

VÝZNAM SLEDOVÁNÍ EXPRESE NÁDOROVÝCH TESTIKULÁRNÍCH ANTIGENŮ U MNOHOČETNÉHO MYELOMU A MONOKLONÁLNÍCH GAMAPATIÍ

IMPACT OF CANCER/TESTIS ANTIGENS (CTA) EXPRESSION IN MULTIPLE MYELOMA (MM) AND MONOCLONAL GAMMAPATHY (MGUS)

NEČASOVÁ J.^{1,2,3}, KADLECOVÁ J.⁴, SPĚŠNÁ R.⁴, PENKA M.⁵, HÁJEK R.^{1,3,6}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

⁴ LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PDM

⁵ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

⁶ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Rodina lidských MAGE genů, které patří mezi tzv. nádorové testikulární antigeny (CTA), kóduje produkty, které mohou být rozpoznávány autologními cytotoxickými T lymfocyty. Pro skupinu CTA je charakteristická exprese u mnoha typů nádorů, v normální zdravé tkáni exprese těchto antigenů popsána nebyla s výjimkou varlete a placenty. CT antigeny jsou hojně exprimovány u mnohočetného myelomu a tím reprezentují vhodné kandidáty pro nádorově specifickou imunoterapii MM. Korelace mezi expresí těchto genů a stádiem onemocnění je již známá. Analyzovali jsme expresi genů MAGE-A1 a MAGE-A3 v kostní dřeni u souboru pacientů s monoklonální gamapatií (MGUS) a u pacientů časného a pokročilého stádia mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, monoklonální gamapatie, nádorové testikulární antigeny, antigeny asociované s tumorem, imunoterapie.

Summary

The human MAGE gene family which is a group of „cancer/testis antigens“ (CTA) encodes products that can be recognized by autologous cytotoxic T cells. CT antigens are expressed in several malignant tumors, but not in normal tissues except for testis and placenta. CT antigens are frequently expressed in MM and represents promising candidates for cancer-specific immunotherapy in multiple myeloma. An obvious correlation between the expression of these genes and the stage of the disease has been observed. We examined the expression of MAGE-A1 and MAGE-A3 in bone marrow in a group of patients with monoclonal gammopathy and in patients with early and advanced stage of the multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma, monoclonal gammopathy, cancer/testis antigens, cancer germline antigens, tumor associated antigens, immunotherapy.

Úvod

První nádorový testikulární antigen (CTA), konkrétně MAGE-A1 (gen pro melanomový antigen A1), byl identifikován v roce 1991 (23). Termín „cancer/testis antigen (CTA)“ byl zaveden *Chen et al.* (3), kteří objevili společný expresní profil této skupiny genů. Fyziologická role CT genových produktů nebyla zatím zcela objasněna, ačkoliv je role těchto antigenů v gametogenezi, regulaci buněčného cyklu a apoptóze intenzivně studována (16, 10, 26, 13). Nádorové testikulární antigeny, respektive tzv. onkospermatogonální antigeny (7), nebo antigeny označované také jako nádorové zárodečné antigeny (CGA), reprezentují skupinu, která se zdá velmi slibnou pro indukci imunitní odpovědi při nádorově specifické imunoterapii (20). Do roku 2005 bylo popsáno 89 jednotlivých CTA genů nebo izoform, které byly uspořádány do 44 rodin. Expres CT genů v maligních nádorech je reaktivována hypometylací promotorových oblastí. Jejich přítomnost

u nádorů je výsledkem epigenetických změn spojených s maligní transformací (5). Bylo zjištěno, že exprese CT genů úzce souvisí s pokročilým onemocněním a se špatnou prognózou u různých typů nádorů (8). Několik výzkumných skupin již popsalo expresi CT genů v myelomových buňkách (22, 18, 6, 19, 25, 9, 11, 24). Dhodapkar *et al.* (6) potvrdili, že exprese MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C1 (CT-7) a NY-ESO-1 u monoklonálních gamapatií (MGUS) koreluje s rizikem onemocnění myelomem a jeho stádiem. *Atanackovic et al.* (2) testovali expresi 11 různých CTA, především členů rodin MAGE a SSX, a to na panelu myelomových linií a vzorcích pacientů s MM. Nejvyšší expresi zaznamenali u MAGE-A3 (55%), MAGE-C2/CT10 (56%). Jedna z posledních prací (1) přináší výsledky studia exprese 14-ti vybraných CTA na MM (MAGE rodina, BAGE, GAGE, LAGE, SSX ad.). Z výsledků této práce vyplývá, že nevhodnější CTA pro imunoterapii MM jsou MAGE-C1/CT7, LAGE-1 a MA-

příklady využití

GE-A3/6, přičemž jejich exprese byla prokázána u 77%, 49% a 41% vzorků pacientů s MM a dohromady jejich exprese pokrývá 85% všech zkoumaných vzorků. Většina CTA je u různých typů nádorů koexprimována. Tato jejich koordinovaná exprese může být důležitá pro jejich funkci a pro možnou roli v tumorigenezi. Podle *Andrade et al.* (1) patří antigeny MAGE-A3 a MAGE-A6 k třetím nejčastěji exprimovaným u myelomových vzorků (41%). Jungbluth *et al.* (9) pomocí RT-PCR demonstrovali, že MAGE-A rodina je exprimována u 100% MM pacientů. Expres MAGE-A3/A6 byla imunohistochemicky prokázána u 70% MM vzorků stádia III. Navíc, *van Baren et al.* (22) prokázali expresi MAGE-A3 u 29% a v případě MAGE-A6 u 33%, vzorků pokročilého stádia MM metodou RT-PCR. Vzhledem k takto vysokým relativním četnostem exprese u pokročilých stádií MM pacientů je možné, že rodina MAGE se účastní biologie této fatální malignity B buněk.

Metodika a soubor nemocných

Na základě výsledků zahraničních publikací byly pro sledování exprese vybrány 2 CT geny, konkrétně MAGE-A1 a MAGE-A3. Podrobný princip metody real-time PCR je popsán v metodické části tohoto supplementa (str. 220). Všechny vzorky kostní dřeně (KD) a periferní krve (PK) byly získány od pacientů Interní hematologické kliniky, Fakultní nemocnice Brno s informovaným souhlasem jako část diagnostického odběru. Celková RNA z KD a PK byla izolována metodou TRIzol® (Invitrogen) podle manuálu. Čistota a kvalita RNA byla sledována spektrofotometricky (Biophotometr 6131, Eppendorf). Všechny vzorky RNA byly až do fáze reverzní transkripce uchovány při -70°C. Pro RT-PCR bylo ve všech případech použito stejné množství celkové RNA (1µg). Všechna RT-PCR byla prováděna s použitím Transcriptor® reverzní transkriptázy (Roche Diagnostics) v celkovém objemu 20µl. Jako housekeepingový gen byl na základě srovnání výsledků analýzy 5-ti genů ze selekčního kitu (Housekeeping Gene Selection kit, Roche Diagnostics) zvolen gen pro Glukóza-6-fosfát dehydrogenázu (G6PDH), k jehož expresi byla vztažena exprese hledaných genů při relativní kvantifikaci. Primery pro oba geny byly převzaty z publikace Park *et al.* (17) a design reakce a syntéza FRET sond (Fluorescence Resonance Energy Transfer) byla navržena ve spolupráci s firmou TibMolBiol, Germany. V real-time PCR mastermixu byla použita Uracil-DNA-glykozyláza (Roche Diagnostics) k prevenci kontaminace amplikony. Analýzy exprese byly prováděny na přístroji LightCycler® 1.5 Instrument (Roche Diagnostics). Jako pozitivní kontrola byla v experimentech použita linie U266, u které je známá exprese MAGE-A genů. Charakteristika souboru vyšetřených nemocných je obsažena v tabulce č. 1.

Výsledky

Z celkového počtu 153 vzorků kostní dřeně (KD) bylo analyzováno: 40 vzorků MGUS, 12 vzorků od pacientů časného stádia MM, kteří nebyli dosud léčeni (doutnající MM 4x, stádium I.A 8x), 86 vzorků pokročilého myelomu a 15 vzorků KD zdravých dárců, kteří sloužili jako kontrolní skupina. U 15-ti náhodně vybraných pacien-

tů s pokročilým MM byla současně odebrána i periferní krev (PK) a analyzována stejně jako vzorek KD. Pouze u 5-ti % (2/40) vzorků MGUS byla nalezena pozitivní exprese MAGE-A1 nebo MAGE-A3. Padesát procent (6/12) pacientů s časným stádiem MM (I.A a doutnající) bylo pozitivních pro MAGE-A1 nebo MAGE-A3. U více než jedné třetiny vzorků pacientů s pokročilým MM byla zjištěna exprese alespoň jednoho genu 37,2 % (32/86) nebo obou genů současně 23,2% (20/86). V kontrolní skupině 15-ti zdravých dárců byly všechny vzorky negativní. Ačkoliv z 15-ti vzorků pokročilého MM byla exprese pozitivní u 53,3% (8/15) KD, exprese u žádného vzorku PK nebyla zjištěna. Absolutní počty vzorků od pacientů jednotlivých stádií, u kterých byla nalezena exprese jednotlivých genů, jsou uvedeny v tabulce č. 2.

	ZK	MGUS	MM I.A	SMM	MM
Počet pacientů	15	40	8	4	86
Rozmezí věku (roky)	31-84	39-81	47-79	56-83	30-84
Pohlaví					
Muž	8	22	4	3	58
Žena	7	18	4	1	28
Izotyp					
IgG	-	22	4	2	50
IgA	-	9	4	1	29
IgM	-	3	-	-	1
*	-	6	-	1	6
Typ lehkého řetězce					
Kappa	-	18	5	4	55
Lambda	-	15	3	-	28
*	-	7	-	-	3
Infiltrace KD					
0%-50%	-	40	8	4	85
51%-100%	-	-	-	-	1

Tabulka č. 1: Charakteristika analyzovaného souboru pacientů (ZK- zdravá kontrolní skupina, MGUS- monoklonální gamapatie, MM I.A- mnohočetný myelom stádia I.A, SMM- doutnající myelom, MM- pokročilý myelom, KD- kostní dřeň, * data nebyla k dispozici)

<i>Expresie genu</i>				MAGE-A1 a
<i>Analýzovaný soubor</i>		MAGE-A1	MAGE-A3	MAGE-A3
ZK (n= 15)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
MGUS (n=40)		1 (2,5%)	2 (5%)	1 (2,5%)
Časné stádium (n=12)	SMM (n=4)	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)
	I.A (n=8)	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)
MM (n=86)		29 (33,7%)	23 (26,7%)	20 (23,2%)
MM (n=15)	KD (n=15)	7 (46,6%)	3 (20%)	2 (13,3%)
	PK (n=15)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabulka č. 2: Výsledky exprese genů MAGE-A1 a MAGE-A3 u jednotlivých skupin pacientů (ZK- zdravá kontrolní skupina, MGUS- monoklonální gamapatie, MM I.A- mnohočetný myelom stádia I.A, SMM- doutnající myelom, MM- pokročilý myelom, KD- kostní dřeň, PK- periferní krev)

Diskuze a Závěr

Cílem této studie bylo zjistit možnost využití exprese těchto genů jako molekulárních markerů progresu MGUS do MM a detekce časného relapsu MM. Analýzou 15-ti vzorků KD zdravých dárců jsme potvrdili, že ve zdravé tkáni MAGE geny nejsou exprimovány. Naše výsledky potvrzují detekci nízkých hladin exprese mRNA MAGE-typu v KD pacientů MGUS a časných

stádií MM, což by u těchto pacientů mohlo svědčit o vývoji onemocnění. Současným testováním exprese ve vzorku KD i PK u náhodně vybraných 15-ti pacientů jsme dospěli k výsledku, že ačkoliv exprese v KD je pozitivní, v PK nebyla prokázána. Ačkoli se metoda real-time PCR používá k detekci cirkulujících nádorových buněk např. u neuroblastomu na základě exprese vybraných markerů (MAGE či tyrozinhydroxylázy; 15, 14), v případě myelomu zřejmě nebude možné detekovat myelomové buňky v PK především proto, že k jejich vyplavování téměř nedochází. Expres různých CT antigenů v nádorech je v pozitivní korelaci, což naznačuje, že tyto geny mohou být aktivovány společnými mechanismy, např. demethylace (5). Z výsledků mnoha studií vyplývá několik vhodných kandidátních CTA pro imunoterapii MM. Mezi ně patří především MAGE-C1(CT7), MAGE-A3/A6 a LAGE-1, neboť jsou současně exprimovány u 85% pacientů (1), dále rodina SSX a MAGE-C2/CT10 (2). Protein MAGE-A3 byl identifikován většinou ve vzorcích pokročilých stádií MM (70%). Monitorování MAGE antigenů může předpovědět progresi onemocnění (22, 6), vzhledem však k nutnosti analýzy vzorků KD tato metoda není vhodná pro rutinní sledování minimální zbytkové nemoci (MRD) u pacientů s MM, neboť půlroční inter-

val mezi odběry kostní dřeně pro monitorovací účely je velmi dlouhý. Doposud byla většina prací založena na sledování exprese CTA v separovaných myelomových buňkách KD a jen pouze některé práce použily jako výchozí materiál plnou KD (11). Definice nejvhodnější metody a následného klinického využití sledování minimální choroby u MM je stále „tvrdým oříškem“. Sledování MRD metodou ASO kvantitativní PCR na přestavbách IgH genu sice prokázalo prognostický význam u pacientů po autologní a alogenní transplantaci kmenových buněk, ale použití techniky má několik zásadních úskalí (4, 12). Opravdu slibným přístupem pro sledování MRD je multiparametrická flowcytometrie, která kromě počtu plazmatických buněk umožňuje monitorovat a rozlišovat myelomatózní a normální plazmatické buňky.

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě poděkovat paní primářce MUDr. Renatě Gaillyové, PhD. za umožnění provádění analýz v laboratořích Molekulární genetiky na oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno.

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434

Literatura

- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 2008 Feb 1;8:2.
- Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, et al. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, February 1, 2007; 109(3): 1103 - 1112.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):1914-8.
- Cremer FW, Ehrbrecht E, Kiel K, et al. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Oct;26(8):851-8.
- De Smet C, Lurquin C, Lethé B, et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol.* 1999 Nov;19(11):7327-35.
- Dhodapkar MV, Osman K, Teruya-Feldstein J, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *Cancer Immun.* 2003 Jul 23;3:9.
- Hatina J. Imunologie nádorů- současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky, část I- interakce nádoru a imunitního systému. *Klinická onkologie*, 2005, 18(4):119-125.
- Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer.* 2000 Feb 15;85(4):460-5.
- Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, et al. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):167-74.
- Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest.* 2002;20(2):222-36.
- Lim SH, Bumm K, Chiriva-Internati M, et al. MAGE-C1 (CT7) gene expression in multiple myeloma: relationship to sperm protein 17. *Eur J Haematol.* 2001 Nov-Dec;67(5-6):332-4. No abstract available. Erratum in: *Eur J Haematol.* 2005 Mar;74(3):275.
- Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2000 Sep;85(9):930-4.
- Monte M, Simonatto M, Pêche LY, et al. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25;103(30):11160-5.
- Myiajima Y, Kato K., Nemata S.-I., et al. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyroxine hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995;75:2757-2761.
- Naito H., Kuzumaki N., Uchino J., et al. Detection of tyroxine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription polymerase chain reaction. *Eur. J. Cancer* 1991;27(6):762-765.
- Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 2001 Mar 30;1:1.
- Park JW, Kwon TK, Kim IH, et al. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods.* 2002 Aug 1;266(1-2):79-86.
- Pellat-Deceunynck C, Mellerin MP, Labarrière N, et al. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *European Journal of Immunology.* 2000; 30: 803-809.
- Pellat-Deceunynck C. Tumour-associated antigens in multiple myeloma. *British Journal of hematology.* 2003; 120: 3-9.
- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):615-25.
- Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA, et al. SSX cancer testis antigens are

příklady využití

- expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *J Immunother* (1997). 2005 Nov-Dec;28(6):564-75.
22. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, et al. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1156-64.
23. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 3;254(5038):1643-7. Republished in: *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2617-21.
24. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*. 2005;105:3939-3944.
25. Wang Z, Zhang Y, Liu H, et al. Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):955-60.
26. Zendman AJ, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol*. 2003 Mar;194(3):272-88.

UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA a UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE

srdečně zvou všechny zájemce na mezinárodní

3RD MYELOMA WORKSHOP A 1ST IMMUNOTHERAPY WORKSHOP

které se uskuteční

15.-16. 10. 2008

v Univerzitním kampusu Brno, budova A3, Kamenice 5.

Témata workshopu:

- ❖ *detekce chromozomálních aberací u mnohočetného myelomu*
- ❖ *nejčastěji používané metody separace myelomových buněk*
- ❖ *zamrazování a bankování myelomových vzorků*
- ❖ *nádorová imunoterapie*

Pro více informací pište na: petrovic@med.muni.cz

Prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.
CMG a URC-CMG

Prof. MUDr. Jaroslav Michálek, PhD.
vedoucí UCBI

*Let us inform you that UNIVERSITY RESEARCH CENTER - CZECH MYELOMA GROUP
and UNIVERSITY CELL IMMUNOTHERAPY CENTER at the Masaryk University, Brno,
Czech Republic is organising*

3RD MYELOMA WORKSHOP AND 1ST IMMUNOTHERAPY WORKSHOP

*at the University Campus Brno, building A3, Kamenice 5, on
October 15th and 16th, 2008*

Topics:

- ❖ *detection of chromosomal aberrations in Multiple Myeloma*
- ❖ *frequently used separation methods of the myeloma cells*
- ❖ *cryopreservation and banking of the myeloma cells*
- ❖ *cancer immunotherapy – from bench to bedside*

For more information write to: petrovic@med.muni.cz

Professor Roman Hajek, MD PhD
Chairman of CMG and URC-CMG

Professor Jaroslav Michalek, MD PhD
Chairman of UCIC