

IDENTIFIKACE INDIVIDUÁLNÍCH MYELOM-SPECIFICKÝCH KLONŮ T LYMFOCYTŮ NA ZÁKLADĚ MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY T LYMFOCYTÁRNÍHO RECEPTORU BETA

IDENTIFICATION OF INDIVIDUAL MYELOMA-SPECIFIC T CELL CLONES BY MOLECULAR ANALYSIS OF THE T CELL RECEPTOR BETA

FOLTÁNKOVÁ V.^{1,4}, OČADLÍKOVÁ O.^{1,6}, MATĚJKOVÁ E.^{1,4}, BARTOŠ M.², DENDIS M.², HORVÁTH R.², MICHÁLEK J.^{1,3,5}

¹ UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (UCBI), LF MU, BRNO

² GENEX CZ, S.R.O., BRNO

³ 1. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

⁴ ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

⁵ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, FN BRNO PMDV

⁶ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

Souhrn

Identifikace individuálních myelom-specifických klonů T lymfocytů pomocí molekulárně biologické analýzy T lymfocytárního receptoru beta (TCRB) je dosud nejcitlivější metodou pro sledování protinádorové imunitní odpovědi u mnohočetného myelomu. Tento postup (tzv. klonotypový esej), využívá skutečnosti, že sekvence TCRB je pro jednotlivé klony T lymfocytů vždy zcela jedinečná a je tudíž ideálním znakem pro jejich charakterizaci. Na příkladu pacientů s myelomem jsme ukázali, že imunitní odpověď na nádorový antigen byla oligoklonální, tj. došlo k aktivaci pouze několika imunodominantních klonů T lymfocytů. To potvrzuje předpoklad výskytu omezeného množství antigenů na povrchu myelomových buněk, které jsou schopny stimulovat myelom-specifické T lymfocyty. Detailní studium protinádorové imunitní odpovědi založené na přesné identifikaci individuálních myelom-specifických T lymfocytů a jejich případném sledování *in vivo* nachází využití především v adoptivní imunoterapii jako součásti léčebného postupu u mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, T lymfocyt, T lymfocytární receptor beta, klonotyp, imunomonitoring.

Summary

Identification of individual myeloma-specific T cell clones by molecular analysis of the T cell receptor beta (TCRB) is the most sensitive method for the anti-tumor immune response monitoring not only in multiple myeloma. This novel approach called clonotypic assay is based on the fact, that the TCRB sequence is unique for every T lymphocyte clone and thus can serve as an ideal candidate for the individual T cell clone monitoring. As an example, the immune response against myeloma antigens was tested and demonstrated an oligoclonal myeloma-specific response, ie. only a few immunodominant myeloma-specific T cell clones were activated. This finding corresponds with the assumption of limited antigenicity of myeloma cells. A detailed study of anti-tumor immune response based on exact myeloma-specific T lymphocytes identification and their *in vivo* monitoring can be useful tool for precise and highly sensitive immunomonitoring in adoptive immunotherapy protocols recently used in multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma, T lymphocyte, T cell receptor beta, clonotype, immune monitoring.

Úvod

Identifikace individuálních antigen-specifických klonů T lymfocytů byla donedávna považována za nemožnou. V roce 2003 jsme však ukázali, že detailní molekulární analýza jedinečné sekvence variabilní (V) a hypervariabilní (DJ) oblasti T lymfocytárního receptoru beta (TCR-B-VDJ) ze sortovaných buněk aktivovaných příslušným antigenem tuto identifikaci umožňuje, neboť jednotlivé klony T lymfocytů nesou vždy pouze jednu variantu TCRB (3, 4). Tento publikovaný postup nazýváme klonotypovým esejem. Na příkladu opakovaně specifické stimulace T lymfocytů nádorovým antigenem (apoptotickými

tělísky myelomové linie ARH77), selekci aktivovaných buněk pomocí průtokového cytometru a molekulární analýze TCRB ukazujeme možnosti využití klonotypového eseje jako příklad nové a dosud nejcitlivější diagnostické metody pro sledování, byť i velmi řídké se vyskytujícími antigen-specifických T lymfocytů (3, 5).

Materiál a metody

1.1. Příprava myelom-specifických T lymfocytů

Podrobný postup přípravy myelom-specifických T lymfocytů jsme již publikovali (6). Ve stručnosti: mononukleární buňky (MN) byly po podepsání informovaného souhla-

su izolovány z nesrážlivé periferní krve zdravých dárců z transfúzní stanice ve FN Brno a kultivovány v kompletním médiu. První den kultivace byl přidán antigen – myelomové buňky (MB) linie ARH 77 ozářené dávkou 60 Gy v poměru MN:MB = 20:1, 8. den byly opět přidány MB v poměru MN:MB = 2.1. T lymfocyty aktivované antigenem byly imunomagneticky separovány na základě produkce IFN- γ . Kvantita a čistota pozitivní a negativní frakce T lymfocytů byla hodnocena na průtokovém cytometru. IFN- γ pozitivní T lymfocyty byly expandovány *in vitro* v kompletním médiu obohaceném o interleukin 2.

1.2. Klonotypový esej

1.2.1. Izolace mRNA, reverzní transkripce

Z expandovaných INF- γ pozitivních myelom-reaktivních T lymfocytů byla izolována poly(A) mRNA (QIAGEN Oligotex® Direct mRNA Kit; QIAGEN, Hilden, Německo), která byla technologií 5'-RACE (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit; Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Během reverzní transkripce se díky terminál-transferázové aktivitě reverzní transkriptázy připojuje 3 až 5 nukleotidů (dC) na 3'-konec syntetizované cDNA. Na tento dC-bohatý konec se pak váže oligonukleotid s tzv. kotvou pomocí svého dG terminálního konce. To umožňuje reverzní transkriptáze pokračovat v syntéze cDNA a začlenit na její 3'-konec sekvenci kotvy.

1.2.2. PCR

K amplifikaci cDNA byl použit tzv. anchor primer, jenž nasedá na sekvenci kotvy začleněné během reverzní transkripce, a primer MBCII, jenž je genově specifický pro konstantní (C) oblast TCRB (4). Směs produktů o délce přibližně ~550 bp představuje soubor všech variant TCRB sekvencí exprimovaných v buňkách. PCR produkt byl zviditelněn pomocí gelové elektroforézy (viz Obrázek č. 1). Extrakce produktu z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN, Hilden, Německo).

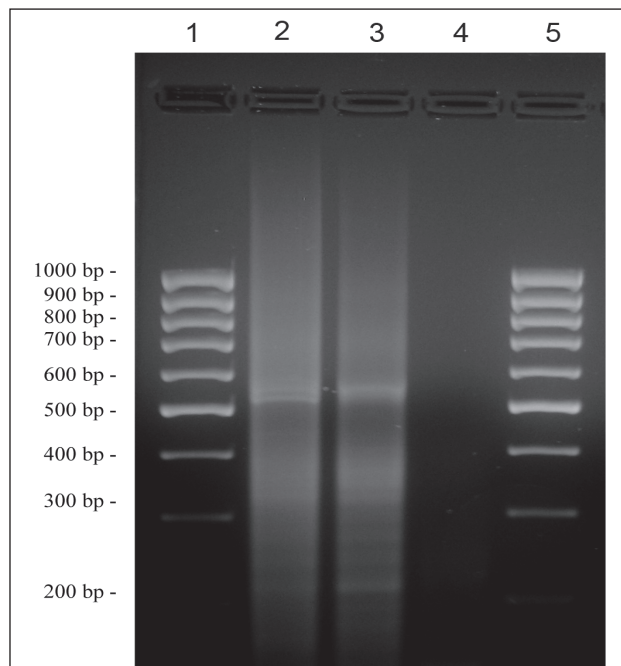
1.2.3. Klonování, sekvenování

Ke klonování PCR produktu do bakterií *E.coli* byl použit TA Cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Kolonie byly vysety na selekční LB agarové médium obsahující IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktosid), Ampicilin a X-gal. Přítomnost inzertu v bakteriálním plazmidu byla ověřena PCR. Z pozitivních kolonií byl izolován plazmid pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu (QIAGEN, Hilden, Německo). Plazmidy byly sekvenovány na přístroji 3130 Genetic Analyzer pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Získané sekvence byly poté vyhodnoceny pomocí veřejně dostupných bioinformatických nástrojů a databází (<http://imgt.cines.fr/> (2) a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Výsledky

Pomocí molekulární analýzy hypervariabilní sekvence TCRB receptoru jsme identifikovali aktivované myelom-specifické klonu T lymfocytů u dvou reprezentativních vzorků pacientů.

Aminokyselinové sekvence TCRB-VDJ a zastoupení individuálních klonů v rámci aktivovaných T lymfocytů jsou uvedeny v Tabulce č.1. Odpověď myelom-specifických klonů T lymfocytů byla v obou případech oligoklonální, tj.



Obrázek č. 1: Gelová elektroforéza PCR produktů obsahujících sekvenci TCRB-VDJ

mRNA izolovaná z aktivovaných myelom-specifických T lymfocytů byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Klíčový úsek cDNA byl amplifikován anchor PCR a PCR produkty o délce 550 bp byly zviditelněny na 2% agarózovém gelu.

Popis drah: 1 a 5 - Velikostní standard; 2 - Pacient 1.; 3 - Pacient 2.; 4 - Negativní kontrola.

Pacient	Klon č.	Četnost klonu	TCRB V region	TCRB D region	TCRB J region	Klonalita TCR
1	1-1	21/55	QEDSAVYLCASSL	RGEGA	EQFFGPGTRLTLVL	Oligoklonální
	1-2	3/55	QRDSAMYRCASS	TRDRGVD	EQFFGPGTRLTLVL	
	1-3	3/55	QGDSAMYLCASS	SFL	EAFFGQGTTRLTVV	
2	2-1	15/54	PRDSAVYFCAS	RER	GYTFGSGTRLTVV	Oligoklonální
	2-2	13/54	LGDSALYLCASSL	ASD	TGELFFGEGSRLTVL	
	2-3	7/54	PEDSALYLCASSQ	DWASGGN	NEQFFGPGTRLTLVL	
	2-4	3/54	RGDSAVYLCASS	TGTGG	STDQYFGPGTRLTVL	

Tabulka č. 1: Aminokyselinová sekvence TCRB receptoru u jednotlivých klonů

Klíčový úsek cDNA hypervariabilní VDJ oblasti TCRB připravené pomocí RT-PCR z T lymfocytů aktivovaných myelom-specifickým antigenem byl amplifikován pomocí PCR. PCR produkty byly naklonovány do bakterií a pro každý PCR produkt bylo sekvenováno více než 50 bakteriálních kolonií. Jednotlivý klon je definován přítomností alespoň dvou identických DNA sekvencí.

Klon č.	TCRB V subgen	TCRB J subgen
1-1	V7	J2-1
1-2	V7	J2-1
1-3	V7	J1-1
2-1	V12	J1-2
2-2	V5	J2-2
2-3	V4	J2-1
2-4	V7	J2-3

Tabulka č.2: Geny TCRB V a TCRB J

Typ subgenů variabilní (V) a spojovací (joint = J) oblasti TCRB klasifikované podle nomenklatury IMGT.

bylo identifikováno pouze několik individuálních imunodominantních klonů T lymfocytů. U prvního pacienta byly pozorovány 3 imunodominantní klonotypy, přičemž jeden se vyskytoval s výrazně nejvyšší frekvencí. U druhého pacienta jsme detekovali 4 imunodominantní klonotypy.

Tabulka č.2 shrnuje klasifikaci TCRB-V a -J subgenů podle nomenklatury IMGT. Nejčastěji zastoupený TCRB-V subgen byl V7, nejčastěji zastoupený TCRB-J subgen byl J2-1.

Diskuze a závěr

Analýza sekvencí hypervariabilní VDJ oblasti TCRB genu prokázala oligoklonalitu u obou aktivovaných myelom-specifických T lymfocytů, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky u pacientů s hematologickými malignitami (3) i u pacientů s melanomem (5). Toto zjištění potvrzuje existenci několika málo vybraných klonů T lymfocytů, které jsou stimulovány myelom-specifickými antigeny. Myelom-specifické klony mohou být dále expandovány *in vitro*, přičemž jejich protinádorový potenciál zůstává zachován.

Znalost jedinečné DNA sekvence TCRB-VDJ u nejfrekvencovanější zastoupených klonů T lymfocytů umožňuje zkonstruovat klonově specifické primery a fluorescenčně značenou DNA sondu. Každý T lymfocyt nese právě

jeden finálně přestavěný genový lokus TCRB-VDJ. Počet detekovaných genových kopií je tedy přímo úměrný počtu individuálních T lymfocytárních klonů ve vzorku, což umožňuje sledovat individuální klony *in vivo* pomocí kvantitativní real-time PCR s citlivostí detekce jedné buňky na 10^6 buněk (3;4).

Identifikace a charakterizace myelom-specifických T lymfocytů má význam především při studiu protinádorové imunitní odpovědi. Jedná se o dosud nejcitlivější metodu detekce individuálních imunodominantních klonů T lymfocytů. Klonotypový esej umožňuje identifikaci jednoho antigen-specifického T lymfocytu mezi 10^6 buněk, a významně tak převyšuje jiné metody dosud používané pro detekci antigen specifických T lymfocytů, jako například využití tetramer nebo metody Elispot, které mají citlivost detekce pouze $1:10^4$ (1).

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434 a IGA 1A/8709-5.

Literatura

1. Bartůňková J, Paulík M et al. Vyšetřovací metody v imunologii. Grada 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1
2. Lefranc MO IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res 2003; 31:307-310.
3. Michálek J, Collins RH, Durrani HP et al. Definitive separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host specific CD4⁺ T cell clones by virtue of their T cell receptor β locus sequences. Proc Natl Acad Sci USA 2003a, 100(3):1180-4.
4. Michálek J, Collins RH, Hill BJ et al. Pre-transplant identification of graft-versus-host specific T-cell clone and quantitative monitoring after allogeneic stem cell transplantation. Lancet 2003b, 361(9364):1183-5.
5. Michálek J, Kocák I, Fait V et al. Detection and long-term *in vivo* monitoring of individual tumor-specific T cell clones in patients with metastatic melanoma. J Immunol. 2007;178(11):6789-95.
6. Očadlíková D, Kovářová L, Penka M et al. Identifikace nádorově-specifických T lymfocytů na základě produkce interferonu gama u mnohočetného myelomu. Klinická onkologie 2005, 18:55-58