

## IDENTIFIKACE INDIVIDUÁLNÍCH AUTOLOGNÍCH KLONŮ MYELOM-REAKTIVNÍCH T LYMFOCYTŮ

## IDENTIFICATION OF INDIVIDUAL AUTOLOGOUS CLONES OF MYELOMA-REACTIVE T LYMPHOCYTES

DUDOVÁ S.<sup>1</sup>, HORÁK R.<sup>1</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>1</sup>, HORVÁTH R.<sup>2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,5</sup>, MICHÁLEK J.<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ  
KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

<sup>2</sup> GENEX CZ, LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY, BRNO

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

<sup>4</sup> I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO

<sup>5</sup> UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY, BRNO

### Souhrn

**Východiska:** Mnohočetný myelom (MM) je hematoonkologické onemocnění způsobené maligní transformací B-lymfocytů, jejich klonální proliferací a akumulací terminálních vývojových stadií - plazmocytů (myelomových buněk). Za optimální léčebný postup je v současné době považována vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací štěpu kostní dřeně, který může navodit kompletní léčebnou odpověď, prodloužit významně přežití, avšak relapsu onemocnění nezabrání. **Typ studie a soubor:** Na základě preklinických i klinických pozorování je zřejmé, že významnou úlohu při prodloužení remise myelomu po autologní transplantaci hrají myelom-reaktivní T lymfocyty. Proto se jako nadějně jeví využití myelom-reaktivních T lymfocytů jako adoptivní buněčné imunoterapie při autologní transplantaci štěpu kostní dřeně. Analýza TCR repertoáru T lymfocytů poskytuje informaci o spektru rozeznávaných antigenů.

**Metody a výsledky:** Po naložení dendritických buněk (DB) apoptickými tělisky nádorových buněk mohou být identifikovány a expandovány potenciální cytotoxické myelom-specifické T lymfocyty. Z aktivovaných lymfocytů byla po izolaci mRNA provedena ukotvující reverzní transkripce modifikovanou verzí SMART metody. Po klonování PCR produktu do plazmidového vektoru a transformaci bakterií byly zjišťovány jedinečné sekvence jednotlivých klonotypů. Byla prokázána oligoklonalita TCRB receptoru u myelom-specifických *in vitro* expandovaných T lymfocytů, v jednom případě se jednalo o monoklonální populaci nádorově specifických T lymfocytů. Tato zjištění svědčí o existenci myelom-specifických antigenů, které stimulují pouze určité autologní T lymfocyty. **Závěry:** Charakterizace T lymfocytárního receptoru (TCR) myelom-specifických klonů představuje novou metodu imunologického sledování účinnosti protinádorové léčby.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, imunoterapie, T buněčný receptor, hypervariabilní oblast, klonotyp

### Summary

**Backgrounds:** Multiple myeloma (MM) is a hematologic disease caused by malignant transformation of B-lymphocytes, their clonal proliferation and accumulation of terminal stages - plasmocytes (myeloma cells). Recently, high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic transplantation has been considered standard treatment for patients with advanced stages of multiple myeloma. Such treatment delays relapse but it is not curative and almost all patients ultimately develop recurrent disease. **Design and Subjects:** Based on preclinical and clinical it is evident that myeloma-reactive T lymphocytes play an important role in extending time of remission after autologous transplantation. Myeloma-reactive T lymphocytes have been shown to be a promising approach in adoptive cellular immunotherapy aside autologous transplantation of bone marrow graft. Analysis of their TCR repertoire gives information on the spectrum of recognized antigens.

**Methods and Results:** Dendritic cells loaded with apoptotic bodies from myeloma cells have been used to stimulate autologous T lymphocytes. Activated myeloma-specific T cells were identified and expanded. After mRNA isolation the anchored reverse transcription using a modified version of the SMART method was done. PCR product was cloned into plasmid vector, transformed in bacterial cells and individual clonotypes were sequenced. Oligoclonality of the TCR receptor was demonstrated in myeloma specific *in vitro* expanded T lymphocytes, in one case a monoclonal population of tumor specific T cells was found. These findings support the of myeloma specific antigens stimulating only certain autologous T lymphocytes. **Conclusions:** Structural characterization of the TCR receptor of myeloma specific clones represents a promising method for immunologic monitoring of cancer treatment.

**Key words:** multiple myeloma, immunotherapy, T cell receptor, hypervariable region, clonotype

## Úvod

Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny. U MM bylo identifikováno několik antigenických molekul, jako například idiotypický protein (Id) (2), MUC-1 (3), mutanti *ras* onkogenní protein (4) nebo další antigeny spojené s nádorem (5, 6). Byly popsány různé formy nádorových antigenů - DNA, RNA, peptidy, proteiny či celé nádorové buňky. Silný imunogenní potenciál byl popsán u dendritických buněk (DB) naložených apoptickými tělísky nádorových buněk. Takto připravené dendritické buňky představují slibný přístup v imunoterapii hematologických onemocnění (7, 8). Touto metodou mohou být identifikovány a expandovány potenciální cytotoxické myelom-specifické T lymfocyty (9). Sledování T buněčného receptoru (TCR) poukazuje na jejich roli v imunitní odpovědi a umožňuje monitorování jednotlivých klonů *in vivo*. Jednotlivé T-buněčné klony mohou být charakterizovány pomocí rozdílů ve variabilní oblasti 3 určující komplementaritu (CDR3) beta řetězce (10, 11). Jedinečnost hypervariabilní části TCR CDR3 oblasti odpovědné za rozeznání komplexů peptid-MHC je dána insercí nebo delecí náhodných (N) nukleotidů ve spojení V $\beta$ -D $\beta$  a D $\beta$ -J $\beta$  segmentů. Funkční analýza interakcí mezi TCR a komplexy peptid/MHC podporuje představu, že sekvence a délka CDR3 oblasti jsou dva základní činitele v rozpoznání peptidů prezentovaných MHC molekulami (12).

V posledních letech se zájem zaměřuje na charakterizaci TCRV $\alpha$  a TCR $\beta$  řetězců, jak u T lymfocytů zdravých dárců, tak i za různých patologických podmínek zahrnujících autoimunitní, nádorové a infekční onemocnění nebo při sledování stavu pacienta po allogenní transplantaci (13-17). Analýza TCR repertoáru T lymfocytární odpovědi poskytuje informaci o spektru rozeznávaných antigenů. Ukazuje, zda lymfocytární odpověď je vyvolána jen několika imunodominantními antigeny nebo širokou paletou nádorových antigenů. Specifičnost vazby peptidu je dána variantami ve struktuře TCR molekuly. V případě imunitní odpovědi proti danému nádorovému antigenu zprostředkované T lymfocyty s omezenou sadou TCRV genů se objevuje možnost monitorování imunoterapeutického účinku či expanze nádorově specifických T lymfocytů. Komplementaritu určující oblast 3 (CDR3) a řetězce T lymfocytárního receptoru je jedinečná a může být použita jako marker jednotlivých klonů T lymfocytů (18-22). Další využití molekulární analýzy přeskupení TCR genu představuje diagnostika patologických proliferací T buněk nebo sledování MRD u lymfoproliferativních onemocnění (23, 24).

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Příprava dendritických buněk

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány metodou gradientové centrifugace (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) od pacientů s MM po podepsání informovaného souhlasu. Buňky byly kultivovány v 6ti-jamkových destičkách v médiu X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s 10% tepelně inaktivovaným lidským AB sérem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 80 U/ml DNAsy (Boehringer Mannheim, Německo) a 2 mM L-glutaminem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 4.5% O<sub>2</sub>. Po 2 hodinách byla neadherentní frakce odstraněna a adherentní podíl bohatý na prekurzory DB byl kultivován v médiu X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s přidáním 100 ng/ml IL-4 (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 800 U/ml GM-CSF (Schering Plough, New Jersey, USA) po dobu 6 dnů při 37 °C. Maturace byla dosažena přidáním 40 ng/ml TNF- $\alpha$  (Bender Medsystems Diagnostics, Vídeň, Rakousko) 6. den. Médium bylo měněno 2x týdně (25, 26). Neadherentní frakce bohatá na T-lymfocyty byla zamrazena a uchovávána při -80°C.

### 2.2. Příprava antigenu a naložení DB

Jako antigen byly použity nádorové buňky izolované od pacientů s MM. Myelomové buňky byly získány z kostní dřeni imunomagnetickou separací pomocí monoklonální protilátky anti-CD138 s použitím přístroje *Vario MACS* (Miltenyi Biotec). Pro získání apoptotických tělísek byly nádorové buňky ozářeny dávkou 60 Gy a ponechány 24 hod v PBS při 37°C. 7. den kultivace byly nezralé DB naloženy antigenem v poměru 1:1.

### 2.3. Stimulace a izolace aktivovaných T-lymfocytů

8. den kultivace DB byly T lymfocyty rozmrazeny a kultivovány v X-VIVO 15 s 10% lidským AB-sérem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 50 mg/l gentamycinu, 2 mM L-glutaminu, 25 mM HEPES pufru (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), a 10 IU/ml IL-2 (Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko) při 37 °C. 9. den kultivace byly naložené DB smíchány s T-lymfocyty v poměru 2:1 (T lymfocyt:DB). 7.den po stimulaci byly T lymfocyty restimulovány rozmraženými naloženými DB v poměru 2:1. Antigenem aktivované T-lymfocyty produkující IFN- $\gamma$  byly izolovány pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) (27). Separace IFN- $\gamma$  frakce byla provedena dvakrát po zvýšení čistoty.

### 2.4. Průtoková cytometrie

Aktivované T-lymfocyty byly inkubovány 20 minut s monoklonálními protilátkami anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD3-PC7 (Immunotech, Marseille, France) a anti-IFN- $\gamma$ -PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Po promytí ledovým PBS byly buňky fixovány v 1% paraformaldehydu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). Buňky byly analyzovány průtokovou cytometrií pomocí přístroje Cytomics<sup>TM</sup> FC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). Jako negativní kontrola byly použity nestimulované T lymfocyty.

### 2.5. Testy cytotoxicity

Expandované T lymfocyty (efektorové buňky) byly barveny 1  $\mu$ M CFSE a inkubovány 7 minut při 37°C, poté bylo přidáno FCS pro zastavení reakce (28). T lymfocyty značené CFSE byly kultivovány s buňkami myelomové linie ARH77 (terčovými buňkami) ve smíšené *in vitro* kultuře v X-VIVO 15 médiu s tepelně inaktivovaným 10% lidským AB sérem při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> s IL-2 v množství 10 IU/ml média, a to v poměrech (efektorové:terčové buňky) 2:1 a 10:1 po dobu 24 hodin. Jako kontrola byly použity IFN-g pozitivní T lymfocyty bez kultivace s nádorovými buňkami. Pro odlišení pozdně apoptotických a nekrotických buněk byly buňky inkubovány s 0,005% 7-aminoaktinomycinu D 20 minut nebo 1 $\mu$ g/ml propidium iodidu s inkubací 5-10 minut při 4-8°C.

### 2.6. Identifikace TCRB CDR3 sekvencí

Pro stanovení sekvence receptoru T-buněčných klonů byl proveden již dříve popsáný klonotypový esej (29). Ve stručnosti: aktivované myelom specifické T lymfocyty byly použity pro extrakci mRNA pomocí kitu Oligotex direct mRNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Ukotvující reverzní transkriptase a PCR byla provedena podle modifikované verze SMART metody s využitím SMART<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Pro získání PCR produktů CDR3 oblasti od 5' konce do začátku TCRBC oblasti byl použit TCRBC 3' primer konstantní oblasti TCRB a ukotvující primer tak, aby byla zachycena studovaná oblast TCRB CDR3. Amplifikovaný produkt byl ligován do pGemT Easy vektoru (Promega, Madison, WI, USA) a použit pro transformaci bakterií *E. coli*. 50 vybraných kolonií bylo amplifikováno pomocí PCR s příslušnými primery a použito pro přímé sekvenování. Klony byly definovány přítomností minimálně dvou identických sekvencí TCRB CDR3.

### 3. Výsledky

Do studie bylo zahrnuto 10 pacientů s MM stadia I-III ve věku 49-67 let (tab. 1). Pacienti byli léčeni 4 cykly standardní léčby VAD (vinkristin, adriamycin, dexamethason), v indikovaných případech byla provedena autologní transplantace kostní dřevě (pacient 1 a 7). Nádorové buňky byly izolovány imunomagnetickou separací z kostní dřevě. Apoptotická tělíška byla připravena jejich ozářením dávkou 60 Gy. DB byly naloženy apoptotickými tělísky v poměru 1:1, použity pro stimulaci T lymfocytů v poměru 20:1 a po týdnu restimulovány v poměru 2:1. 24 hod po restimulaci byla provedena identifikace protinádorových myelom-specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru. Restimulované aktivované myelom-specifické T lymfocyty byly magneticky separovány na přístroji *Vario MACS* pomocí protilátky anti-CD3 a anti-IFN- $\gamma$ . Došlo k obnovení aktivovaných T buněk v pozitivní frakci z 1,3-6,6% (průměr 3,8 %) na 42,0-81,0% (průměr 63,7%) pro CD3<sup>+</sup> (tab.1). Expanze myelom-specifických T lymfocytů pacientů probíhala v rozmezí 0,9 - 6 měsíců s mediánem 1,5 měsíce.

Tabulka č. 1: Pacienti s MM

Pacienti s mnohočetným myelomem					
Pacient číslo	Pohlaví	Věk	Stadium diagnózy	Separace CD3 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>r</sup> TL	
				před mag. separací	po mag. separaci
1	M	64	MM/II	1.3	42
2	M	49	MM/II	3.8	66
3	Ž	56	MM/I	6.2	81
4	M	67	MM/III	2.8	77
5	Ž	60	MM/II	2.2	68
6	Ž	52	MM/III	3.5	75
7	Ž	55	MM/III	2.1	59
8	M	64	MM/II	5.4	74
9	M	62	MM/III	4.1	42
10	M	57	MM/II	6.6	53

Tabulka zachycuje soubor deseti pacientů s MM, jejich pohlaví, věk a stadium onemocnění. Poslední dva sloupce uvádějí hodnoty získané před a po magnetické separaci TL připravených stimulací DB naložených apoptotickými tělísky pomocí protilátek anti-CD3<sup>+</sup> a anti-IFN- $\gamma$ TL.

Tabulka č. 2: Test cytotoxicity a klonalita TCRB receptoru

Test cytotoxicity a klonalita TCRB receptoru			
Pacient číslo	Cytotoxicita CFSE/PI 24h v %		TCRB klonalita
	2:1	10:1	
1	10	25,5	oligoklonální
2	25	59,0	oligoklonální
3	44	60,5	N
4	21	58,5	oligoklonální
5	28	50,0	oligoklonální
6	19	38,5	oligoklonální
7	13	40,0	monoklonální
8	18	43,0	N
9	27	58,0	oligoklonální
10	24	38,0	oligoklonální
negativní kontrola	2	1,6	

Specifita aktivovaných TL byla stanovena pomocí průtokového cytometru a CFSE cytotoxickým testem. Naměřené hodnoty po 24 hod kultivaci TL (efektorové buňky) s autologními myelomovými buňkami pacientů (terčové buňky) udávají procenta usmrcených nádorových buněk aktivovanými TL. Měřeny byly 2 poměry efektorových buněk ku terčovým 2:1 a 10:1. Jako kontrola byly použity IFN- $\gamma$ pozitivní T lymfocyty bez kultivace s nádorovými buňkami. Klonalita TCRB udává výsledky zjištěné analýzou sekvence TCR receptoru (N=nezdařená izolace klonů).

Aktivované T lymfocyty získané stimulací T buněk zdravých dárců autologními myelomovými buňkami byly použity pro testy cytotoxicity. U deseti pacientů byly použity kultivační pomě-

ry (T lymfocyt:myelomová buňka) 2:1 a 10:1, které byly hodnoceny po 24 hodinách kultivace. Procenta cytotoxických buněk schopných usmrcovat terčové buňky pro poměr (T lymfocyt:myelomová buňka) 2:1 byla u jednotlivých pacientů 10,0 - 44,0% (průměr 22,9%) a pro poměr 10:1 26,0 - 61,0% (průměr 47,1%). Výsledky testů cytotoxicity jsou shrnuty v Tab. 2. Jako negativní kontrola byl sledován cytotoxický potenciál IFN- $\gamma$  pozitivních T lymfocytů kultivovaných bez přítomnosti nádorových buněk. Pro poměr (T lymfocyt:myelomová buňka) 2:1 byla zjištěna průměrná cytotoxicita 2,0%, při poměru 10:1 po 24 hodinách inkubace 1,6%.

Molekulární identifikace aktivovaných potenciálně myelom-specifických CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> klonů T lymfocytů byla provedena pomocí analýzy variabilní oblasti beta TCR genu. U 8 z 10 sledovaných pacientů s MM byla stanovena sekvence TCRV, D a J oblastí (tab. 2). U pacientů číslo 3 a 8 nebyla amplifikace dostatečná. Aminokyselinové sekvence byly popsány podle nomenklatury IMGT (mezinárodní databáze ImMunoGenetics, ). Odpovědi myelom specifických klonů T lymfocytů byly převážně oligoklonální. Pacienti 2 a 6 vykazovali čtyři dominantní klonotypy s různou četností exprese, u pacientů č. 1, 9 a 10 byly nalezeny 3 dominantní klonotypy a 2 klonotypy u pacientů č. 4 a 5 (tab. 3). Nejčastěji zastoupený klonotyp byl nalezen u pacienta č. 5 ve frekvenci 26 záchytů z 49 sledovaných klonů, druhý nejčastější byl objeven u pacienta č. 1 s četností 21 výskytů z 55 sledování. U pacienta č. 9 byl potvrzen dominantní klon s největší zachycenou četností 14 klonů ze 47. Pacient č. 7 vykazoval monoklonální odpověď s nejčastějším klonem ve frekvenci 14 klonů ze 46 analyzovaných. Nejčastěji se vyskytující aminokyselinová sekvence TCRBJ oblasti byla TCRBJ2-1, která byla nalezena u 22 sledovaných dominantních klonotypů (tab.4). Podobně u TCRBV regionu bylo zjištěno, že nejčastější klonotypy obsahovaly sekvence ze skupiny V7 s četností 8 klonotypů z 22 zjištěných.

Tabulka č.4: Seznam TCRBV a TCRBJ genů lymfocytárního receptoru

Značení klonu	Číslo TRBJ oblasti	Číslo skupiny TRBV oblasti
1-1	J2-1	V7
1-2	J2-1	V7
1-3	J1-1	V7
2-1	J1-2	V12
2-2	J2-2	V5
2-3	J2-1	V4
2-4	J2-3	V7
3	nedostatečná amplifikace	
4-1	J1-5	V7
4-2	J2-1	V5
5-1	J2-1	V20
5-2	J1-5	V16
6-1	J2-2	V28
6-2	J2-1	V7
6-3	J2-7	V27
6-4	J1-3	V5
7-1	J1-1	V7
8	nedostatečná amplifikace	
9-1	J2-2	V5
9-2	J2-3	V10
9-3	J2-7	V5
10-1	J1-2	V9,13
10-2	J2-1	V12
10-3	J2-2	V7

Seznam TCRBV a TCRBJ genů lymfocytárního receptoru u myelom-specifických TL pacientů s MM. Údaje v tabulce jsou hodnoceny podle nomenklatury IMGT.

### 4. Diskuze

Analýza TCR repertoáru T lymfocytární odpovědi vůči nádorové tkáni podává informaci o spektru rozeznávaných antige-

**Tabulka č.3:** Aminokyselinové sekvence a frekvence TCRBVDJ oblasti

Pacient	Označení klonu	Frekvence klonu	TRBV oblast	TRBD oblast	TRBJ oblast
1	1-1	21/55	QEDSAVYLCASSL	RGEGA	EQFFGPGTRTLTVL
	1-2	3/55	QRDSAMYRCASS	TRDRGVD	EQFFGPGTRTLTVL
	1-3	3/55	QGDSAMYLCASS	SFL	EAFFGQGTRTLTVV
2	2-1	15/54	PRDSAVYFCAS	RER	GYTFGSGTRTLTVV
	2-2	13/54	LGDSALYLCASSL	ASD	TGELFFGEGSRLTVL
	2-3	7/54	PEDSALYLCASSQ	DWASGGN	NEQFFGPGTRTLTVL
	2-4	3/54	RGDSAVYLCASS	TGTGG	STDTQYFGPGTRTLTVL
3	3	nedostatečná amplifikace			
4	4-1	13/44	QRDSAMYRCASS	QA	NQPQHFGDGRLSIL
	4-2	3/44	LGDSALYLCASSL	GGRG	SYNEQFFGPGTRTLTVL
5	5-1	26/49	PEDSSFYICAR	GTSGGYS	SYNEQFFGPGTRTLTVL
	5-2	4/49	LEDSAVYFCAS	RQA	NQPQHFGDGRLSIL
6	6-1	7/54	TNQTSMYLCAS	WGQGA	TGELFFGEGSRLTVL
	6-2	4/54	RGDSAVYLCASS	TGTSG	SYNEQFFGPGTRTLTVL
	6-3	3/54	PNQTSLYFCASS	DRGF	SYEQYFGPGTRTLTVV
	6-4	3/54	LGDSALYLCASSL	GRL	SGNTIYFEGSWLTVV
7	7-1	14/46	QGDSAMYLCASS	RG	EAFFGQGTRTLTVV
8	8	nedostatečná amplifikace			
9	9-1	14/47	LGDSALYLCASS	ADPFGGTY	TGELFFGEGSRLTVL
	9-2	13/47	SSQTSVYFCAIS	ASGL	STDTQYFGPGTRTLTVL
	9-3	9/47	LGDSALYLCASS	GDRG	YEQYFGPGTRTLTVT
10	10-1	8/51	GDSALYFCASS	GR	NYGYTFGSGTRTLTVV
	10-2	6/51	PRDSAVYFCASSL	ALAG	NEQFFGPGTRTLTVL
	10-3	3/51	RGDSAVYLCASSL	RSITNA	GELFFGEGSRLTVL

Aminokyselinové sekvence a frekvence TCRBVDJ oblastí nejčastěji zastoupených klonů u jednotlivých pacientů s MM. Po extrakci mRNA a reverzní transkripci byla cDNA amplifikovaná polymerázovou řetězovou reakcí s primery korespondujícími s ukotvujícím 5' primerem a sekvencí konstantní oblasti T lymfocytárního receptoru beta. Následně byla provedena ligace produktu PCR do plasmidu a transformace bakterií. Dvacet bakteriálních kolonií bylo použito pro přímé sekvencování TCRBVDJ regionu.

nů. V této studii se podařilo *in vitro* identifikovat dominantní myelom-specifické klonu autologních T lymfocytů u pacientů s MM stadia I-III. Jako zdroj DB a T lymfocytů sloužila periferní krev pacientů s MM, myelomové buňky byly izolovány z kostní dřene pacientů. Bylo prokázáno, že dendritické buňky naložené apoptotickými tělísky myelomových buněk jsou schopné vyvolat T lymfocytární odpověď v autologních podmínkách. Po stimulaci T lymfocytů dochází k jejich aktivaci a je možné je separovat pomocí produkce IFN- $\gamma$  v magnetickém poli. Nádorově specifické T lymfocyty lze expandovat *in vitro* a dále je využít v klinické praxi. Specifita expandovaných T buněk byla sledována cytotoxickým testem vůči populaci myelomových buněk linie ARH77. Příprava protinádorové vakcíny pro pacienty maligními onemocněními byla již dříve popsána u různých maligních onemocnění (30, 31).

Analýzou sekvence byla prokázána oligoklonalita TCRB receptoru u myelom-specifických *in vitro* expandovaných T lymfocytů, v jednom případě se jednalo o monoklonální populaci nádorově specifických T lymfocytů. Tato zjištění svědčí o existenci myelom-specifických antigenů, které stimulují pouze určité autologní T lymfocyty. Pozorované výsledky byly v souladu s dřívějšími pozorováními, ve kterých byly zjištěny jak monoklonální, tak i polyklonální odpovědi na vakcinaci nádorovými antigeny. Monoklonální cytotoxická odpověď byla popsána u pacientů s melanomem po částečné rejekci metastáz po podání vakcíny tumor specifického peptidu MAGE-3 (32). Při sledování smíšené lymfocytární kultury s vnášeným peptidem byly pozorovány naopak polyklonální CTL odpovědi (33).

Frekvence jednotlivých TCRBVDJ sekvencí mezi bakteriálními klony jsou přímo úměrné frekvenci těchto sekvencí v původní populaci selekovaných T lymfocytů, protože jsou použity stejné primery pro RT-PCR a sekvencování všech TCRB mRNA. Podobné či dokonce shodné sekvence V, D a J oblastí naznačují přítomnost několika málo imunodominantních klonů, které mohou být sdíleny i mezi jednotlivými

pacienty. (20, 22). Stejný klon autologních nádorově specifických CD8<sup>+</sup> TIL se může hromadit u jednoho pacienta v odlišných metastázách z důvodu migrace a shromažďování cytotoxických protinádorových klonů tumor infiltrujících lymfocytů v různých nádorových lézích (34).

Souvislost mezi frekvencí klonotypů a stadiem onemocnění jednotlivých pacientů nebyla pozorována. I když Raitakari ve své studii uvádí menší četnost expanzí T-lymfocytů u pacientů s MM I stadii, další autoři naopak zmiňují přítomnost expandovaných klonů přednostně u pacientů s méně vyvinutými nádory (14, 35).

Sekvence receptoru myelom specifických T lymfocytů prokázala častější výskyt určitých aminokyselinových sekvencí V a J oblastí, naopak sekvence D oblastí byla různorodá. Tato skutečnost byla popsána i jinými skupinami ve světové literatuře, kdy TCR analýza CTL klonů rozeznávajících identické nádorové peptidové antigeny prokázala častější použití určitých VB subgenů (36, 37), přičemž D subgeny vykazovaly pouze několik nebo žádnou sekvenci homologii (38). Rozdílnost v použití D genových segmentů odráží odlišnou specifitu TCR receptoru a způsob rozeznání antigenu, kdy pouze některé rezidua peptidu jsou nezbytná pro rozeznání cytotoxickými lymfocyty (38, 39). Nicméně závěry studií nejsou jednotné. U pacientů s velkou granulární leukémií (LGL) byly ve většině případů počty TCRBV rodin omezené (40-42), i když několik studií prokázalo náhodnou expresi specifických TCRBV and TCRBJ genů (41, 43, 44).

Klonotypy odvozené od jednotlivých pacientů mohou být použity pro následné *in vivo* monitorování nejvíce dominantních klonů. Již dříve byly u imunodominantních klonů sekvence CDR3 oblasti použity pro přípravu klonotypově specifických primerů (20). Protože každý T lymfocyt obsahuje jeden produktivně přeskupený TCRBVDJ lokus s určitou sekvencí, počet detekovaných kopií genu přímo odpovídá počtu klonů přítomných ve vzorku a může sloužit ke kvantitativnímu sle-

dování průběhu onemocnění a k monitorování individuálních nádorově-specifických T lymfocytů v klinických studiích využívajících adoptivní buněčné imunoterapie (18, 19). Postup identifikace a charakterizace myelom-specifických klonů tak

představuje novou metodu imunologického sledování účinnosti protinádorové léčby.

*Práce byla podporována grantem IGA MZČR IA/8709-5.*

## Literatura

1. Barlogie B., Shaughnessy J., Trikot G. a kol. Treatment of multiple myeloma. *Blood*. 2004; 1: 20-32
2. Idiotype protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. 1999 Oct 8;83 (2): 215-22
3. Noto H., Takahashi T., Makiguchi Y. a kol. Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int Immunol*. 1997; 9:791-798
4. Corradini P., Ladetto M., Voena C. a kol. Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood*. 1993; 15:2708-2713
5. Chiriva-Internati M., Wang Z., Salati E. a kol. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood*. 2002; 100(3):961-5
6. Olds L. J., Chen Y. T. New paths in human cancer serology. 1998. *J Exp Med*. 187:1163-1167
7. Goddard R. V., Prentice A. G., Copplestone J. A. a kol. Generation in vitro of B-cell chronic lymphocytic leukaemia-proliferative and specific HLA class-II-restricted cytotoxic T-cell responses using autologous dendritic cells pulsed with tumour cell lysate. 2001. 126(1):16-28
8. Kokhaei P., Choudhury A., Mahdian R. a kol. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. 2004. 18(11):1810-5
9. Hayashi T., Hideshima T., Akiyama M. a kol. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. 2003. 102(4):1435-42
10. Davis M. M., Bjorkman P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988. 334(6181):395-402
11. Chothia C., Boswell D. R., Lesk A. M. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J*. 1988. 7(12):3745-55
12. Jorgensen J. L., Esser U., Fazekas de St Groth B. a kol. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature*. 1992. 355(6357): 224-30
13. Gorochoff G., Debre P., Leblond V. a kol. Oligoclonal expansion of CD8+ CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. *Blood*. 1994. 83(2):587-95
14. Halapi E., Werner A., Wahlstrom J. a kol. T cell repertoire in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: clonal CD8+ T cell expansions are found preferentially in patients with a low tumor burden. *Eur J Immunol*. 1997. 27(9): 2245-52
15. Holbrook M. R., Tighe P. J., Powell R. J. Restrictions of T cell receptor beta chain repertoire in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1996. 55(9): 627-316
16. Posnett D. N., Sinha R., Kabak S. a kol. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to „benign monoclonal gammopathy“. *J Exp Med*. 1994. 179(2): 609-18
17. Zhong W., Reinherz E. L. In vivo selection of a TCR Vbeta repertoire directed against an immunodominant influenza virus CTL epitope. *Int Immunol*. 2004. 16(11): 1549-59
18. Michálek J., Collins R. H., Hill B. J. a kol. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet*. 2003. 361(9364): 1183-5 a)
19. Michálek J., Collins R. H., Durrani H. P. a kol. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor  $\alpha$  loci sequences. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(3): 1180-1184 b)
20. O'Keefe C. L., Plasilova M., Wlodarski M. a kol. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004. 172(3): 1960-9
21. Plasilova M., Risitano A., Maciejewski J. P. Application of the molecular analysis of the T cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic disease. *Hematol. J*. 2003. 8:173
22. Wlodarski M. W., O'Keefe C., Howe E. C. a kol. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2005. 106(8): 2769-80
23. Bruggemann M., van der Velden V. H., Raff T. a kol. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004. 18(4):709-19
24. van Dongen J. J., Langerak A. W., Bruggemann M. a kol. 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. *Leukemia*. 2003. 17(12):2257-317
25. Büchler T., Hájek R., Bourková L. a kol. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine*. 2003. 21: 877-882
26. Očadlíková D., Kovářová L., Vidláková P. a kol. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny. 2004. 53: 113-116
27. Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H. a kol. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol*. 1999. 29:4053-4059
28. Zahradvá L., Očadlíková D., Kovářová L. a kol. Zavedení a optimalizace neradioaktivního testu cytotoxicity pro imunoterapeutické studie u nádorových onemocnění. XXIX. Brněnské onkologické dny. 2005. 189: 299-302
29. Douek D. C., Betts M. R., Brenchley J. M. a kol. A Novel Approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *The Journal of Immunology*. 2002. 168: 3099-3104
30. Chakraborty N. G., Sporn J. R., Tortora A. F. a kol. Immunization with a tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting cell-based vaccine in melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 1998. 47:58-64
31. Höltl L., Zelle-Rieser C., Sander H. a kol. Immunotherapy of Metastatic Renal Cell Carcinoma with Tumor Lysate-pulsed Autologous Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research*. 2002. 8: 3369-3376
32. Coulie P. G., Karanikas V., Colau D. a kol. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98(18): 10290-5
33. Godelaine D., Carrasco J., Lucas S. a kol. Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. *J Immunol*. 2003. 171(9): 4893-7
34. Hishii M., Andrews D., Boyle L. A. a kol. In vivo accumulation of the same anti-melanoma T cell clone in two different metastatic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94(4): 1378-83
35. Raitakari M., Brown RD, Sze D. et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells. *Br J Haematol*. 2000; 110:203-209
36. Peoples G. E., Davey M. P., Goedegebuure P. S. a kol. T cell receptor V beta 2 and V beta 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Immunol*. 1993. 151(10): 5472-80
37. Sensi M., Traversari C., Radrizzani M. a kol. Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell-receptor variable-region gene usage in HLA-A2-restricted recognition of the melanoma antigen Melan-A/MART-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92(12): 5674-8
38. Romero P., Pannetier C., Herman J. a kol. Multiple specificities in the repertoire of a melanoma patient's cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MAGE-1.A1. *J Exp Med*. 1995. 182(4): 1019-28
39. Hsu B. L., Donermeyer D. L., Allen P. M. TCR recognition of the Hb(64-76)/I-EK determinant: single conservative amino acid changes in the complementarity-determining region 3 dramatically alter antigen fine specificity. *J Immunol*. 1996. 157(6): 2291-8
40. Bowman S. J., Bhavnani M., Geddes G. C. a kol. Large granular lymphocyte expansions in patients with Felty's syndrome: analysis using anti-T cell receptor V beta-specific monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1995. 101: 18-24
41. Kaneko T., Mizoguchi H., Oshimi K. Expression of T-cell receptor VB8 regions in granular lymphocyte-proliferative disorders. *Blood*. 1993. 81: 3482-3483
42. Kasten-Sportes C., Zahnoen S., Steis R. G. a kol. T-cell receptor gene rearrangement in T-cell large granular leukocyte leukemia: preferential V but diverse J usage in one of five patients. *Blood*. 1994. 83: 767-775
43. Davey M. P., Starkebaum G., Loughran T. P. Jr. CD3+ leukemic granular lymphocytes utilize diverse T-cell receptor V beta genes. *Blood*. 1995. 86: 146-150
44. Zambello R., Trentin L., Facco M. a kol. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Res*. 1995. 55: 6140-6145

Došlo: 22. 2. 2006  
Přijato: 27. 3. 2006