálních klonů T lymfocytů zodpovědných za reakci štěpu proti nádoru při alogenních transplantacích hematopoetických kmenových buněk.

Foltánková V.¹, Matějková E.¹, Bartoš M.², Dendis M.², Stejskalová A.¹, Koláčná K.¹, Hanák L.³, Nenutil R.³, Doležel P.³, Mayer J.⁴, Michálek J.¹

1) *Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova Univerzita Brno*

2) *Genex CZ, s.r.o., Brno*

3) *Masarykův onkologický ústav, Brno*

4) *Interní hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno*

1 Úvod

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk představuje účinnou léčbu mnoha nádorových i nenádorových onemocnění [1]. Při adoptivní imunoterapii v onkologii jsou pacientům podávány T lymfocyty s protinádorovou aktivitou, které jsou schopny vyvolat reakci štěpu proti nádorovým či leukemickým buňkám (GVT, graft-versus-tumor; GVL, graft-versus-leukemia) [2]. Pomocí tohoto přístupu se již podařilo navodit významnou a trvalou regresi nádoru, což bylo dokázáno u hematologických i solidních nádorů u myši i u člověka [3]. Individuální klony T lymfocytů zodpovědné za GVT/GVL reakci lze získat sti-

mulací nádorovými antigeny *in vitro* v tzv. smíšené leukocytární reakci (MLR, mixed leukocyte reaction), při níž jsou T lymfocyty dárce vystaveny nádorovým/leukemickým buňkám pacienta [7].

Charakteristika identity individuálních klonů T lymfocytů se zakládá na popisu T lymfocytárního receptoru (TCR), respektive jeho kódujícího genu TCRB. TCR receptor je transmembránový heterodimer, který rozeznává antigeny vázané v HLA I a HLA II molekulách na povrchu antigen prezentujících buněk. Je složen z podjednotek α , β nebo γ , δ . Nejvýznamnější využití ve studiích klonality nachází podjednotka β . Její diverzita je dána náhodnou kombinací genových segmentů V, D, J a C a insercemi a deletcemi v místě tvorby spoju mezi segmenty během jejich přestavby při zrání T lymfocytu. Zde se nachází oblast největší sekvenční variability CDR3 (complementarity determining region), která tvoří centrum vazebného místa pro antigen [4]. Sekvence CDR3 je pro konkrétní individuální klon T lymfocytu vždy zcela jedinečná.

2 Materiál a metody

2.1 Odběr materiálu

Vzorky periferní krve a kostní dřeně byly odebírány v rámci rutinních odběrů pacientům léčeným s vybranými nádorovými onemocněními na pracovištích Fakultní nemocnice (FN) Brno (Klinika dětské onkologie a Interní hematooonkologická klinika) a Masarykova onkologického ústavu po podepsání informovaného souhlasu. Nádorové buňky byly získány v době stanovení diagnózy nebo v době klinického relapsu nádorového onemocnění. Nenádorové zdravé buňky těchto pacientů byly získávány z mononukleárních buněk periferní krve (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) v době klinické remise onemocnění. PBMC zdravých dárců z Transfúzního oddělení FN Brno byly získávány z odpadních produktů přípravy erytrocytárního koncentrátu (buffy coat), které obsahují leukocyty. PBMC byly dále izolovány gradientovou centrifugací.

2.2 Příprava buněk

Čistota nádorových a nenádorových PBMC pacientů byla hodnocena flowcytometricky. Pokud dosáhla minimálně 98 %, bylo možné buňky po ozáření dávkou 30 Gy použít jako antigen.

2.3 Primární a sekundární smíšená leukocytární reakce

Aktivace aloreaktivních dárcovských T lymfocytů byla provedena v primární MLR, při níž byly smíchány PBMC dárce s nenádorovým antigenem. Po 24 hodinové kultivaci byly aktivované aloreaktivní CD25⁺ T lymfocyty dárce selektivně depletovány pomocí anti-CD25 imunotoxinu RFT5-SMPT-dgA v koncentraci 10⁻⁸ M podle již publikovaného postupu [5,6]. Alodepletované lymfocyty dárce byly v sekundární MLR vystaveny nádorovým antigenům z nádorových/leukemických buněk téhož pacienta jako v primární MLR a reaktivovány po 7 dnech stejným nádorovým antigenem.

2.4 Klonotypový esej

2.4.1 Izolace mRNA, reverzní transkripce

Aktivované populace GVT/GVL-reaktivních T lymfocytů byly po desetidenní inkubaci imunomagneticky separovány na základě přítomnosti aktivačního markeru INF- γ a fenotypového povrchového znaku T lymfocytů (CD3⁺) [7,8]. Z buněčných kultur byla izolována poly(A) mRNA (QIAGEN Oligotex[®] Direct mRNA Kit; QIAGEN), která byla technologií SMART[™] (SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit; Clontech Laboratories) ihned přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Během reverzní transkripce se díky terminál-transferázové aktivitě reverzní transkriptázy připojuje 3 až 5 nukleotidů (převážně dC) na 3'-konec syntetizované cDNA. Na tento dC bohatý konec se pak váže oligonukleotid s kotvou (SMART oligo) pomocí svého dG terminálního konce. To umožňuje reverzní transkriptáze pokračovat v syntéze cDNA a začlenit na její konec sekvenci kotvy (anchor).

2.4.2 PCR

Amplifikace cílového úseku cDNA byla provedena dvěma metodikami založenými na PCR.

a) Zakotvená (anchor) PCR (technologie 5'-RACE)

K amplifikaci cDNA byl použit anchor primer, jenž nasedá na sekvenci kotvy začleněné během reverzní transkripce, a zpětný (reverse) primer MBCII, jenž je genově specifický pro C-region TCRB [8]. Směs produktů o délce přibližně ~550 bp představuje soubor všech TCRB-VDJ sekvencí exprimovaných v buňkách.

b) PCR se sadou 31 TRBV primerů

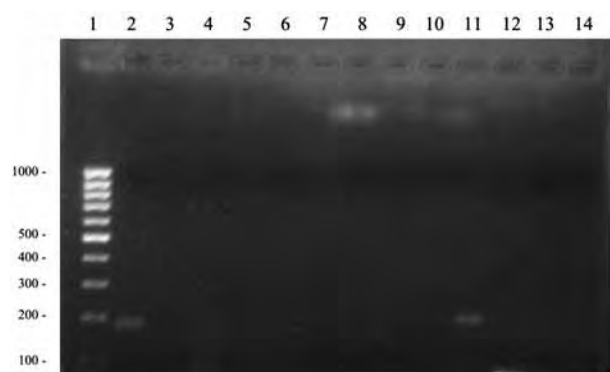
Sada TRBV primerů představuje 31 různých oligonukleotidů specifických pro jednotlivé typy variabilních oblastí genu TCRB, které jsou rozděleny podle sekvenční příbuznosti do tzv. V-rodin. V-rodiny jsou označeny podle mezinárodní nomenklatury IMGT[®] (ImMunoGeneTics information system[®] <http://imgt.cines.fr>) [9]. Jako reverse primer byl použit TRBC primer, specifický pro C-region genu TCRB. Sekvence všech primerů byla již dříve publikována [10].

Výsledný produkt má délku přibližně ~200 bp.

PCR produkty byly v obou případech zviditelněny pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu. Extrakce produktu z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN).

2.4.3 Klonování, sekvenování

Ke klonování PCR produktu do bakterií *E.coli* byl použit TA Cloning® Kit (Invitrogen). Kolonie byly vysety na selekční LB agarové médium obsahující IPTG, Ampicilin a X-gal. Přítomnost inzertu v bakteriálním plazmidu byla ověřena modrobílým testem a PCR. Z pozitivních kolonií byl izolován plazmid pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu (QIAGEN). Plazmidy byly sekvenovány na přístroji 3130 Genetic Analyzer pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitu (Applied Biosystems). Získané sekvence byly poté vyhodnoceny pomocí bioinformatických nástrojů přístupných na stránkách <http://imgt.cines.fr> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.



Obr. 1

Ukázka elektroforetogramu produktů PCR s TRBV primery u pacienta č. 1

Dráha 1: velikostní standard 100 bp

Dráha 2: PCR produkt T lymfocytárního klonu 1-A (TRBV 2) 200 bp

Dráha 11: PCR produkt T lymfocytárního klonu 1-B (TRBV 7.8) 200 bp

Pacient č.	Diagnóza	Klon	V-rodina	Aminokyselinová sekvence CDR3	J-region	Frekvence
1	Renální karcinom	1-A	TRBV 2	CASNPVISNQPHF		
		1-B	TRBV 7.8	CASSTRQGGKQYF		
		1-C	TRBV 10.3	CAISGDLAGGFDNEQFF		
		1-D	TRBV 19	CATLPTTGELFF		
2	AME	2-A	TRBV 4.3	CASSQEVHWDEQFF	TRBJ 2.1	54%
		2-B	TRBV 5.6	CASSLEGRVQETQYF	TRBJ 2.5	46%
3	CLL	3-A	TRBV 4.3	CASSHRYGGRPGNTIYF	TRBJ 1.3	31%
		3-B	TRBV 6.5	CASSKPPWEAGASYEQYF	TRBJ 2.7	29%
		3-C	TRBV 7.2	CASSPTSGETQYF	TRBJ 2.5	25%
		3-D	TRBV 7.2	CASRVGGLGSPLHF	TRBJ 1.6	11%
		3-E	TRBV 2	CASRFPQGQARNTAEFF	TRBJ 1.1	2%
		3-F	TRBV 4.1	CASSPIGRGVNSPLHF	TRBJ 1.6	2%

Tab. 1

Přehled detekovaných GLV/GVT-reaktivních klonů T lymfocytů.

Imunodominantní klony jsou zvýrazněny tučně.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Testování senzitivity jednotlivých systémů PCR s TRBV primery

Pro spolehlivost výsledků PCR s TRBV primery bylo nutné zajistit takovou reakční senzitivitu, aby bylo možné amplifikovat specifickou DNA o co nejnižší koncentraci. U všech 31 systémů se podařilo dosáhnout minimální senzitivity PCR 10^3 kopií DNA na μ l, která by při RNA izolaci z 10^6 buněk měla být dostačující pro záchyt významných imunodominantních klonů T lymfocytů podstatných v boji proti nádorovým buňkám.

3.2 Analýza vzorků pacientů

Kompletní analýze TCR- β repertoáru GVL-reaktivních T lymfocytů byli podrobeni tři pacienti. Tabulka 1 shrnuje jednotlivé klony získané u vyšetřených pacientů, jejich charakterizaci podle V-subgeny a jedinečné aminokyselinové sekvence hypervariabilní oblasti CDR3.

GVT-specifické klony aktivované nádorovými buňkami pacienta č. 1 s diagnózou renálního karcinomu byly identifikovány pomocí PCR s TRBV primery (metoda 2.4.2 b). Detekovali jsme čtyři PCR produkty, které byly amplifikovány primery TRBV2, TRBV7.8, TRBV10.3 a TRBV19. (Obr 1). Od každého PCR produktu bylo analyzováno po 15 bakteriálních koloniích, celkem tedy 60 klonů. Byla určena sekvence CDR3, která byla následně vyhodnocena pomocí databáze IMGT. V rámci jednotlivých V-rodin již bylo všech 15 sekvencí totožných.

Vzorky pacientů č. 2 a č. 3 byly vyšetřeny metodou anchor PCR (metoda 2.4.2 a), která zohledňuje frekvenci individuálních imunodominantních klonů v rámci analyzovaných bakteriálních kolonií a odpovídá jejich zastoupení v dané buněčné populaci. Klony s četností vyšší než 10% jsou zpravidla považovány za imunodominantní a je možné je detekovat *in vivo* [7]. Nádorové buňky pacienta č. 2 s diagnózou akutní myeloidní leukémie aktivovaly dva imunodominantní protileukemické klony T lymfocytů, které příslušely do V-rodin TRBV4.3 a TRBV5.6. Bylo analyzováno celkem 51 bakteriálních kolonií. Frekvenční zastoupení dvou imunodominantních klonů bylo velmi podobné, 54% a 46%.

U pacienta č. 3 s diagnózou chronické lymfatické leukémie bylo mezi 50 analyzovanými bakteriálními koloniemi detekováno šest klonů aktivovaných leukemie-reaktivních T lymfocytů, čtyři z nich lze považovat za imunodominantní. Klinicky lymfocyty dárce tohoto pacienta prokázaly velmi silný protileukemický efekt, který byl bohužel provázen silnou reakcí štěpu proti hostiteli (GVH, graft-versus-host).

4 Závěr

Studie potvrdila, že různé typy nádorových buněk aktivují nádorově-reaktivní klony T lymfocytů dárce. Tyto GVL/GVT-reaktivní klony je možné molekulárně geneticky identifikovat a charakterizovat na základě analýzy aminokyselinové sekvence varia-

bilní oblasti β podjednotky TCR receptoru. Alogenní T lymfocyty jsou však také často původcem nežádoucí reakce štěpu proti hostiteli. Bude proto vhodné identifikovat také GVH-reaktivní klonů a porovnat jejich charakter s klonů protinádorovými. Předmětem pokračování studie dále bude navrhnout klonově specifické primery a fluorescenčně značenou DNA sondu pro jedinečnou sekvenci TCR receptoru nejfrekventovanějších individuálních GVL/GVT i GVH klonů a tyto klonů pak u transplantovaných pacientů sledovat *in vivo* pomocí kvantitativní real-time PCR [7].

Literatura

1. Horowitz MM. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: Hematopoietic Cell Transplantation. 2 ed. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. Blackwell Science, Inc., Maiden, MA, 2000: 8-15.
2. Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Br J Haematol* 1998, 101: 565-570.
3. Dudley ME, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002, 298, (850-4)
4. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 1996, 272:1755-1762
5. Michálek J, Collins RH, Vitetta ES. The effect of different enhancers on the ability of an anti-CD25 ricin α chain immunotoxin to deplete cells which are activated in an MLR. *Blood* 2000; 96: 312b
6. Michálek J., Collins R.H., Vitetta E.S.: Clinical-scale selective depletion of alloreactive T cells using an anti-CD25 immunotoxin. *Neoplasma* 2003, 50: 296-9.
7. Michálek J., Collins R.H., Durrani H.P., Václavková P., Ruff L.E., Douek D.C., Vitetta E.S.: Definitive separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host specific CD4+ T cell clones by virtue of their T cell receptor locus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 1180-4.
8. Michálek J., Collins R.H., Hill B.J., Brenchley J., Douek D.C.: Pre-transplant identification of graft-versus-host specific T-cell clone and quantitative monitoring after allogeneic stem cell transplantation. *Lancet* 2003, 361: 1183-5.
9. Lefranc MO. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:307-310
10. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJ.: Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCR $\alpha\beta$ T-cell proliferations. *Blood* 2001, 98(1):165-73.