

## Moderní diagnostické a prognostické nástroje pro mnohočetný myelom

# klinická onkologie

Supplement 2008 ROČNÍK / VOLUME 21  
Září 2008

VYDÁVÁ / PUBLISHER  
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST  
J. E. PURKYNĚ  
CZECH MEDICAL ASSOCIATION  
J. E. PURKYNĚ  
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ / PUBLISHING HOUSE  
ApS BRNO, spol. s r. o.  
IČO 00543535  
Božetěchova 2  
612 66 Brno  
e-mail: papezova@aps-brno.cz

REDAKCE / EDITORIAL OFFICE  
Masarykův onkologický ústav Brno  
Žlutý kopec č. 7  
656 53 Brno

Sekretář redakce / Journal coordinator  
Brian Fait  
mobil: 775 368 144  
Přijetí příspěvků:  
e-mail: vukfait@gmail.com  
e-mail: fait.brian@gmail.com

Tiskne Moravská typografie, a. s.  
Brno, Moravské náměstí 13  
IČO 15549763

Vychází 6krát ročně / Issued six times a year  
Roční předplatné 180 Kč  
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky  
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR  
MK ČR 5158  
ISSN 0862-495 X (print)  
ISSN 1802-5307 (online)

INTERNET – vstupní adresa:  
<http://www.linkos.cz>  
<http://www.mou.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA  
EXCERPTED IN BIBLIOGRAPHIA  
MEDICA CZECH

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI  
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLEČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK  
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VÝKONNÁ REDAKČNÍ RADA  
MANAGING EDITORS

VEDOUcí REDAKTOR  
EDITOR-IN-CHIEF

REJTHAR ALEŠ

VÝKONNÝ REDAKTOR  
DEPUTY EDITOR

FAIT VUK

REDAKTOŘI  
ASSOCIATE EDITORS

ČOUPEK PETR, Brno  
FORETOVÁ LENKA, Brno  
HÁJEK ROMAN, Brno  
KOCÁK IVO, Brno

SVOBODA MAREK, Brno  
VALÍK DALIBOR, Brno  
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno  
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

REDAKČNÍ RADA  
EDITORIAL BOARD

ADAM ZDENĚK, Brno  
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava  
BARTOŠ JIŘÍ, Liberec  
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno  
CWIERTKA KAREL, Olomouc  
JURGA LUDOVIT, Trnava  
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava  
KLENER PAVEL, Praha  
KOVAŘÍK JAN, Brno

KOZA IVAN, Bratislava  
MAYER JIŘÍ, Brno  
MELICHAR BOHUSLAV, Hr. Králové  
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava  
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno  
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha  
VYZULA ROSTISLAV, Brno  
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice

ČESTNÍ ČLENOVÉ REDAKČNÍ RADY  
EDITORS EMERITI

BILDER JOSEF, Brno  
ECKARDT SANDOR, Budapešť  
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel  
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

MECHL ZDENĚK, Brno  
NĚMEC JAROSLAV, Brno  
PLEŠKO IVAN, Bratislava  
UJHÁZY VILIAM, Bratislava

<b>Úvodní slovo</b> .....	186
<b>Mnohočetný myelom</b> Krejčí M., Adam Z., Hájek R. ....	187
<b>Přehled:</b> <b>Selekce plazmatických buněk</b> Čumová J., Burešová I., Kovářová L., Kyjovská D., Vidláková P., Suská R., Perutka T., Moravcová J., Rycová M., Penka M., Hájek R. ....	190
<b>Příklad:</b> <b>Srovnání selekce plazmatických buněk metodami FACS a MACS</b> Burešová I., Čumová J., Kovářová L., Kyjovská D., Vidláková P., Suská R., Perutka T., Moravcová J., Rycová M., Penka M., Hájek R. ....	195
<b>Genomika</b> <b>Přehled:</b> <b>Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu</b> Kuglík P., Vránová V., Filková H. ....	198
<b>Příklady využití:</b> <b>Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy imunofluorescenčně značených plazmatických buněk u pacientů s MM zařazených ve studii CMG 2002</b> Zemanová Z., Michalová K., Tajtlová J., Pavlišťová L., Oltová A., Filková H., Kuglík P., Němec P., Holzerová M., Balcárková J., Jarošová M., Rabasová J., Hrubá M., Fischlová H., Špička I., Gregora E., Adam Z., Ščudla V., Maisnar V., Schützová M., Králová D., Hájek R. ....	204
<b>Význam cytogenetických změn u relabujících pacientů s mnohočetným myelomem léčených novými typy léků</b> Zaoralová R., Kuglík P., Vránová V., Oltová A., Pour L., Křivanová A., Krejčí M., Adam Z., Hájek R. ....	207
<b>Stanovení hyperdiploidii u mnohočetného myelomu pomocí imunofluorescenčního značení plazmatických buněk a techniky třibarevné interfázni FISH</b> Smetana J., Kuglík P., Grešlíková H., Kupská R., Filková H., Oltová A., Hájek R. ....	210
<b>Detekce nebalancovaných chromosomových změn u pacientů s mnohočetným myelomem pomocí techniky komparativní genomové hybridizace</b> Zaoralová R., Kuglík P., Vránová V., Hájek R. ....	212
<b>Přehled:</b> <b>Princip a význam studia epigenetiky u mnohočetného myelomu</b> Bártová B., Krejčí J., Harničarová A., Hájek R. ....	214
<b>Příklady využití:</b> <b>Příklady výzkumu epigenetických změn u mnohočetného myelomu</b> Krejčí J., Bártová B., Harničarová A., Hájek R. ....	217
<b>Přehled:</b> <b>Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu</b> Dudová S., Hájek R. ....	220
<b>Příklady využití:</b> <b>Význam sledování exprese nádorových testikulárních antigenů u mnohočetného myelomu a monoklonálních gamapatií</b> Nečasová J., Hájek R. ....	223
<b>Využití metody real-time PCR vybraných genů u mnohočetného myelomu</b> Dudová S., Hájek R. ....	227
<b>Přehled:</b> <b>Analýza profilů genové exprese u mnohočetného myelomu a jeho význam v klinické onkologii</b> Šváchová H., Hájek R. ....	230
<b>Příklady využití:</b> <b>Molekulární definice rizika jako nový prognostický nástroj pro mnohočetný myelom</b> Šváchová H., Hájek R. ....	234
<b>Přehled:</b> <b>Použití jedno-nukleotidových polymorfismů u analýzy mnohočetného myelomu</b> Slaný M., Šváchová H., Hájek R. ....	237
<b>Příklady využití:</b> <b>Praktické aplikace jedno-nukleotidových polymorfismů u analýzy mnohočetného myelomu</b> Slaný M., Šváchová H., Hájek R. ....	241
<b>Proteomika</b> <b>Přehled:</b> <b>Proteomická analýza a její využití ve výzkumu mnohočetného myelomu</b> Potáčková A., Čumová J., Hájek R. ....	243

<b>Příklady využití</b>	
<b>Aplikace proteomiky u mnohočetného myelomu</b>	
Potáčová A., Čumová J., Hájek R. ....	247
<b>Flowcytometrie</b>	
<b>Přehled:</b>	
<b>Flowcytometrická analýza plazmatických buněk u mnohočetného myelomu</b>	
Kovářová L., Hájek R. ....	249
<b>Příklady využití:</b>	
<b>Rozlišení nádorových klonálních a fyziologických polyklonálních plazmatických buněk pomocí flowcytometrie</b>	
Kovářová L., Burešová I., Suská R., Perutka T., Penka M., Michálek J., Hájek R. ....	254
<b>Stanovení diagnózy plazmocelulární leukémie v praxi</b>	
Kovářová L., Zahradová L., Kissová J., Pour L., Hájek R. ....	258
<b>Imunologické metody</b>	
<b>Příklady:</b>	
<b>Identifikace individuálních myelom-specifických klonů T lymfocytů na základě molekulární analýzy T lymfocytárního receptoru beta</b>	
Foltánková V., Očadlíková O., Matějková E., Bartoš M., Dendis M., Horváth R., Michálek J. ....	261
<b>Využití detekce cytokinů při přípravě vakcín proti mnohočetnému myelomu</b>	
Jelínek J., Očadlíková D., Hroteková Z., Hájek R., Michálek J. ....	264
<b>Angiogeneze</b>	
<b>Přehled:</b>	
<b>Metody používané v hodnocení angiogeneze a jejich význam u mnohočetného myelomu</b>	
Pour L., Šváchová H., Slaný M., Hájek R. ....	266
<b>Příklady využití:</b>	
<b>Možnost predikce léčebné odpovědi na autologní transplantaci pomocí stanovení vybraných aktivátorů a inhibitorů angiogeneze</b>	
Pour L., Šváchová H., Slaný M., Křen L., Hájek R. ....	270
<b>Stanovení prognózy na základě vyhodnocení angiogeneze z trepanobiopsického vzorku</b>	
Pour L., Šváchová H., Slaný M., Křen L., Hájek R. ....	272
<b>Představení pracoviště URC-CMG</b>	
University Research Center – Czech Myeloma Group - krátký popis vzniku a aktivit. ....	274

<b>Introduction</b> .....	186
<b>Multiple myeloma</b>	
Krejčí M., Adam Z., Hájek R. ....	187
<b>Review:</b>	
<b>Isolation of plasma cells</b>	
Čumová J., Burešová I., Kovářová L., Kyjovská D., Vidláková P., Suská R., Perutka T., Moravcová J., Rycová M., Penka M., Hájek R. ....	190
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Isolation of plasma cells using MACS and FACS – results</b>	
Čumová J., Burešová I., Kovářová L., Kyjovská D., Vidláková P., Suská R., Perutka T., Moravcová J., Rycová M., Penka M., Hájek R. ....	195
<b>Genomics</b>	
<b>Review:</b>	
<b>Role of classical and molecular cytogenetics for diagnosis of multiple myeloma</b>	
Kuglík P., Vránová V., Filková H. ....	198
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Molecular cytogenetic analysis of immunofluorescence-labeled plasma cells of patients with multiple myeloma enrolled in CMG 2002 clinical trial</b>	
Zemanová Z., Michalová K., Tajtlová J., Pavlišťová L., Oltová A., Filková H., Kuglík P., Němec P., Holzerová M., Balcárková J., Jarošová M., Rabasová J., Hrubá M., Fischlová H., Špička I., Gregora E., Adam Z., Ščudla V., Maisnar V., Schützová M., Králová D., Hájek R. ....	204
<b>The impact of cytogenetic abnormalities in relapsed multiple myeloma patients treated with new drugs</b>	
Zaoralová R., Kuglík P., Vránová V., Oltová A., Pour L., Křivanová A., Krejčí M., Adam Z., Hájek R. ....	207
<b>Detection of hyperdiploidy in patients with multiple myeloma using immunofluorescent staining of plasma cells and three-color interphase FISH technique</b>	
Smetana J., Kuglík P., Grešliková H., Kupská R., Filková H., Oltová A., Hájek R. ....	210
<b>Detection of imbalanced chromosomal changes in multiple myeloma patients using comparative genomic hybridization (CGH)</b>	
Zaoralová R., Kuglík P., Vránová V., Hájek R. ....	212
<b>Review:</b>	
<b>Principles of epigenetic studies in multiple myeloma</b>	
Bártová B., Krejčí J., Hamičarová A., Hájek R. ....	214
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Selected epigenetic changes in multiple myeloma</b>	
Krejčí J., Bártová B., Hamičarová A., Hájek R. ....	217
<b>Review:</b>	
<b>Applications of real-time PCR in hematology with special focus on multiple myeloma</b>	
Dudová S., Hájek R. ....	220
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Impact of cancer/testis antigens (CTA) expression in multiple myeloma (MM) and monoclonal gammopathy (MGUS)</b>	
Nečasová J., Hájek R. ....	223
<b>Real-time PCR for quantification of expression of critical genes in multiple myeloma</b>	
Dudová S., Hájek R. ....	227
<b>Review:</b>	
<b>Analyse of gene expression profiles of multiple myeloma and its significance for clinical oncology</b>	
Slaný M., Šváchová H., Hájek R. ....	230
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Molecular definition of risk as a new prognostic tool for multiple myeloma</b>	
Šváchová H., Hájek R. ....	234
<b>Review:</b>	
<b>Use of single nucleotide polymorphisms in multiple myeloma analysis.</b>	
Slaný M., Šváchová H., Hájek R. ....	237
<b>Utilisation example:</b>	
<b>Practical application of single nucleotide polymorphisms in multiple myeloma analysis</b>	
Slaný M., Šváchová H., Hájek R. ....	241

---

## **Proteomics**

### **Review:**

#### **Proteomics and its application in multiple myeloma research**

Potáčková A., Čumová J., Hájek R. . . . . 243

### **Utilisation example:**

#### **Applications of proteomics in multiple myeloma**

Potáčková A., Čumová J., Hájek R. . . . . 247

## **Flow cytometry**

### **Review:**

#### **Flow cytometric analysis of plasma cells in multiple myeloma**

Kovářová L., Burešová I., Suská R., Perutka T., Penka M., Hájek R. . . . . 249

### **Utilisation example:**

#### **Flow cytometric discrimination between neoplastic clonal and physiological polyclonal plasma cells**

Kovářová L., Burešová I., Suská R., Perutka T., Penka M., Hájek R. . . . . 254

#### **Diagnostics of plasma cell leukemia**

Kovářová L., Zahradová L., KISSOVÁ J., Pour L., Hájek R. . . . . 258

## **Immunological methods**

### **Review:**

#### **Identification of individual myeloma-specific T cell clones by molecular analysis of the T cell receptor beta**

Foltánková V., Očadlíková O., Matějková E., Bartoš M., Dendis M., Horváth R., Michálek J. . . . . 261

#### **Role of cytokine quantification in preparation of cellular vaccine against multiple myeloma**

Jelínek J., Očadlíková D., Hroteková Z., Hájek R., Michálek J. . . . . 264

## **Angiogenesis**

### **Review:**

#### **Methods used for evaluation of angiogenesis and their significance for multiple myeloma**

Pour L., Šváchová H., Slaný M., Hájek R. . . . . 266

### **Utilisation example:**

#### **Detection of angiogenesis activators and inhibitors as A predictor of response to therapy with autologous transplantation**

Pour L., Šváchová H., Slaný M., Křen L., Hájek R. . . . . 270

#### **Determination of prognosis based on bone marrow microvascular density**

Pour L., Šváchová H., Slaný M., Křen L., Hájek R. . . . . 272

#### **URC-CMG facility introduction**

University Research Center – Czech Myeloma Group . . . . . 274

---

## EDITORIAL

Milé dámy a vážení panové,

připravili jsme pro vás supplementum časopisu Klinické onkologie. Na současný pokrok se chceme s vámi podívat očima uživatele - klinického pracovníka, jenž se snaží vyznat ve velkém spektru výzkumných metod, které dnes máme k dispozici.

Klinický lékař dnes může mít často oprávněně v hlavě zmatek, neboť je k dispozici velké množství moderních výzkumných metod. Často jsme jen obtížně schopni přiřadit jednotlivým typům vyšetření náležitý a správný význam. Užší propojení klinických týmů s výzkumnými týmy je dobrou cestou jak rychle a efektivně využít nové moderní metody ku prospěchu našich nemocných. Prvním krokem je porozumět významu dostupných metod.

V tomto supplementu se na modelovém příkladu mnohočetného myelomu snažíme ukázat kompletní spektrum výzkumných možností s potencionální klinickou aplikací s upřesněním významu pro stávající či budoucí klinickou praxi. Většinu z popsanych metod používáme v našem novém výzkumném centru „Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina“ (URC-CMG), které je zaměřené na monoklonální gamapatie a především výzkum v oblasti mnohočetného myelomu. Prostřednictvím supplementa Klinické onkologie vám jej můžeme poprvé představit včetně rozsahu výzkumných aktivit.

Začínáme logicky vstupním zpracováním biologického materiálu a jeho tříděním, tedy vstupní přípravou nezbytnou pro následné použití různých metod. Některé z nich využívají znaky na povrchu buněk, některé DNA, RNA či lyzáty pro analýzu proteinů. Každá metodika je nejprve uvedena obecně, následně jsou zdůrazněny specifické problémy při použití u monoklonálních gamapatií a v závěru je zdůrazněn přínos metody stávající a očekávaný v budoucnosti.

Po takovém přehledu je vždy uvedena jedna nebo více konkrétních aplikací právě u mnohočetného myelomu na základě zkušenosti týmu URC-CMG či spolupracujících týmů. V případě, že v dané oblasti nemáme zkušenosti, je použitý příklad z literatury.

Děkuji všem svým spolupracovníkům za přípravu tohoto supplementa. Věřím, že takové zpracování nových moderních diagnostických metod pomůže klinickým lékařům více pochopit význam metod a jejich užitečnost i u jiných nádorových onemocnění.

**Roman Hájek**

## MNOHOČETNÝ MYELOM

### MULTIPLE MYELOMA

KREJČÍ M.<sup>1</sup>, ADAM Z.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO

<sup>2</sup>UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

#### Souhrn

Práce představuje úvod do problematiky mnohočetného myelomu, je zde stručně uvedena definice a incidence mnohočetného myelomu, jeho etiologie a patogeneze, dále diagnostika, terapie a prognóza tohoto onemocnění.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, diagnostika, terapie.

#### Summary

This manuscript is introduction to the topic of multiple myeloma. Definition, incidence, etiology, pathogenesis and principles of diagnostics and treatment of multiple myeloma are described briefly in this work.

**Key words:** multiple myeloma, diagnostics, treatment.

#### Definice a incidence

Mnohočetný myelom (MM) je maligní klonální B-lymfoproliferativní onemocnění, charakterizované v typických případech infiltrací kostní dřeni patologickými plazmocytami, osteolytickými ložisky skeletu a přítomností monoklonálního imunoglobulinu (MIG) v séru a/nebo v moči. MM tvoří zhruba 1% všech nádorových onemocnění, představuje však přes 10% ze všech krevních nádorových onemocnění. V České republice je incidence MM 4/100 000. V Evropě je diagnostikováno více než 40 000 nových případů ročně. Jde o onemocnění, jehož incidence stoupá s věkem. Medián věku při stanovení diagnózy je 65 let (1).

#### Etiologie a patogeneze

Etiologie MM je nejasná. Patogeneze MM je složitý multifaktoriální proces. Série genetických změn v buňce vede k její nádorové transformaci. Je známo, že dochází k rozvoji změn v mikroprostředí kostní dřeni podporujících nádorový růst. Roli může mít i současné omezení funkce imunitního systému (2). Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je prekancerózou MM, z níž se MM během různé dlouhé doby (měsíce až desítky let) může vyvinout. V řadě případů však diagnostikujeme MM „de novo“. Translokace oblasti imunoglobulinových (Ig) genů jsou přítomny u většiny pacientů s MM, translokace oblastí těžkých řetězců jsou popisovány až u 70%, lehkých řetězců u 20%. U pacientů s MM je typická instabilita genomu. Cytogenetická analýza myelomových buněk frekventně prokazuje četné mutace a chromosomální aberace. Při progresi nemoci dochází k nárůstu chromosomálních změn. Některé z translokací jako t(4;14), t(14;16) a další chromosomální aberace (amplifikace chromozomu 1, de-

lece či monosomie chromozomu 13) mají negativní prognostický význam (3). Sekrece některých cytokinů, jako interleukinu-6, inzulinového růstového faktoru 1, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a tumor-nekrotizujícího faktoru, rovněž přímo či nepřímo ovlivňuje nádorový buněčný růst a přežití myelomových buněk (2).

#### Klinický obraz a diagnostika

Stanovení diagnózy mnohočetného myelomu je velmi dobře možné na základě typického morfologického nálezu v kostní dřeni (přítomnost více než 10% klonálních nádorových plazmocytů), průkazu monoklonálního imunoglobulinu v séru (nejčastěji typ IgG nebo IgA) a/nebo v moči (lehké řetězce) a typického postižení skeletu osteolytickými ložisky. Klasický imunofenyp nádorového plazmocytu je CD19<sup>+</sup>56<sup>+</sup>38<sup>+</sup>138<sup>+</sup>. Klinické projevy jsou nespecifické, nejčastější symptomy jsou kostní bolesti, především bolesti páteře, dále projevy oslabené imunity – recidivující a komplikovaně probíhající infekce, dále projevy vyplývající z infiltrace kostní dřeni – únava, slabost, krvácivé projevy. U některých pacientů s MM může být přítomna hyperkalcémie nebo výrazně zhoršené funkce ledvin. Typické bývá kostní postižení, nejčastěji jsou postiženy dlouhé kosti – stehenní a pažní, dále lebka a páteř, kde dochází k závažnému poškození ve formě vícečetných kompresivních fraktur obratlů. Někdy může být příznakem kostního postižení i difúzní osteoporóza. U nemocných s MM bývá zvýšená celková bílkovina v séru, dále zvýšená sedimentace, snížené hodnoty fyziologických imunoglobulinů. V některých případech může mít onemocnění zpočátku asymptomatický průběh a je zjištěno náhodně v rámci celkového vyšetření k objasnění příčiny vysoké sedimentace.



## úvod

Pro stanovení diagnózy MM a určení klinického stádia onemocnění se používají různá klasifikační schémata a systémy. Dosud nejvíce používaný a rozšířený v klinické praxi byl Durieho-Salmonův systém (4). Podle novějších diagnostických kritérií z roku 2003 (5), která jsou uvedena v Tabulce č. 1, je jasně definované rozlišení mezi MGUS, asymptomatickým a symptomatickým mnohočetným myelomem. Pro symptomatický MM je nutná přítomnost klonálních nádorových plazmocytů v kostní dřeni, dále průkaz monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči a dále přítomnost některého z kritérií poškození tkání či orgánů myelomem: hyperkalcémie (C), renální insuficience (R), anémie (A), kostní postižení (B). Tato kritéria jsou označována zkratkou CRAB a jsou blíže specifikována v Tabulce č. 2. Naplnění některého z kritérií CRAB je pro lékaře jasným důvodem pro zahájení léčby.

MGUS	Asymptomatický myelom	Symptomatický myelom
MIG < 30 g/l.	MIG v séru > 30 g/l a/nebo počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni nad 10 %.	Je přítomen monoklonální imunoglobulin v séru a/nebo v moči.
Počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni < 10 %.		V kostní dřeni jsou přítomny klonální plazmocyty anebo biopsií je prokázán plazmocytom.
Není přítomno poškození orgánů či tkání myelomem.	Není přítomno poškození orgánů či tkání myelomem.	Je přítomno poškození orgánů a tkání myelomem, tak je definováno v níže uvedené Tabulce č. 2.
Není zjištěna jiná B-lymfoproliferativní choroba.		V případě infiltrace dřenej plazmocyty bez příkazu monoklonálního imunoglobulinu, ale poškozením tkání a orgánů myelomem se jedná o nesekreční myelom.

Tabulka č. 1: Kritéria monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), asymptomatického a symptomatického myelomu (International Myeloma Working Group, 2003)

Kritérium	Podrobnější definice
Hyperkalcémie (C)	Kalcium > 2,75 mmol/l, nebo o 0,25 nad normální limit.
Renální insuficience (R)	Kreatinin > 176 µmol/l.
Anémie (A)	Hemoglobin < 100 g/l, nebo 20 g/l pod dolní limit.
Kostní změny (B)	Lytická kostní ložiska, nebo osteoporóza s kompresivními frakturami.
Další s myelomem a gamapatií související nálezy	Symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se bakteriální infekce (> 2 epizody za 12 měsíců).

Tabulka č. 2: Kritéria poškození orgánů či tkání myelomem (International Myeloma Working Group, 2003)

### Léčba

Mnohočetný myelom patří i v současné době k nevyléčitelným onemocněním. Léčba je indikována u pacientů se symptomatickým MM s přítomností některého z kritérií CRAB. Pokud je nemoc citlivá na léčbu, je obvykle dosaženo remise, jejíž délka je variabilní, pak většinou následují opakované relapsy či progresse onemocnění, které reagují na terapii stále méně ochotně. V léčbě MM je používána především kombinovaná chemoterapie. Důležitou roli hraje rovněž autologní transplantace krvetvorných buněk (její provedení je indikováno u symptomatických pacientů s MM bez přítomnosti jiného závažného onemocnění do 65 let věku v rámci první léčebné linie). Radio-terapie má význam především paliativní a velmi důležitá je podpůrná léčba – analgetika, bisfosfonáty. U některých pacientů MM dochází ke vzniku patologických fraktur, dále může dojít k útlaku míchy při kompresivní fraktuře

obratle s propagací kostních úlomků do páteřního kanálu. V takovém případě je nutný ortopedický operační výkon. Od devadesátých letech 20. století bylo prokázáno několika randomizovanými klinickými studiemi, že vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologní transplantace hematopoetických buněk u nemocných s MM významně zvyšuje počet kompletních remisí a prodlužuje průměrné přežití ve srovnání se standardní chemoterapií (6-8). Nemocní s MM léčení konvenční chemoterapií mají medián přežití kolem 4 let, pacienti léčení autologní transplantací mají medián přežití 5-6 let. Nejedná se o kurativní léčebný postup, neboť u většiny nemocných dochází k relapsu onemocnění. Tato léčebná možnost však nabízí více než 20% pacientů s MM přežití delší než 10 let (9).

V posledních letech pronikly do klinické praxe v hematologii některé nové léky. Mechanismus účinku těchto léků je odlišný od mechanismu účinku aplikace klasických cytostatik. Na rozdíl od cytostatik je cílená terapie (target therapy) zaměřena na molekuly či procesy typické pro nádorové buňky a tím vzniká nová generace léčiv, jejímž cílem je zasažení nádorové buňky na úrovni regulačních a signálních proteinů. Tím se zvyšuje efekt terapie a snižuje se riziko vzniku závažných nežádoucích účinků. V terapii MM jsou využívány především tyto tři nové léky: thalidomid, jeho derivát lenalidomid a dále bortezomib. Tyto preparáty jsou podávány většinou v kombinaci s kortikoidem a případně i s alkylačním cytostatikem (melfalan, cyklofosfamid), což vede k zvýšení účinnosti. Klinické studie jednoznačně prokázaly účinnost thalidomidu, lenalidomidu a bortezomibu v léčbě relapsu či progresse MM. V současné době jsou tyto nové léky testovány a optimalizovány v rámci terapie první linie u pacientů s nově diagnostikovaným MM. Pro kombinované režimy s thalidomidem je přínos v primoléčbě nemocných, kteří nemohou postoupit autologní transplantaci prokázán třemi randomizovanými studiemi (10, 11, 12) a podobně byla úspěšná jedna randomizovaná studie u bortezomibu (13). U lenalidomidu studie probíhají a myelomová centra v České republice se jí rovněž účastní. Pro zařazení nových léků do léčebných režimů je společné a typické zvýšení počtu celkových léčebných odpovědí s vysokým podílem kompletní remisí a následné prodloužení doby do relapsu a celkového přežití. Je pravděpodobné, že rozšíření nových léků v primoléčbě dále zlepší celkové výsledky léčby.

### Prognóza

Průměrná délka života neléčených pacientů je 14 měsíců, medián přežití při standardní léčbě je 3-4 roky od stanovení diagnózy, při transplantační léčbě 6-7 let. Průběh onemocnění je velmi variabilní, někteří nemocní žijí jen několik měsíců, jiní naproti tomu 10 a více let. U MM existuje celá řada prognostických faktorů, jako prognosticky příznivé faktory jsou uváděny například tyto: nižší věk, typ paraproteinu IgG, nepřítomnost renální insuficience, dosažení kompletní remise, normální karyotyp či přítomnost hyperdiploidity, nepřítomnost zbytkového nádorového onemocnění. Kombinace hodnot beta<sub>2</sub> mikroglobulinu a albuminu tvoří základ tzv. mezinárodního stážovacího systému (ISS) dle Greippa (14), pacienti s MM jsou dle hodnoty ISS rozděleni do 3 klinických stádií, kte-



rá se významně liší v délce přežití, nejdelší přežití mají pacienti ve stádiu I (medián 62 měsíců), nejkratší ve stádiu III (medián 29 měsíců). Tato data jsou však platná pro konvenční léčbu a transplantaci. Jeho platnost v éře nových léků musí být teprve ověřena.

Rozhodující pro přežití se zdá zařazení autologní transplantace do léčebných strategií v devadesátých letech minulého století a následně nových léků výše uvedených v novém tisíciletí. Přínos autologní transplantace pro skupinu nemocných pod 60 let je již znám. Například podle dlouhodobého sledování klinické studie Total Therapy I v Arkansasu žije při mediánu sledování 12 let stále 27% (62/231) zařazených nemocných, z nichž žije 31 stále bez relapsu a 51% (16/31) z nich je v kompletní remisi. Srovnatelné a důležité údaje pro 10-ti leté přežití jsou: doba do relapsu – 15% nemocných, celkové přežití 33% (9). Tyto mimořádně optimistické výsledky můžeme částečně potvrdit. V brněnském centru používáme autologní transplantaci od roku 1996. S mediánem sledování 141 nemocných 8,4 roku po provedené autologní transplantaci v období 1996-2002 žije doposud 42% nemocných (60/141) a 23% (27/141) nemocných žije bez relapsu onemocnění. V souboru je celkem 26% (35/134) nemocných, kteří dosáhli kompletní remise. Medián celkového přežití pro celý soubor je 72,6 měsíce a bude se dále zlepšovat. Jako nejvýznamnější faktor pro dlouhodobé přežití bez relapsu MM jsme potvrdili dosažení kompletní remise po transplantaci ( $p < 0,001$ ) (15). Je zcela zřejmé, že 10-leté přežití nemocných se při použití autologní transplantace zásadně zlepšilo oproti kon-

venční léčbě (5%) a dosáhne u nemocných mladších 65 let nejméně 20%. Dále pak bude v budoucnu zřejmě ještě umocněno použitím režimů s novými léky a optimalizací léčby. Zdá se, že je reálné očekávat díky mimořádně účinným kombinacím dlouhodobé přežití 30-40% nemocných.

### Závěr

V úvodním článku k suplementu věnovanému představení diagnózy mnohočetný myelom je nastíněna velmi stručně především problematika diagnostiky a léčby terapie MM. Diagnostická kritéria pro MM, vyšetření nutná ke stanovení diagnózy MM a terapeutická doporučení u MM byla opakovaně podrobně publikována v naší i zahraniční literatuře, zde lze najít další podrobnosti (1, 16, 17). Prognóza nemocných s MM se díky zavedení autologní transplantace a nových léků neuvěřitelně a zásadně změnila. Rozdíl mezi šancí na dlouhodobé přežití v devadesátých letech a nyní (5% vs. 30-40%) je neuvěřitelným klinickým pokrokem. Bylo ho dosaženo díky intenzivnímu výzkumu na poli mnohočetného myelomu. Přínos vědecko-výzkumného poznání s následnou rychlou aplikací v reálné praxi je v případě mnohočetného myelomu ukázkový. O to více důrazu musí být věnováno rozvoji klinicky aplikovaného výzkumu. Proto je mu i věnované suplementum časopisu *Klinické onkologie*, jehož úvodem má toto sdělení čest být.

### Poděkování:

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA NR 9317-3 a IGA NR 9225-3.

### Literatura

- Adam Z, Bačovský J, Flochová E et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekci České hematologické společnosti a experty Slovenské republiky pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes* 2005; 1: Suppl. 1, 3-51.
- Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. High dose therapy in multiple myeloma: final analysis of prospective randomized study of the Intergroup Francais du Myelome (IFM 90). *N Eng J Med* 1996; 335:91-97.
- Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH et al. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 1997; 89:789-793.
- Child JA, Morgan GJ, Davies FE et al. High-dose chemotherapy with haematopoietic stem cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:1875-1883.
- Barlogie B, Tricot GJ, van Rhee F et al. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006; 135:158-164.
- Barosi G, Boccadoro M, Cavo M et al. Management of multiple myeloma and related-disorders: guidelines from the Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2004; 89:717-741.
- Bergsagel PL. Epidemiology, etiology and molecular pathogenesis. In: Richardson PG, Anderson KC. *Multiple myeloma*. London, Remedia Publishing, 2004; p. 1-24.
- Durie B, Salmon S.: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975; 36:842-852.
- Facon T, Mary JY, Hulin C et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007; 370:1209-1218.
- Fonseca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biological implications of recurrent genomic aberrations in multiple myeloma. *Blood* 2003; 101:4569-4575.
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23:3412-3420.
- International Myeloma Working Group: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121:749-757.
- Krejci M, Hajek R, Adam Z et al. Significant improvement of long-term survival after autologous transplantation in multiple myeloma patients: a single centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: Suppl. 1, Abstract R1358.
- Palumbo A, Bringhen S, Caravita T et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367:825-831.
- Rajkumar SV, Blood E, Vesole D et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 431-436.
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva N et al. MMY-3002: a phase 3 study comparing bortezomib-melphalan-prednisone (VMP) with melphalan-prednisone (MP) in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: Abstract 76.
- Smith A, Wisloff F, Samson D et al. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2006; 132: 410-451.

## SELEKCE PLAZMATICKÝCH BUNĚK

### ISOLATION OF PLASMA CELLS

ČUMOVÁ J.<sup>1,2</sup>, BUREŠOVÁ I.<sup>1,2</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>2</sup>, KYJOVSKÁ D.<sup>1,2</sup>, VIDLÁKOVÁ P.<sup>1,2</sup>, SUSKÁ R.<sup>2</sup>, PERUTKA T.<sup>1</sup>, MORAVCOVÁ J.<sup>1</sup>, RYCOVÁ M.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V našich laboratořích jsou plazmatické buňky (PB) ze vzorků aspiračních biopsií kostních dření pacientů nemocných mnohočetným myelomem (MM) separovány magneticky aktivovanou separací buněk (MACS) a/nebo fluorescenčně aktivovanou separací buněk (FACS). Pro selekce se používají protilátky CD138 MACS MicroBeads nebo fluorescenčně značené, které jsou namířeny proti povrchovému antigenu CD138 plazmatických buněk, známému jako syndecan-1. Izolované PB jsou využity pro molekulárně biologické studie k PCR analýze, ke komparativní genomické hybridizaci (CGH), fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), k proteinovým analýzám nebo k analýzám povrchových buněčných markerů či intracelulárních antigenů.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, Separace, MACS, FACS, CD138

#### Summary

We have used magnetic-activated cell sorting (MACS) and/or fluorescence-activated cell sorting (FACS) for the separation of plasma cells (PC) from bone marrow aspirates from patients with multiple myeloma (MM) using human antibodies CD138 MACS MicroBeads or CD138-PE antibodies that recognize the plasma cell surface antigen CD138 (syndecan-1). Isolated PC can be used for molecular biology studies of MM such as PCR analysis, comparative genomic hybridization (CGH), fluorescence in situ hybridization (FISH), protein analysis, analysis of cell surface markers, and/or intracellular antigens.

**Keywords:** Multiple myeloma, Separation, MACS, FACS, CD138

#### Úvod

Ve světě bylo v posledních několika desetiletích vyvinuto mnoho principů separačních metod, kterými je možné získat vysoce čisté populace plazmatických buněk (PB) separovaných ze vzorků kostní dřeni (KD) a periferní krve (PK) pacientů nemocných mnohočetným myelomem (MM). Nejčastěji se využívá mikrofluidních separačních technik (9), které umožňují selekci buněk na principu imunologické reakce povrchového markeru cílové (přístup pozitivní selekce) nebo nežádoucí (depleční přístup, negativní selekce) buňky s monoklonální protilátkou, která může být fluorescenčně značená nebo konjugovaná s magnetickou mikro/nano částicí. Separace plazmatických buněk je prováděna 1) v magnetickém poli v separační koloně (technologie MACS<sup>®</sup>, <http://www.miltenyibiotec.com/>, Dynal<sup>®</sup>, <http://www.invitrogen.com/>, StemSep<sup>®</sup>, <http://www.stemcell.com/>) nebo ve zkumavce (technologie EasySep<sup>®</sup>, <http://www.stemcell.com/>) 2) imunodenzitní centrifugací (např. technologie RosetteSep<sup>®</sup>, <http://www.stemcell.com/>). Na našich pracovištích URC-CMG a OKH-LEHABI využíváme pro separaci plazmatických buněk metody MACS (magnetic-activated cell sorting, magneticky aktivovaná separace buněk) a/nebo FACS (fluorescence-activated cell sorting, fluorescenčně akti-

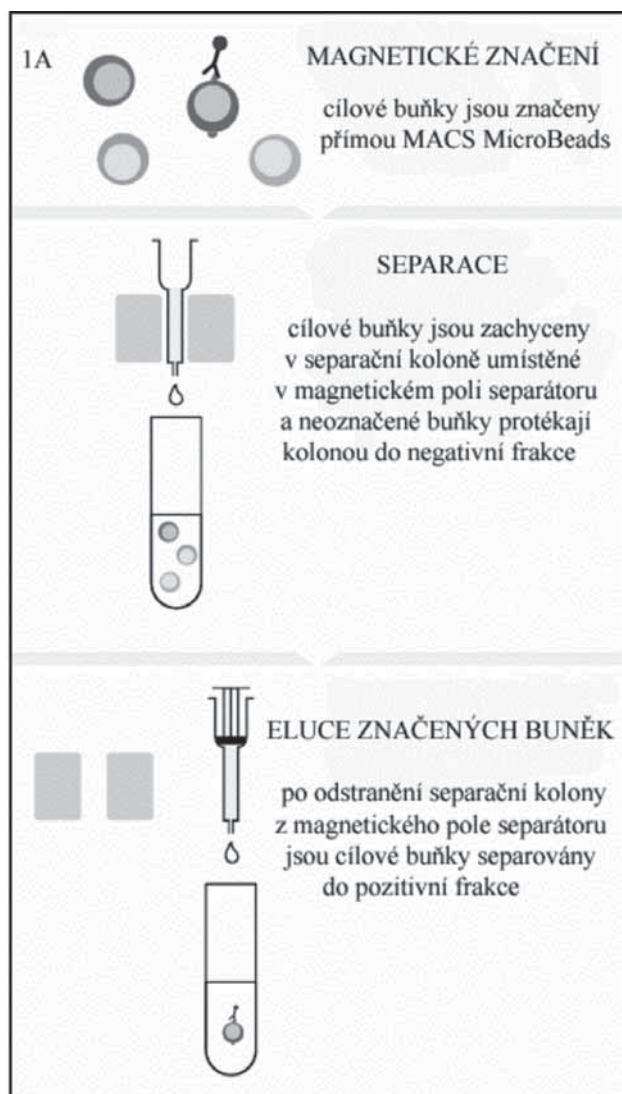
vovaná separace buněk), jejichž principy jsou detailně popsány níže.

#### Principy separačních metod

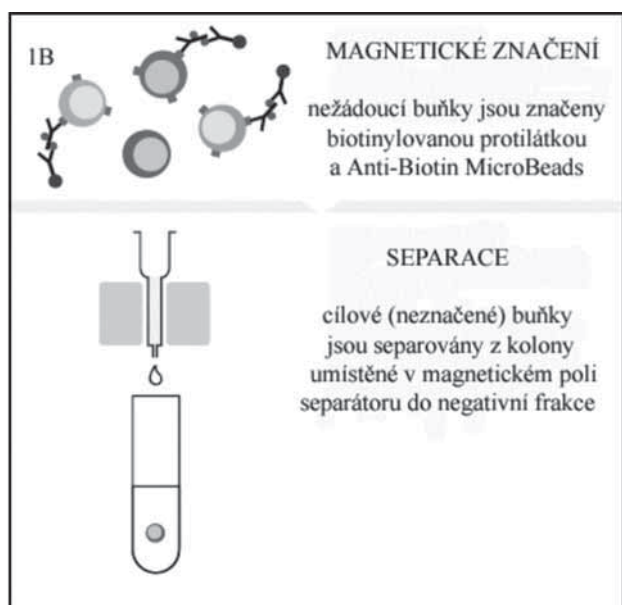
*MACS (magnetic-activated cell sorting, magneticky aktivovaná separace buněk)*

Metoda MACS (firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (10) je založena na imunomagnetickém značení cílových buněk podle jejich povrchových antigenů monoklonální protilátkou, která je konjugována se superparamagnetickou partikulí (MACS MicroBeads). Firma Miltenyi do současné doby vyvinula několik separátorů MACS (např. MiniMACS, VarioMACS, SuperMACS, autoMACS<sup>™</sup>), které mohou být využity pro 2 základní typy separačních strategií. Pokud pro separaci cílové buňky existuje přímá monoklonální protilátka konjugovaná se superparamagnetickou partikulí (MicroBeads), volíme separační přístup **pozitivní selekce**. Cílové buňky, které jsou magneticky značeny přímou MACS MicroBeads, jsou zachyceny v separační koloně, která je umístěna v magnetickém poli separátoru. Neoznačené buňky protékají separační kolonou do negativní frakce a po odstranění separační kolony z magnetického pole jsou cílové buňky pak separovány do pozitivní frakce (Obrázek č.1A).

## přehled



**Obrázek č. 1:** Separační přístup (A) pozitivní selekce (B) deplece nežádoucích buněk. Převzato a upraveno od výrobce technologie MACS®.



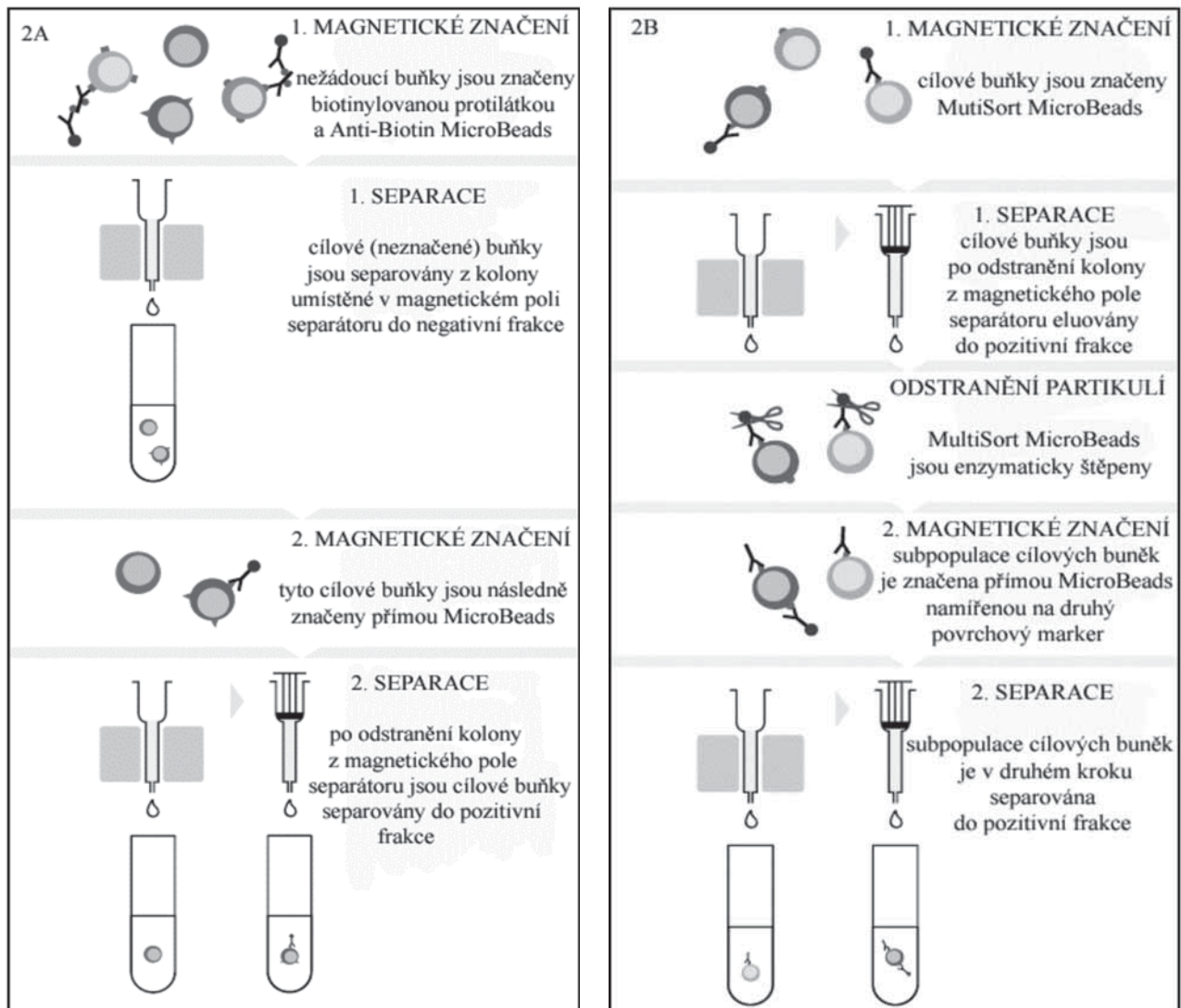
Pokud nejsou dostupné přímé MicroBeads pro cílové buňky, volíme **depleční přístup**, kdy jsou nežádoucí buňky magneticky označeny primární protilátkou (biotinylovanou, fluorescenčně-značenou aj.). Ve druhém kroku jsou nežádoucí buňky magneticky značeny sekundární polyklonální protilátkou namířenu proti primární protilátce (např. Anti-Immunoglobulin, Anti-Biotin, Streptavidin nebo Anti-Fluorochrom MicroBeads). Označené (nežádoucí buňky) jsou zachyceny v koloně a jsou odděleny od neoznačených (cílových buněk), které procházejí kolonou do negativní frakce. Po odstranění kolony z magnetického pole separátoru jsou značené buňky separovány do pozitivní frakce (Obrázek č.1B). Je také možné využít kombinace těchto dvou separačních přístupů pro získání vysoce čisté populace vzácně zastoupených buněk, kdy jsou v prvním kroku odstraněny z buněčné suspenze nežádoucí buňky a následnou pozitivní selekcí je získána populace vysoce čistých cílových buněk (Obrázek č. 2A). Firma také vyvinula separační strategii, kterou nazvala **MultiSort strategií**. Tento přístup je vhodný pro separaci cílových buněk, které mají na svém povrchu několik CD antigenů a vůči kterým je možné využít dostupné přímé MicroBeads. Tímto přístupem je možné získat různé subpopulace cílových buněk. V prvním separačním kroku jsou cílové buňky, které nás zajímají, magneticky značeny MultiSort MicroBeads a po odstranění magnetického pole jsou separovány do pozitivní frakce. Inkubací s MultiSort Release Reagenzií jsou z buněk enzymaticky odstraněny mikropartikelky a v druhém separačním kroku je subpopulace cílových buněk magneticky značena přímou MicroBeads namířenu proti jinému povrchovému markeru na cílové buňce (Obrázek č.2B).

*FACS (fluorescence-activated cell sorting, fluorescenčně aktivovaná separace buněk)*

Buněčné sortery jsou zařízení, ve kterých na část odpovídající průtokovému cytometru navazuje část umožňující třídění buněk. Stejně jako každý průtokový cytometr pracují pouze s buněčnými suspenzemi a k identifikaci buněk využívají značení monoklonálními protilátkami konjugovanými s různými fluorochromy, tedy látkami, které po ozáření laserovým světlem emitují světlo určité vlnové délky (6). Zahrnují vždy systém vedení kapalin, který buněčnou suspenzi soustřeďuje do úzkého proudu obaleného proudem nosné kapaliny (tzv. hydrodynamická fokuzace) – v této formě jsou buňky „jedna po druhé“ vystavovány světelnému paprsku z laseru (v tzv. interrogation point), který excituje fluorochromy na navázaných protilátkách. Světlo emitované fluorochromem pak slouží jako signál k aktivaci sortovacího mechanismu. Základním principem elektrostatického sorteru je rozechvění (pomocí piezoelektrického krystalu) proudu nosné kapaliny s proudem vzorku, které vede k rozdělení proudu na malé kapičky. Těm může být v okamžiku oddělení od souvislého proudu udělen elektrický náboj a nabitě kapičky pak mohou být v elektrickém poli, tvořeném dvěma bočními elektrodami, vychýleny z původní dráhy směrem k těmto elektrodám. Tyto přístroje pracují s časovým intervalem (tzv. time delay - v řádu mikrose-



## přehled



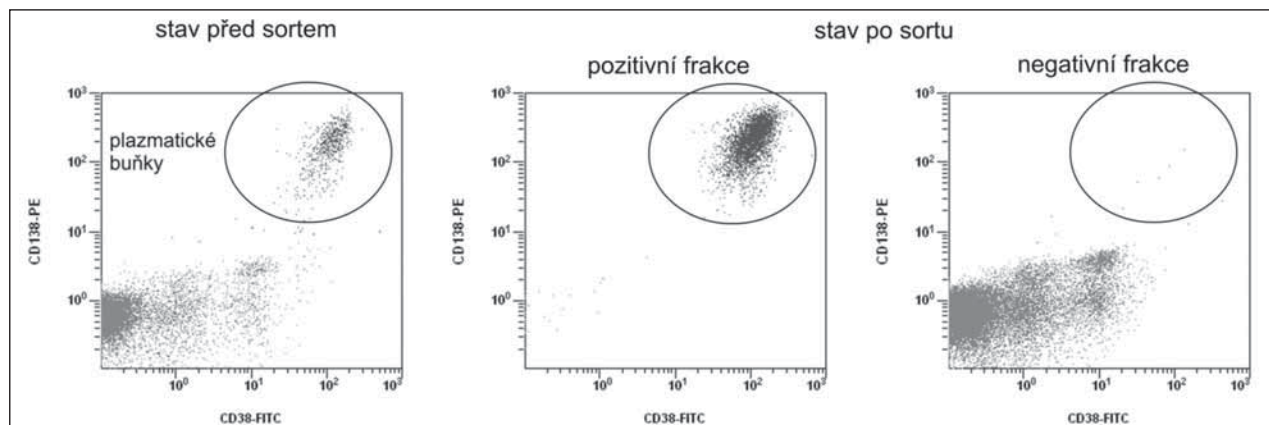
**Obrázek č. 2:** Separační přístup (A) kombinace deplece a následné pozitivní selekce (B) MultiSort strategie. Převzato a upraveno od výrobce technologie MACS®.

kund), který uplyne, než se buňka dostane z místa ozáření laserem (z interrogation point) na konec souvislého proudu nosné kapaliny. Pokud byla detekována jako cílová buňka, dojde těsně před oddělením kapičky s touto buňkou k nabití proudu nosné kapaliny, nabitá kapička je vychýlena k příslušné elektrodě a nasměrována do připravené sběrné nádoby. V okamžiku oddělení kapičky se souvislý proud kapaliny vybije a celý systém je připraven k novému cyklu nabití a vybití.

Na našem pracovišti máme možnost pracovat s vysokorychlostním průtokovým sorterem buněk FACSAria firmy BD Biosciences. Jde o sorter využívající elektrostatický princip sortování; proti jiným podobným zařízením má několik zajímavých inovací. Vzorek prochází speciálně navrženou průtokovou komorou, která minimalizuje světelné ztráty při průchodu světelným rozhraním a zajišťuje tak velkou citlivost měření i při použití laserů s nižším výkonem a vyšší životností nevyžadujících přídatná chladicí zařízení. K detektorům je světlo přiváděno optickými kabely, takže jsou minimalizovány jeho

ztráty, ke kterým může docházet při průchodu klasickou optickou lavicí. Speciální design cesty vzorku zajišťuje, že vzorek prochází průtokovou komorou relativně pomalu, což zajišťuje dostatečně dlouhý osvit laserem; pak se dostává do úzké trysky, tzv. nozzle, kde dojde k urychlení proudu nosné tekutiny a zároveň jeho rozechvění a následně roztrhání na jednotlivé kapičky. Sorter je také vybaven systémem vedení kapalin zajišťujícím velmi stabilní rychlost průtoku, která je naprosto zásadní pro stálý time delay (viz výše) a dále velmi přesným a vysoce lineárním systémem sběru a zpracování dat na digitální bázi. Umožňuje třídění jedné až čtyř různých populací, a to do zkumavek různých velikostí, do mikrotitračních destiček nebo přímo na sklíčka. Po speciální přípravě lze provádět třídění za aseptických podmínek – pokud je zájem vytríděné buňky dále kultivovat. FACSAria je v současnosti osazena dvěma lasery a umožňuje analyzovat najednou až devět parametrů (2 optické a 7 fluorescenčních). Tuto konfiguraci lze do budoucna rozšířit na 3 lasery a 11 parametrů.

## přehled



Obrázek č. 3: Obrázek KD v průtokovém cytometru před a po třídění buněk s vyznačenou populací plazmatických buněk (CD138+ CD38+).

### Specifická nastavení u MM

Separace PB z mononukleárních buněk kostní dřeně či periferní krve pacientů je nejčastěji prováděna pomocí komerčně dostupné monoklonální protilátky CD138 (11), která je namířena proti povrchovému antigenu CD138 (syndecanu-1). Jde o membránový glykoprotein bohatý na heparan sulfát – proteoglykany. Syndecany se obecně účastní interakcí s proteiny extracelulární matrix, s rozpustnými proteiny typu cytokinů a s povrchově vázanými molekulami. Expresí syndecanu-1 byla popsána na normálních i nádorových plazmatických buňkách KD a PK pacientů s mnohočetným myelomem, ale také na neuronových a endoteliálních buňkách (1,2). Plazmatické buňky, které vstupují do apoptózy, pak antigen CD138 ztrácejí (8). Diferenciace B buněk na plazmatické buňky je také provázána ztrátou exprese CD45 antigenu. Této ztráty exprese lze využít při separacích plazmatických buněk v dvoukrokové proceduře v kombinaci deplece CD45+ buněk s pozitivní selekcí CD138+ buněk frakce CD45- (4). Nejčastěji se však využívá jednokrokové procedury pozitivní selekce plazmatických buněk označených přímou protilátkou CD138-PE či CD138 MACS MicroBeads. Před vlastní separací PB je nutné provést izolaci mononukleárních buněk. Kostní dřeň (20-60 ml) pacienta je odebrána do heparinu a ihned smíchána s transportním médiem v poměru 1:1 obsahujícím IMDM médium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma No: I-2510) s DNázou o koncentraci 0,1 mg/ml (Roche, No.1 284 932). Mononukleární buňky kostní dřeně jsou získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque – 1077 (Sigma, No:H-8809), centrifugace 400g, 35 min, 4 °C. Po dvojnásobném promytí mononukleárních

buněk v PBS pufru obsahujícím 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min, 4°C) je provedeno vlastní značení PB podle standardních protokolů separace buněk pomocí MACS nebo FACS metody. Na Obrázku č.3 je příklad obrázků KD v průtokovém cytometru před a po třídění s vyznačenou populací plazmatických buněk CD138+ CD38+.

### Specifické problémy u MM

Pro veškeré výzkumné analýzy v oblasti MM, které na našem pracovišti provádíme, je nutné získat separacemi dostatečný počet PB o velmi vysoké čistotě. Čistota buněk je při separaci metodou MACS vždy závislá na vstupní infiltraci patologických buněk v odebraném vzorku KD. Proto je nutné pro každou MACS separaci zvolit vhodný separační program. Přístroj autoMACS™ má přednastavených 9 separačních programů v závislosti na separační strategii, frekvenci cílových buněk a expresi cílového antigenu. Pro selekci málo zastoupených buněk z velkého množství buněk je doporučován program posseld<sub>2</sub>, který umožňuje pozitivní separaci a přečištění cílových buněk ve 2 separačních kolonách. Tento program jsme zvolili pro separaci plazmatických buněk z kostní dřeně pacientů, u kterých bylo stanovené procento PB ve frakci mononukleárních buněk kostní dřeně ≤ 10% (analýza průtokovou cytometrií, populace plazmatických buněk CD38+ CD138+). Pro ostatní vzorky aspiračních biopsií kostních dření se procentem PB > 10% jsme zvolili program possels. Tento program umožňuje zvýšení výtěžku separovaných buněk za cenu mírného snížení čistoty buněk. Separace těchto buněk probíhá přes 1 kolonu.

**Tabulka č.1: Srovnání metod purifikace plazmatických buněk metodami MACS a FACS**

MACS metoda	FACS metoda
separace buněk podle jednoho znaku v jednom kroku	separace buněk podle několika znaků v jednom kroku
separace dvou subpopulací	separace až 4 různých subpopulací
čistota je závislá na vstupní infiltraci	čistota nezávislá na vstupní infiltraci
časově nenáročná	časově náročná
nižší náklady	vyšší náklady

### Význam metod u MM stávající a očekávané

Purifikace PB od pacientů nemocných mnohočetným myelomem je nezbytná pro uplatnění řady studií, u kterých musíme pracovat s vysoce čistou populací nádorových buněk (3, 5, 7). Možností, jak docílit tohoto obohacení plazmatických buněk ze vzorků aspiračních biopsií kostních dřeni s nízkou infiltrací patologických buněk, je použití vysoce specifických a senzitivních separačních metod MACS a/ nebo FACS (Tabulka č. 1). Vitalita separovaných buněk těmito procedurami není významně ovlivněna, čehož můžeme využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk (cytogenetické studie, produkce imunoglobulinů, produkce cytokinů aj.). Výhodou selekce buněk na principu FACS je možnost využít více znaků, a sortovat tak i různé typy plazmatických buněk podle fenotypu (např. CD19+ CD56- x CD19- CD56+), podle klonality stanovené intracelulárním barvením lehkých řetězců imunoglobulinů aj. V budoucnu plánujeme zahájit selekce PB u mono-

klonálních gamapatií s nízkou vstupní infiltrací. K těmto separacím bude využit buněčný sorter FACSaria.

### Závěr

MACS a FACS separační systémy umožňují rychlou, účinnou a levnou separaci vysoce čisté populace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeni a periferní krve pacienta s mnohočetným myelomem. Kvalita čistoty a výtěžku separovaných buněk v případě použití technologie MACS je vždy závislá na vstupní infiltraci plazmatických buněk ve frakci mononukleárních buněk. Proto je nutné vždy zvážit volbu vhodného separačního programu MACS pro různé vstupní infiltrace plazmatických buněk ve frakci mononukleárních buněk.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a IGF č. 3/05.

### Literatura:

1. Couchman JR, Woods A. Syndecans, Signaling and Cell Adhesion. *J Cell Biochem.* 1996; 61 (4): 578-584.
2. Dhodapkar MV, Sanderson RD. Syndecan-1 (CD 138) in myeloma cells and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma.* 1999; 34 (1-2): 35-43.
3. Draube A, Pfister R, Vockerodt M, et al. Immunomagnetic enrichment of CD138+ positive cells from weakly infiltrated myeloma patients samples enables the determination of the tumor clone specific IgH rearrangement. *Ann Hematol.* 2001; 80 (2): 83-89.
4. Fišerová A, Hájek R, Doubek M, et al. Imunomagnetická separace myelomových buněk. *Klin Onkologie.* 2001; 14 (2): 46-50.
5. Fišerová A, Hájek R, Holubová V, et al. Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma.* 2002; 49 (5): 300-306.
6. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002; 48 (10): 1819-1827.
7. Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, Nischt R, Schmitz J, Assenmacher M. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130 (3): 370-378.
8. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol.* 1998; 100 (4): 637-646.
9. Kang JH, Park J-K. Technical paper on microfluidic devices- cell separation technology. *APBN.* 2005; 9 (21): 1135-1146.
10. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS. *Cytometry.* 1990; 11 (2): 231-238.
11. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996; 94 (2): 318-323.

## SROVNÁNÍ SELEKCE PLAZMATICKÝCH BUNĚK METODAMI MACS A FACS

### ISOLATION OF PLASMA CELLS USING MACS AND FACS – RESULTS

BUREŠOVÁ I.<sup>1,2</sup>, ČUMOVÁ J.<sup>1,2</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>2</sup>, KYJOVSKÁ D.<sup>1,2</sup>, VIDLÁKOVÁ P.<sup>1,2</sup>, SUSKÁ R.<sup>2</sup>, PERUTKA T.<sup>1</sup>, MORAVCOVÁ J.<sup>1</sup>, RYCOVÁ M.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V této studii jsme srovnali dvě metodiky separace plazmatických buněk z kostní dřeně dostupné v současné době na našem pracovišti. Práce srovnává úspěšnost obou metodik v závislosti na vstupní infiltraci a hodnotí i další aspekty separace buněk, jako je finanční a časová náročnost.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, Separace, MACS, FACS, CD138+.

#### Summary

We have compared two different methods used for the isolation of plasma cells from the bone marrow. Our analysis focuses on the efficacy of either method for different plasma cell percentages in the bone marrow as well and on financial and time requirements.

**Keywords:** Multiple myeloma, Separation, MACS, FACS, CD138+.

#### Úvod

Vysoká čistota plazmatických buněk je základním předpokladem pro uplatnění cytogenetických, molekulárně biologických a proteomických aplikací ve výzkumu mnohočetného myelomu (MM) a monoklonálních gamapatií nejasného významu. Zatímco technika magnetické selekce byla na našem pracovišti zavedena již dříve (3), nově máme k dispozici také techniku fluorescenčního třídění buněk (viz Metodická část), která je pro selekci plazmatických buněk z kostní dřeně také využívána (7,4). Rozhodli jsme se provést srovnání obou metodik, abychom prověřili jejich možnosti a limity v reálné praxi, tedy na vzorcích odebraných od pacientů s MM. Současně měla tato studie posloužit k optimalizaci metodiky přípravy buněk pro fluorescenční třídění.

#### Soubor nemocných

Bylo zpracováno paralelně celkem 20 vzorků kostní dřeně od 6 pacientů s MGUS a 14 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem (3 x stadium I, 1 x stadium 2 a 10 x stadium III). Jednalo se o 9 mužů a 11 žen s mediánem věku 67,5 let, v rozmezí od 53 do 85 let. Jedenáct pacientů mělo isotyp IgG.

#### Metodiky

Heparinizované vzorky kostní dřeně byly odebrány do Iscova média (IMDM, Sigma, No: I-2510) s přidavkem DNázy (Roche, No: 1284932). Vzorek byl důkladně promíchán a bylo odděleno 10 ml pro zpracování na sorteru (FACS Aria, BD Biosciences). Zbytek KD byl zpracován

cestou imunomagnetické separace MACS. Mononukleární buňky kostní dřeně (MNKD) byly získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque- 1077 (Sigma, No: H-8809, centrifugace 400g, 35 min, 4 °C). Po dvojitým promytí v PBS + 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min, 4 °C) bylo provedeno magnetické značení protilátkou CD138 MicroBeads (Miltenyi, No: 130-051-301) v dávce 20 µl s 80 µl pufru (PBS+ 2mM EDTA+ 0,5% lidský albumin)/ 10<sup>7</sup> buněk. Vlastní separace plazmatických buněk byla provedena na automatickém separátoru AutoMACS<sup>TM</sup> s využitím programu possels (viz. metodická část).

Vzorek pro sorter FACS Aria byl rozdělen na dvě části. Z jedné části byly izolovány mononukleární buňky kostní dřeně denzitní gradientovou centrifugací (postup zpracování viz. výše). Druhá část KD byla lyzována roztokem NH<sub>4</sub>Cl (8,3 g/1000 ml H<sub>2</sub>O). V obou frakcích byla stanovena buněčnost (Bürkerova komůrka), aby mohlo být určeno množství protilátky CD138, potřebné k označení buněk. Na několika vzorcích s vyšší buněčností byla odzkoušena spotřeba protilátky – jako dostačující množství bylo stanoveno 8 µl protilátky (anti CD138 firmy BD Biosciences)/ 10<sup>6</sup> buněk. Při nižším množství bylo obarvení nedostatečné a byla špatně oddělena negativní a pozitivní populace. Při vyšším množství docházelo k nespecifické vazbě protilátky se stejným výsledkem. Inkubace probíhala při 4°C minimálně 30 minut.

Po inkubaci s protilátkou byl vzorek promyt studeným PBS a naředěn na koncentraci 5 -10 x 10<sup>6</sup>/ml studeným roztokem PBS + 1% telecího fetálního albuminu (BoFeS - Sigma, No: F-2442).



## příklad

Vlastní třídění buněk probíhalo obvykle při rychlosti 3-8 x 10<sup>3</sup>/s; při této rychlosti byla účinnost třídění v rozmezí 90 – 95%. Buňky byly tříděny do vrstvy RPMI 1460 média (Sigma, No: R-8758) + 10% BoFeS a ihned po ukončení třídění byly stočeny a doplněny čerstvým čistým médiem. Byla sbírána jak tzv. pozitivní frakce (CD138+), tak negativní frakce (CD138-, ostatní buňky). Čistota těchto frakcí byla vyhodnocena morfologicky (cytospin a prohlédnutí po panoptickém nabarvení) jako % plazmatických buněk. Výsledky byly zhodnoceny statisticky (neparametrický Kruskal-Wallis ANOVA test a Mann-Whitney test).

### Výsledky

Mediány čistoty pozitivních frakcí všech vzorků byly 74,8% (8,6% – 98,8%) pro magneticky separované buňky, 97,6% (50,0% – 100,0%) pro tříděné lyzované buňky a 99,2% (83,3% – 100,0%) pro tříděné buňky připravené gradientovou centrifugací. Jak je vidět z rozmezí minimálních a maximálních hodnot, rozdíly v rámci jedné metodiky byly až 90%, proto bylo hodnocení provedeno odděleně ve třech skupinách vzorků podle % CD138+ buněk, stanoveného na průtokovém cytometru bezprostředně před selekcí: u první skupiny byla vstupní infiltrace do 5% (skupina I – 9 vzorků), u druhé v rozmezí 5 až 10% (skupina II – 5 vzorků) a u třetí nad 10% (skupina III – 7 vzorků). Mediány čistoty pozitivních frakcí magneticky separovaných buněk vykazovaly vzestup v závislosti na vstupní infiltraci: od 64,8% (skupina I) po 97,3% (skupina III); u fluorescenčně tříděných buněk tento trend pozorován nebyl (viz Tabulka č.1, Graf č.1). Při statistickém zhodnocení jednotlivých metodik u všech vzorků byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi čistotami pozitivních frakcí (p=0,003), a to mezi magnetickou selekcí a fluorescenčně tříděnými buňkami, jak lyzovanými (p = 0,044), tak připravenými gradientovou centrifugací (p<0,001). Mezi různě připravenými

fluorescenčně tříděnými buňkami rozdíl nalezen nebyl (p=0,119). V rámci jednotlivých skupin byly statisticky významné rozdíly zachovány jen ve skupině I (do 5% CD138+ buněk); v ostatních skupinách statisticky významné rozdíly nalezeny nebyly.

Čistota negativních frakcí byla posuzována podle procenta reziduálních plazmatických buněk: při hodnocení všech vzorků byl medián čistoty 2,4% (0,2% - 25,0%) pro magneticky separované buňky, 0,5% (0,0% – 3,2%) pro tříděné lyzované buňky a 1,2% (0,0% - 4,0%) pro tříděné buňky připravené gradientovou centrifugací. Při statistickém zhodnocení jednotlivých metodik u všech vzorků byl mezi čistotami negativních frakcí nalezen statisticky významný rozdíl (p=0,002), a to mezi lyzovanými fluorescenčně tříděnými buňkami a magneticky separovanými buňkami (p<0,001) a mezi lyzovanými tříděnými buňkami a buňkami tříděnými po gradientové centrifugaci (p=0,007). Stejně jako u pozitivních frakcí byly statisticky významné rozdíly zachovány jen ve skupině I (do 5% CD138+ buněk).

### Diskuse

V naší práci jsme srovnávali různé metody selekce plazmatických buněk, a to především z hlediska čistoty separované populace. Zajímaly nás také ztráty buněk během selekce (zastoupení myelomových buněk v negativní frakci), náklady na jednotlivé metodiky a časová náročnost.

Z našich výsledků je zřejmé, že úspěšnost magnetické selekce, posuzovaná podle čistoty získaných myelomových buněk, je ve srovnání s fluorescenčním tříděním více závislá na zastoupení plazmatických buněk ve vstupním materiálu (viz Graf č.1).

Hodnota vstupní infiltrace 5% CD138+ buněk byla v naší práci vyhodnocena jako cut-off hodnota, nad kterou jsou všechny metodiky schopny poskytnout srovnatelné výsledky. Určitá závislost na vstupní infiltraci se ale projevuje napříč všemi metodikami. Se stoupající vstupní infiltrací se zužuje interval mezi minimálními a maximálními

	Magnetická selekce	Fluoresc. třídění lyzovaných buněk	Fluoresc. třídění buněk po gradient. centrifugaci
Všechny vzorky	<b>74,8</b> (8,6 - 98,8)	<b>97,6</b> (50,0 - 100,0)	<b>99,2</b> (83,3 - 100,0)
Skupina I	<b>64,8</b> (8,6 - 89,3)	<b>96,4</b> (50,0 - 100,0)	<b>99,5</b> (83,3 - 100,0)
Skupina II	<b>79,8</b> (61,6 - 98,0)	<b>77,6</b> (69,2 - 92,1)	<b>96,9</b> (92,8 - 100,0)
Skupina III	<b>97,3</b> (61,1 - 98,8)	<b>99,5</b> (98,8 - 99,6)	<b>99,2</b> (94,5 - 100,0)

Tabulka č. 1: Čistota pozitivních frakcí stanovená morfologicky – medián % plazmatických buněk (min-max)

Skupina I – vzorky se vstupní infiltrací do 5% CD138+ bb, Skupina II – vzorky se vstupní infiltrací 5 - 10% CD138+ bb, Skupina III – vzorky se vstupní infiltrací nad 10% CD138+ bb

	Magnetická selekce	Fluoresc. třídění lyzovaných buněk	Fluoresc. třídění buněk po gradient. centrifugaci
Všechny vzorky	<b>2,4</b> (0,2 - 25,0)	<b>0,5</b> (0,0 - 3,2)	<b>1,2</b> (0,0 - 4,0)
Skupina I	<b>1,2</b> (0,0 - 0,8)	<b>0,4</b> (0,0 - 0,8)	<b>1,2</b> (0,0 - 2,0)
Skupina II	<b>1,8</b> (0,2 - 2,8)	<b>0,4</b> (0,0 - 4,0)	<b>1,1</b> (0,0 - 4,0)
Skupina III	<b>0,6</b> (0,2 - 15,0)	<b>0,8</b> (0,0 - 3,2)	<b>3,2</b> (0,8 - 4,0)

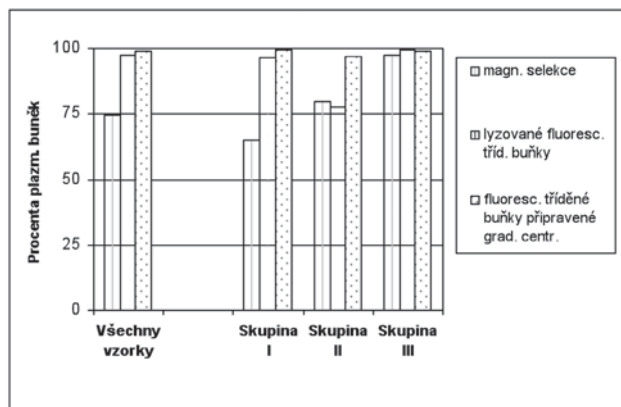
Tabulka č. 2: Čistota negativních frakcí stanovená morfologicky – medián % plazmatických buněk (min-max)

Skupina I – vzorky se vstupní infiltrací do 5% CD138+ bb, Skupina II – vzorky se vstupní infiltrací 5 - 10% CD138+ bb, Skupina III – vzorky se vstupní infiltrací nad 10% CD138+ bb

## příklad

hodnotami čistoty, dosažené v rámci výše uvedených skupin. Vyšší vstupní infiltrace tak vždy přinese vyšší jistotu úspěšného výsledku, ale na druhou stranu poroste možnost úniku plazmatických buněk do negativní frakce (viz Tabulka č.2).

Vzhledem k tomu, že existuje velká skupina vzorků, které je možno zpracovat všemi testovanými metodami se statisticky stejným výsledkem, je nutné zvažovat i další parametry, jako je cenová a časová náročnost.



**Graf č. 1: Mediány čistot pozitivních frakcí stanovené morfologicky (% plazmatických buněk)**

Skupina I – vzorky se vstupní infiltračí do 5% CD138+ bb

Skupina II – vzorky se vstupní infiltračí 5 - 10% CD138+ bb

Skupina III – vzorky se vstupní infiltračí nad 10% CD138+ bb

Náklady na zpracování kostní dřeně před a po selekci jsou velmi podobné, řádově jde o náklady asi 1000 Kč na jednu dřeň. Zásadní rozdíl je v ceně značení vzorku před selekcí. U obou metodik se nákladnost značení bude odvíjet od počtu zpracovávaných buněk, který bývá velmi individuální; v našem souboru 20 srovnávaných vzorků byl medián počtu zpracovávaných buněk  $37 \times 10^6$  ( $5 \times 10^6 - 225 \times 10^6$ ). Náklady na zpracování  $37 \times 10^6$  buněk magnetickou selekcí byly 740 Kč + 50 Kč na separační kolony; pro fluorescenční vyřídění stejného množství buněk bylo potřeba protilátky za 2747 Kč. Tyto náklady se ale dají redukovat – v současné době pracujeme s protilátkou jiné firmy, se

kteřou by tyto náklady byly 1013 Kč, čili z 2,5 násobku ceny jsme schopni se dostat na 1,3 násobek.

Jednoznačnou obrovskou výhodou magnetické selekce proti fluorescenčnímu třídění je její časová nenáročnost. Když pomíneme fázi přípravy a zpracování separovaných buněk, která bude přibližně stejná pro všechny metody a bude představovat asi 2,5 – 3 hod, vlastní selekce je v případě MACS otázkou asi 10 minut včetně promytí přístroje, bez ohledu na počet zpracovávaných buněk. Fluorescenční třídění je časově nesrovnatelně náročnější a bude vždy záviset na počtu buněk. Při nízkých infiltračních můžeme pracovat s rychlostí do  $5 \times 10^3$  buněk/s (pokud chceme dosáhnout vysoké čistoty bez větších ztrát buněk) čili zpracování  $37 \times 10^6$  buněk by zabralo asi 2 hod. Při vysoce buněčných vzorcích se ovšem můžeme dostat na časy až 12 hod.

Prodloužená doba separace může mít zásadní dopad na sledování hladiny genů či proteinů. Na rozdíl od genomu je exprese RNA vysoce dynamická a rychle se mění v odpovědi na odchylky prostředí či během normálních buněčných procesů jako jsou replikace nebo dělení buňky (8,5). Bylo prokázáno, že zpožděná izolace mononukleárních buněk z plně periferní krve o tři hodiny vede k významným systematickým změnám v genové expresi (1,6). Také skladování vede ke změnám v aktivitě genů závislé na buněčném typu. Pro expresní studie je nutné snížit čas nezbytný do izolace RNA (2)

### Závěr

V rámci provedené studie se podařilo optimalizovat dva použitelné postupy zpracování kostní dřeně před tříděním a zvládnout vlastní metodiku třídění a práci s náročným přístrojem. Získané zkušenosti budou využity pro rozhodování o využití konkrétních metodik v konkrétních případech. Fluorescenční třídění plazmatických buněk se zdá být dobrým příslibem pro zpracování vzorků kostní dřeně s nízkou vstupní infiltračí.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 2004; 5(5):347-53.
2. Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(3):193-207.
3. Fiserova A, Hajek R, Holubova V et al. Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma* 2002; 49:300-306.
4. Franke S, Hensen K, Peeters V et al. FISH, PCR and CGH, on FACS sorted plasma cells in MM and MGUS. *Haematologica* 2007; 92(suppl.2): abstract n.PO-102.
5. Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell.* 1998; 2(1):65-73.
6. Radich JP, Mao M, Stepaniants S et al. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics.* 2004; 83(6):980-8.
7. Rasillo A, Tabernero MD, Sánchez ML et al. Fluorescence In Situ Hybridization Analysis of Aneuploidization Patterns in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance versus Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia. *Cancer* 2003; 97:601-9.
8. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(12):3273-97.

## METODY KLASICKÉ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKY V DIAGNOSTICE MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### ROLE OF CLASSICAL AND MOLECULAR CYTOGENETICS FOR DIAGNOSIS OF MULTIPLE MYELOMA

KUGLÍK P.<sup>1,3</sup>, VRANOVÁ V.<sup>1</sup>, FILKOVÁ H.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>2</sup>ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup>UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

#### Souhrn

Jedním z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů u nemocných s mnohočetným myelomem je nález specifických aberací. Klasická cytogenetická analýza založená na analýze mitotických preparátů je u nemocných s mnohočetným myelomem limitovaná nízkou proliferativní aktivitou plazmatických buněk. Molekulárně cytogenetické metody, zejména technika interfázní fluorescenční hybridizace in situ (FISH), je relativně rychlá, citlivá a vysoce specifická metoda, která při použití vhodných centromerických či lokusově specifických DNA sond umožňuje detekovat početní a strukturální chromozómové odchylky v nedělících se jádrech interfázních buněk. Na rozdíl od leukémií je u mnohočetného myelomu správné využití techniky FISH podmíněno separací nádorových buněk či identifikací plazmatických buněk v kostní dřeni. Práce shrnuje principy, výhody i omezení klasické a molekulární cytogenetiky a jejich modifikací používaných při vyšetřování cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. Jsou prezentovány nejčastější typy početních a strukturálních chromozómových změn vyskytujících se v karyotypu nemocných s mnohočetným myelomem a jejich prognostický význam.

**Klíčová slova:** Chromozómové aberace, cytogenetika, FISH, mnohočetný myelom, prognostické faktory.

#### Summary

The presence and type of chromosomal abnormalities belong among the most important independent prognostic factors in patients with multiple myeloma. Classical cytogenetics based on the analysis of mitotic figures is often difficult due to the low proliferative index of malignant plasma cells. In order to circumvent this pitfall, molecular cytogenetics methods especially interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) with centromeric or locus specific DNA probes have been developed to study the most frequent numerical and structural chromosomal abnormalities observed in myeloma. The main difference to leukemias is that interphase FISH in myeloma needs to be coupled with plasma cell identification in the bone marrow specimens. The aim of this article is to summarize the principles, impact and limits of classical and molecular cytogenetic methods and their modifications used for the routine identification of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. We discuss the most common types of chromosomal aberrations in multiple myeloma and their prognostic importance.

**Keywords:** chromosomal aberration, cytogenetics, FISH, multiple myeloma, prognostic factors.

#### Úvod

Současný rozvoj nových technologií založených na poznatcích genetiky a molekulární biologie umožňuje zlepšení diagnostiky a prognostiky v onkologii. Molekulárně genetická vyšetření používaná v onkologii se rozrůstají s pokrokem znalostí o lidském genomu každým dnem. Význam těchto disciplín stále roste i s ohledem na stále účinnější protinádorovou léčbu či zavádění nových léčebných protokolů. Z tohoto hlediska se genetické abnormality charakterizující nádorovou buňku stávají prioritními z hlediska jejich využitelnosti v klinické praxi. U nádorových buněk můžeme pozorovat velmi pestrou a početnou škálu abnormalit. Častými genetickými změnami, které se v průběhu vzniku a vývoje nádoru objevují, jsou chromozómové aberace představující ztráty, zmožení či přemístění genetického materiálu.

Základním kamenem moderní nádorové cytogenetiky byl objev první specifické chromozómové odchylky u chronické myeloidní leukémie (CML) tzv. filadelfského (Ph) chromozómu. Tento chromozóm popsali *Nowell a Hungerford* v roce 1960 a nazvali jej podle města, kde byl objeven (24). V roce 1973 popsala *Rowleyová* vznik Ph chromozómu jako výsledek reciproké translokace mezi chromozómy 9 a 22 a tímto zjištěním položila základ dalšímu rozvoji onkocytogenetiky (27).

Od objevu filadelfského chromozómu bylo postupně nashromážděno mnoho poznatků dokazujících, že získané chromozómové změny, které se vyskytují u onkologických onemocnění, jsou integrální součástí procesu maligní transformace buněk (14).

Doposud bylo evidováno v Mitelmanově databázi na 53 000 různých typů abnormalit, které byly popsány



u různých hematologických malignit a solidních nádorů (22). Dnes jsou proto cytogenetické diagnostické metody spolu s řadou dalších vyšetření nedílnou součástí vstupní diagnostiky u mnoha onkologických onemocnění. Cytogenetická vyšetření nádorových buněk tak spolu s dalšími molekulárními technikami výrazně napomáhají charakterizaci biologických a klinických vlastností nádorů pro účely upřesnění diagnózy, stanovení prognózy, volby způsobu terapie či kontrole účinnosti léčby.

### Cytogenetické změny u mnohočetného myelomu a jejich význam

Obdobně jako u jiných hematologických malignit i u MM se často setkáváme se specifickými klonálními početními i strukturálními abnormalitami chromozómů, poměrně často se jedná o složité komplexní změny karyotypu. Z těchto důvodů je v posledních letech u nemocných s MM často považován za rozhodující prognostický faktor jejich úvodní cytogenetický nálezn. Na základě cytogenetických nálezů můžeme nemocné s MM rozdělit do různých genetických podskupin, které se liší v odpovědi na léčbu a v prognóze onemocnění. Studie prováděné během uplynulých let prokázaly, že přítomnost specifických aberací u pacientů s MM představuje rozhodující prognostický faktor jak při léčbě autologní transplantací, tak při užití vysokodávkované chemoterapie (5, 23, 26, 10). Prognostická stratifikace slouží i pro odlišení nemocných s vysokým rizikem náhlé transformace choroby, u nichž by měla být bezprostředně zahájena léčba. Intenzivně se též studuje význam cytogenetických změn při léčbě některými novými typy léků, jako jsou inhibitory angiogeneze či proteáz (32, 15). Přesné určení karyotypu myelomových buněk a včasná detekce prognosticky významných aberací

Podle literatury existují dvě hlavní cytogenetické podskupiny MM; hyperdiploidní varianta (H-MM) asociovaná s častým nálezem početních odchylek, zejména trizomií chromozómů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, a non-hyperdiploidní varianta (NH-MM) typická vysokou četností strukturálních abnormalit chromozómů, zejména translokací postihujících IgH lokus lokalizovaný na chromozómu 14 (7, 9, 37).

Za nejčastější chromozómovou změnu u MM je považována delece dlouhých ramen chromozómu 13 – del(13)(q14), která se při klasickém cytogenetickém vyšetření objevuje u 15-20% a při použití FISH více než u poloviny nově diagnostikovaných pacientů s MM (7, 36). Většina autorů považuje tuto aberaci za špatný prognostický ukazatel, zejména pokud je nalezena v metafázních analýzách nebo pokud se vyskytuje v kombinaci s dalšími chromozómovými abnormalitami, jako je delece 17p13 a translokace t(4;14) (10). Rozsah delece může být různý, u většiny nemocných (až 90%) pravděpodobně dochází ke ztrátám celého 13. chromozómu (monosomie 13). Druhou nejčastější abnormalitou v karyotypu je nález hyperdiploidního buněčného klonu (47 – 74 chromozómů), který bývá přítomen asi u 50% pacientů s MM a je obvykle spojen s lepší prognózou než přítomnost hypodiploidie (méně než 46 chromozómů) nebo diploidie (7, 37, 35). Častým nálezem v karyotypu MM bývají strukturální přestavby postihující IgH lokus. K nejčastějším přestavbám zahr-

nujícím IgH lokus patří translokace t(11;14)(q13;q32), která se vyskytuje asi u 20% nemocných s MM. Podle některých autorů je provázána delším celkovým přežitím nemocných a na rozdíl od ostatních přestaveb 14q32 je považována spíše za příznivý prognostický ukazatel (7, 35, 8). Další specifickou strukturální aberací postihující IgH lokus je t(4;14)(p16;q32), která je popisována u asi 15% nemocných s MM. Tato translokace je obvykle provázána velmi agresivním průběhem onemocnění. Nepříznivou prognózu pro nemocné znamená rovněž nález translokace t(14;16)(q32;q23), která se vyskytuje asi u 5% případů s primárním MM a je též spojena s kratším přežitím a agresivním průběhem onemocnění (2, 10, 7, 35).

Za další klíčové genetické abnormality související s horší prognózou je považována delece oblasti 17p13 (gen p53), se kterou se setkáváme asi u 10% nemocných a v poslední době též zisk úseku 1q21 (gen CKS1B), který bývá popisován až u 40-70% pacientů (16, 12).

### Konvenční cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu

Z hlediska metodického je vyšetření změn u MM stejně jako u jiných hematologických malignit založeno buďto na klasické analýze karyotypu prostřednictvím pruhovacích technik (tzv. konvenční cytogenetika založená na Giemsa pruhování metafázních chromozómů), nebo na využití molekulárně cytogenetických metod.

### Vstupní materiál

V případě konvenčních cytogenetických vyšetření u MM je vstupním materiálem ke stanovení karyotypu maligních linií kostní dřev (KD) pacientů. Základní podmínkou úspěšného cytogenetického vyšetření je v každém případě dostatečné množství biologického materiálu. Odběr materiálu (1-3ml KD) je prováděn sterilně do připravené zkumavky s obsahem malého množství (0,5 ml) heparinu. Důležitou podmínkou úspěšného cytogenetického vyšetření je, aby se jednalo o první frakci odběru kostní dřevě. Kultivace probíhá v různých kultivačních mediích, nejčastěji RPMI v termostatu při 37°C (může to být i *Panserin*, *Cytogen plus* atd. dle nabídky jednotlivých firem, ale se stejnou nutriční hodnotou). Po 24hodinové kultivaci (tzv. krátkodobá kultivace) nastává proces zpracování materiálu a příprava preparátů. Nezbytným krokem celého postupu je využití schopnosti působení kolchicinu na funkci dělicího vřeténka, tj. zastavení procesu buněčného dělení v metafázi. Následuje přidání hypotonického roztoku (0,075 M KCl na 10-20 minut), který umožní nabobtnání buňky, zvětšení jejího objemu a rozložení chromozómů v ekvatoriální rovině. Proces fixace buněk zahrnuje 3-4x opakované přidávání fixačního roztoku (metanol-kys. octová v poměru 3:1) vždy po odstředění a odsátí supernatantu. Vykapáním buněčné suspenze na předem odmaštěná a důkladně omytá podložní skla získáme cytogenetické preparáty vhodné pro další použití, tj. aplikaci barvicích metod cytogenetických nebo technik molekulárně cytogenetických.

I když metody metafázní cytogenetiky dosáhly v uplynulých letech značného rozvoje a jejich rezoluční možnosti se výrazně zvýšily, přesto má konvenční cytogenetická analýza zvláště u MM výrazná omezení. Výsledky cyto-

genetického vyšetření u MM jsou často limitovány nízkou infiltrací kostní dřeně nádorovými plazmatickými buňkami a s tím souvisejícím nízkým mitotickým indexem. Problémem může být i špatná morfologie chromozómů, která často nedovoluje přesnější lokalizaci zlomových míst.

Klonální chromozómové aberace podle údajů v literatuře nalézáme při konvenční cytogenetické analýze asi jen u 30% nemocných s mnohočetným myelomem (4, 31). U mnoha pacientů je však klasické cytogenetické vyšetření neúspěšné nebo neinformativní. V kultivaci tak nalézáme pouze buňky s normálním karyotypem. Přes tuto skutečnost má konvenční cytogenetika u MM stále velký význam. Tak např. případný abnormální cytogenetický nálezní delece 13q/monosomie 13 pozorovaný na mitózách přináší informaci nejen o strukturní abnormalitě chromozómů, ale svědčí i o zvýšené proliferaci patologických buněk, což samo o sobě již pro pacienta znamená špatnou prognózu (25).

#### **Molekulární cytogenetika u mnohočetného myelomu**

Nové možnosti v této oblasti přinesl rozvoj molekulárně cytogenetických metod, které pomohly překonat určitá metodologická omezení klasické cytogenetiky. Jedná se hlavně o techniku fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její modifikace, která se začala intenzivněji používat v cytogenetických laboratořích od poloviny 80. let minulého století.

Základní metodou molekulární cytogenetiky je hybridizace *in situ*, která umožňuje zviditelnit sekvence nukleových kyselin přímo na mikroskopických preparátech obsahujících fixované a morfologicky zachovalé chromozómy nebo interfázni jádra. Molekulární hybridizace *in situ* je založena na použití značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Tato sonda se v důsledku komplementarity bazí může po denaturaci vázat k cílové sekvenci DNA buněk nacházejících se na mikroskopickém skle a umožnit tak detekci defektních genů či chromozómů v genomu nádorových buněk. Molekulárními metodami studované fragmenty DNA jsou přibližně 200 – 300 kilobází velké. Na základě konjugace DNA sondy s fluorochromem můžeme potom místa hybridizace detegovat prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. V naprosté většině případů jsou fluorescenční signály snímány velmi výkonnou CCD kamerou napojenou na počítač se speciálními programy pro FISH, citlivost metody se tak zvyšuje o několik řádů. Diagnostické postupy založené na metodách molekulární cytogenetiky dovolují rozlišit tak malé změny na chromozómech, které nebylo možno dříve v karyotypu prokázat. Další výhodou je, že metody FISH při použití vhodných DNA sond umožňují detegovat početní i strukturní chromozómové abnormality nejen v mitózách, ale i v nedělicích se interfázni jádrech (tzv. interfázni I-FISH). Tato skutečnost je zvláště významná při molekulárně cytogenetickém vyšetření MM, kde se jako vstupní materiál opět používá suspenze fixovaných buněk kostní dřeně, které jsou vykapány na mikroskopická skla. Zde už nevedí nízké hodnoty mitotického indexu, pro vyšetření je dostačující samotná přítomnost interfázni myelomových buněk ve vzorku.

#### **Specifické problémy molekulárně cytogenetických vyšetření u nemocných s MM**

I v případě molekulárně cytogenetických vyšetření vzorků MM ovšem někdy narážíme na problém nízké infiltrace kostní dřeně nádorovými myelomovými buňkami. U některých pacientů může být zastoupení plazmocytů mezi ostatními buňkami kostní dřeně menší než 5%. Ke správnému molekulárně cytogenetickému vyšetření myelomových buněk se proto používají následující přístupy:

##### **a) morfologická identifikace nádorových plazmocytů v kostní dřeni v kombinaci s technikou I-FISH**

V některých světových laboratořích jsou používány automatizované mikroskopické stanice, které umožňují provádět současně morfologické i genetické vyšetření jednotlivých buněk. Prvním krokem je morfologická identifikace nádorových myelomových buněk v nátěrech kostní dřeně za využití světelného mikroskopu na základě May Grunwald Giemsova barvení. Následně probíhá naskenování a zaznamenání souřadnic těchto buněk pomocí CCD kamery, mikroskopického stolku s automatizovaným posunem a počítače. Druhý krok spočívá v hybridizaci těchto preparátů se specifickými DNA sondami. Chromozómové abnormality jsou potom v celém vzorku kostní dřeně cíleně studovány pomocí fluorescenčního mikroskopu pouze u buněk, jejichž poloha na mikroskopickém preparátu odpovídá poloze morfologicky identifikovaných nádorových buněk. Citlivost této metody je srovnatelná s metodou RT-PCR, ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ), záchyt aberací je podstatně vyšší než u běžné FISH prováděné na plně kostní dřeni (13).

##### **b) separace nádorových plazmocytů v kombinaci s technikou I-FISH**

Separční metody umožňují získat populaci nádorových plazmocytů z buněk kostní dřeně o vysoké čistotě, na nichž provádíme následně molekulárně cytogenetické vyšetření. V laboratorní praxi se setkáváme nejčastěji s imunomagnetickou separací myelomových buněk pomocí CD 138+ specifické protilátky (AutoMacs) nebo s fluorescenční imunomagnetickou separací (FACSaria). Před vlastním cytogenetickým vyšetřením musí být separované buňky získány v dostatečném množství a vysoké čistotě a opět fixovány a vykapány na mikroskopická skla (6). Pro některé pokročilé molekulárně cytogenetické techniky (CGH, array-CGH) používáme separované buňky i pro izolaci DNA.

##### **c) imunofluorescenční značení nádorových plazmatických buněk v kombinaci s metodou FISH (tzv. cIg-FISH)**

Vyšší záchyt aberací umožňuje rovněž simultánní imunofluorescenční značení a molekulárně cytogenetické vyšetření klonálních plazmatických buněk prováděné přímo na mikroskopických preparátech s vykapávanými buňkami kostní dřeně. Preparáty hybridizujeme s příslušnými DNA sondami a myelomové plazmocyty identifikujeme mezi ostatními buňkami kostní dřeně pomocí fluorescenčně značených protilátek proti lehkým řetězcům cytoplazmatických imunoglobulinů, které jsou konjugované s fluorochromem AMCA. Při pozorování ve fluorescenčním mi-

kroskopu rozlišujeme jednotlivé nádorové buňky v kostní dřeni na základě sytě modrého zbarvení cytoplazmy a pouze v těchto značených buňkách následně vyšetřujeme aberace chromozómů metodou I-FISH (1, 19).

Zejména poslední dva způsoby cytogenetického vyšetření myelomových buněk jsou ve světových laboratořích rutinně využívány, v České republice většina cytogenetických laboratoří používá metodu imunofluorescenčního značení plazmatických buněk, která je u nás dobře standardizována a finančně méně nákladná.

### Modifikace metody FISH

Další nevýhodou je, že techniky FISH používané k detekci aberací předpokládají přesnou znalost a charakterizaci postižených genů, a jsou proto vhodné pouze pro sledování omezeného počtu specifických přestaveb. Z těchto důvodů jsou v dnešní době neustále vyvíjeny a zdokonalovány nové postupy a modifikace techniky FISH, které umožňují analyzovat celý nádorový genom a hledat změny v počtu a lokalizaci genů či DNA sekvencí v jednom hybridizačním pokusu (tzv. metody celogenomového screeningu). K těmto metodám patří zejména technika chromozómové komparativní genomové hybridizace (CGH), která umožňuje detegovat a mapovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy (18). Při této technice nevyšetřujeme chromozómy, ale DNA testovaných buněk či tkání. Tato DNA z testovaného vzorku je spolu s kontrolní DNA z buněk s normálním karyotypem fluorescenčně označena, a to tak, že pro jejich označení jsou použity spektrálně odlišné fluorochromy (např. červená a zelená fluorescence). Obě DNA jsou následně smíchány v ekvimolárním poměru a hybridizovány na normální metafázní chromozómy. Po několikahodinové hybridizaci, odmytí nenavázané a nespecificky navázané sondy jsou chromozómy podbarvené pomocí fluorochromu DAPI, které umožňuje sestavení karyotypu. Následně je pomocí citlivé kamery registrován fluorescenční signál a použitím počítačového programu analyzovaný poměr fluorescence podél jednotlivých chromozómů. V případě, že DNA z testovaného vzorku neobsahuje žádné změny, všechny chromozómy se barví jednotně (poměr fluorescence testované a kontrolní DNA je 1). V případě, že vyšetřovaný vzorek obsahuje nadbytečný materiál nebo mu naopak určité oblasti scházejí, dochází v těchto oblastech ke změně poměru fluorescence. Odchylky < 0,8 jsou pak hodnoceny jako ztráty DNA sekvencí (delece či monozomie chromozómů), odchylky > 1,2 jako zisky genetického materiálu (duplikace, trisomie, amplifikace chromozómů). Rozlišovací schopnost CGH je asi 5-10 Mb. Technika CGH je nesmírně účinná při vyšetřování nebalancovaných změn, jako jsou delece, zisky nebo amplifikace některých genů, avšak nelze je využít při vyšetřování některých typů aberací, jako jsou reciproké translokace, inverze a inserce, při kterých se nemění poměr počtu kopií sekvencí DNA. Další podmínkou pro úspěšnou aplikaci této metody je čistota (nad 50% nádorových buněk ve vzorku) a dostatečné množství DNA. U pacientů s MM jsou proto tato vyšetření prováděna výhradně při vysoké infiltraci kostní dřeni myelomovými buňkami, popř. na separovaných myelomových buňkách s vysokou čistotou. Použití meto-

dy CGH u nemocných s MM umožnilo odhalit četné rekurentní nebalancované změny v nádorovém genomu jako jsou zisky 1q, 5q, 9q, 11q, 19p nebo ztráty 6q, 8p a 16q, jejichž prognostický význam je stále studován (11).

Na stejném principu jako CGH je založeno vyšetření nemocných s MM pomocí mnohem citlivější metody array-CGH, která se liší tím, že jako podklad pro hybridizaci slouží tzv. DNA mikročipy, tj. klonované sekvence DNA nebo uměle syntetizované oligonukleotidy pokrývající oblasti vybraných genů nebo celý genom (3, 20).

Mezi pokročilé metody molekulární cytogenetiky patří i techniky mnohobarevných metafázních analýz, které dovolují barevně odlišit každý chromozómový pár v lidském karyotypu (mnohobarevná fluorescenční hybridizace *in situ* - mFISH, spektrální karyotypování - SKY), event. barevně odlišit jednotlivé pruhy na chromozómech (mBAND - mnohobarevné pruhování). Tyto nové metody umožňují mnohem detailnější analýzy jednotlivých strukturních změn typu delecí, amplifikací, translokací, inverzí a insercí a z těchto důvodů jsou používány zejména při vyšetření složitých karyotypů (33, 34, 21). Jako u klasických cytogenetických vyšetření je i u těchto moderních technik nezbytnou podmínkou dostatečný počet dobře rozprostřených mitóz. Z těchto důvodů jsou u pacientů s MM metody mFISH či spektrálního karyotypování používány jako doplněk klasické cytogenetiky zejména pro upřesnění míst zlomů či identifikaci drobných kryptických translokací a dalších přestaveb chromozómů (30, 29, 28).

Souhrnně lze říci, že po zavedení moderních molekulárních cytogenetických metod a zejména interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace prováděné na separovaných či selektivně značených buňkách se ukázalo, že specifické chromozómové abnormality nacházíme v genomu nádorových buněk až u 90% nemocných s MM (2, 17). V případě celogenomového screeningu abnormalit prováděného pomocí technologie array-CGH a oligonukleotidových DNA mikročipů uvádějí někteří autoři záchyt dokonce 100% (20).

### Závěr

Nález specifických aberací je jedním z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů u nemocných s mnohočetným myelomem.

Cytogenetické vyšetření pacientů s MM pomocí konvenční cytogenetiky i techniky FISH je velmi náročné. Nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index, přítomnost paraproteínu v cytoplazmě nádorových buněk a konečně i nezbytnost používat různé separační či simultánní barvicí techniky pro identifikaci myelomových buněk výrazně znesnadňují rutinní cytogenetickou diagnostiku. Přes tyto skutečnosti jsou metody molekulární cytogenetiky, zejména interfázní FISH, zatím nejučinnějším přístupem k odhalování změn u tohoto onemocnění. V roce 2005 proběhlo v Londýně pracovní setkání Evropské myelomové skupiny, na kterém byly přijaty společné závěry a doporučení týkající se sjednocení metodiky a standardizace molekulárně cytogenetického vyšetřování pacientů s MM (26). Hlavní důraz je kladen na požadavek používat některou z metod identifikace nádorových plazmocytů a vyšetřovat u pacientů s MM zejména všechny klíčové chromozómové aberace s již známým

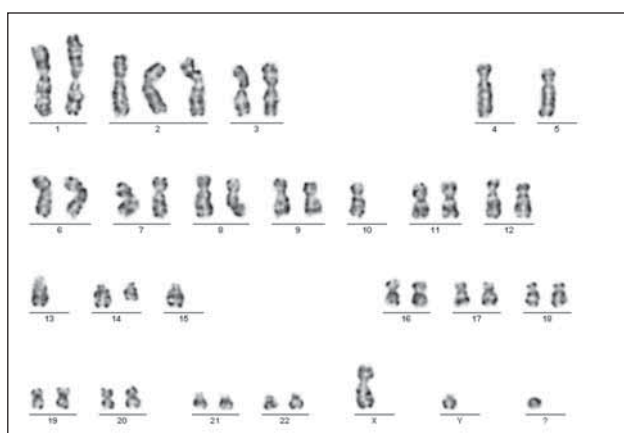


negativním prognostickým významem (delece 13q, delece 17p13, translokace t(4;14), translokace t(14;16)). Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření tvoří nedílnou a důležitou součást diagnostických metod využívaných u pacientů s MM. Lze očekávat, že v souvislosti s rozvojem dalších genetických poznatků a stále větším využíváním nových typů léčiv u pacientů s MM bude význam cytogenetických vyšetření i v budoucnu stále větší.

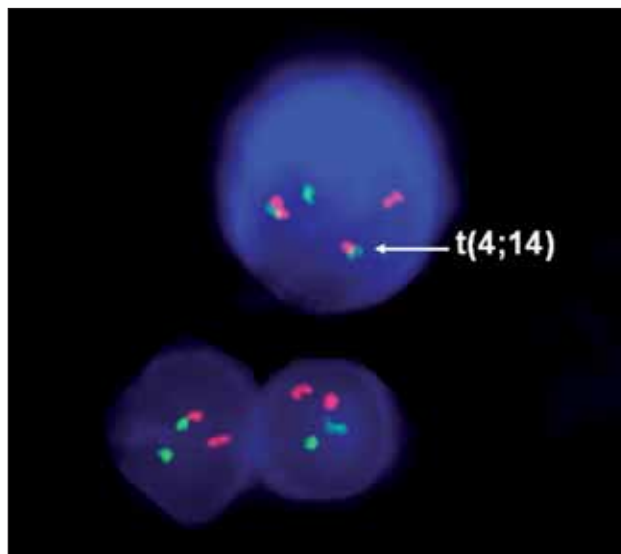
### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM002162245.

### Ukázka reprezentativního výsledku cytogenetických vyšetření



**Obrázek č. 1:** Ukázka vyšetření chromozómových abnormalit u pacienta s mnohočetným myelomem metodou G-pruhování (43, XY, der(1), +2, -4, -5, -10, -13, der(14)del(14q), -15, +mar) (OLG FN Brno, 2007)



**Obrázek č. 2:** Ukázka vyšetření aberací u nádorové plasmatické buňky mnohočetného myelomu pomocí imunofluorescenčního barvení cytoplazmatických imunoglobulinů a techniky FISH. Plasmatická buňka vykazuje translokaci t(4;14) (dva fúzní signály).

Typ změny	Geny	Prognóza
hyperdiploidie	47-74 chromozómů	příznivá
t(11;14)(q13;q32)	IGH/CCND1	příznivá
monozomie13/delece13q14	RB1, D13S25	středně příznivá
delece 17p13	p53	nepříznivá
zisk/amplifikace 1q21	CKS1B	nepříznivá
t(4;14)(p16;q32)	IGH/FGFR3	nepříznivá
t(14,16)(q32;q23)	IGH/MAF	nepříznivá

**Tabulka č. 1:** Přehled některých prognosticky důležitých aberací chromozómů u mnohočetného myelomu vyšetřovaných pomocí DNA sonda a metody FISH

### Literatura

- Ahman G, Jalal S, Juneau A, et al.: A novel three-color, clone specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1998;101: 7-11.
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood.* 2007;109: 3489-3595.
- Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, et al.: High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell.* 2006;9: 313-325.
- Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, et al.: The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood.* 1985;66: 380-390.
- Facon T, Avet-Loiseau H, Guillemin G, et al.: Chromosome 13 ab-

- normalities identified by FISH analysis and seru b2-microglobulin produče a very powerful myeloma staging system for patients receiving high dose therapy. *Blood.* 2001;97: 1566-71.
- Fišerová A, Hájek R, Holubová V, et al.: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma.* 2002;49(5): 300-306.
  - Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research.* 2004;64: 1546-1558.
  - Fonseca R, Blood EA, Oken MM, et al.: Myeloma and the t(11;14) (q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood.* May 2002;15:99(10): 3735-41.
  - Fonseca R., Debes-Marun CS, Picken EB, et al.: The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood.* 2003;102: 2562-2567.



10. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al.: Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007;21: 143-150.
11. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, et al.: Prognostic and biological significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. 2004;104: 2661-2666.
12. Hanamura I, Steward JP, Huang Y, et al.: Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006;108: 1724-1732.
13. Hardan I, Rothman R, Gelibter A., et al.: Determination of chromosome 13 status in bone marrow cells of patients with multiple myeloma using combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis. *Exp. Hematol*. 2004;32: 254-260.
14. Heim S, Mitelman R. *Cancer Cytogenetics*. Second Edition. Wiley-Liss, Inc., New York 1995.
15. Chang H, Trieu Y, Qi X, et al.: Bortezomib therapy response is independent of cytogenetic abnormalities in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2006;31: 779-82.
16. Chang H, Qi C, Reece D, et al.: p53 gene deletions detected by FISH is an adverse prognostic factor for patients with MM following autologous stem cell transplantation. *Brit. J. of Haematol*. 2004;207: 280-284.
17. Christensen JH, Abildgaard N, Plesner T, et al.: Interphase fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance without and with positive plasma cell identification: analysis of 192 cases from the Region of Southern Denmark. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007;174: 89-99.
18. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258: 818 – 21.
19. Kuglík P, Filková H, Vranová V, et al.: Detection of chromosome 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ.J. Hum. Genet. (suppl.)* 12: 170, 2004.
20. Largo C, Saez B, Alvarez S, et al.: Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocation. *Haematologica/the hematology journal*. 2007;92: 795-802.
21. Michalová K, Zemanová Z, Březinová J: Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace. *Časopis lékařů českých*. 2001;140: 99-103.
22. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2008). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
23. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al.: Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100: 1579-83.
24. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132: 1497.
25. Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, et al.: Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;113: 73-77.
26. Ross FM, Avet-Loiseau H, Drach J, et al.: European myeloma network recommendation for FISH in myeloma. *Vyd. Vol. 92(s2)*. Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.100-101. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
27. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243: 290-293.
28. Saez B, Martín-Subero JI, Largo C, et al.: Identification of recurrent chromosomal breakpoints in multiple myeloma with complex karyotypes by combined G-banding, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization analyses. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169: 143-149.
29. Sawyer JR: Multicolor spectral karyotyping in multiple myeloma. *Methods Mol. Med*. 2005;113: 49-58.
30. Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, et al.: Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2001;112: 167-174.
31. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath, et al.: Cytogenetic finding in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;82: 41-49.
32. Schreiber S, Ackerman J, Obermair A, et al.: Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularization. *Br J. Haematol*. 2000;110: 605-609.
33. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al.: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996;273: 494 – 497.
34. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Computer image analysis of combinatorial multi-color FISH. *Bioimaging*. 1996;4: 52 – 64.
35. Steward AK, Bergsagel PL, Greipp PR, et al.: A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patients counseling and choice therapy. *Leukemia*. 2007;21: 529-534.
36. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, et al.: Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*. 1995;Dec 1;86(11): 4250-6.
37. Wuilleme S, Robillard N, Lode L, et al.: Ploidy, as detected fluorescence in situ hybridization defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19: 275-278.

### VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ ANALÝZY IMUNOFLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH PLASMATICKÝCH BUNĚK U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM ZAŘAZENÝCH VE STUDII CMG 2002

### MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSIS OF IMMUNOFLUORESCENCE-LABELED PLASMA CELLS OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA ENROLLED IN CMG 2002 CLINICAL TRIAL

ZEMANOVÁ Z.<sup>1</sup>, MICHALOVÁ K.<sup>5</sup>, TAJTLOVÁ J.<sup>1</sup>, PAVLIŠTOVÁ L.<sup>1</sup>, OLTOVÁ A.<sup>2</sup>, FILKOVÁ H.<sup>2,3</sup>, KUGLÍK P.<sup>3</sup>, NĚMEC P.<sup>3,4</sup>, HOLZEROVÁ M.<sup>5</sup>, BALCÁRKOVÁ J.<sup>5</sup>, JAROŠOVÁ M.<sup>5</sup>, RABASOVÁ J.<sup>6</sup>, HRUBÁ M.<sup>7</sup>, FISCHLOVÁ H.<sup>7</sup>, ŠPIČKA I.<sup>8</sup>, GREGORA E.<sup>9</sup>, ADAM Z.<sup>10</sup>, ŠČUDLA V.<sup>11</sup>, MAISNAR V.<sup>12</sup>, SCHŮTZOVÁ M.<sup>13</sup>, KRÁLOVÁ D.<sup>4</sup>, HÁJEK R.<sup>4,10</sup>  
PRO ČESKOU MYELOMOVOU SKUPINU (CMG).

<sup>1</sup> CENTRUM NÁDOROVÉ CYTOGENETIKY, ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY, VFN A I. LF UK V PRAZE.

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO

<sup>3</sup> ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE PŘF MU BRNO

<sup>4</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>5</sup> HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA FN A LF OLOMOUC

<sup>6</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN HRADEC KRÁLOVÉ

<sup>7</sup> ÚSTAV LÉKAŘSKÉ GENETIKY, LF UK A FN PLZEŇ

<sup>8</sup> I. INTERNÍ KLINIKA, VFN A I. LF UK V PRAZE

<sup>9</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN KRÁLOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

<sup>10</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN A LF MU BRNO, PMD

<sup>11</sup> III. INTERNÍ KLINIKA, FN A LF PU OLOMOUC

<sup>12</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN HRADEC KRÁLOVÉ

<sup>13</sup> HEMATOLOGICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ FN PLZEŇ

#### Souhrn

V letech 2004-2006 jsme u 208 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) zařazených do studie CMG 2002 vyšetřili imunofluorescenčně značené plasmatické buňky metodou cIg-FISH. Sledovali jsme frekvenci a prognostický význam specifických chromosomových aberací. U 52,9% pacientů jsme detekovali aberace chromosomu 13, přestavby *IgH* genu jsme prokázali u 58,6% nemocných. Deleci genu *p53* a zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 mělo 21,6%, respektive 37,7% nemocných. Na základě výsledků statistické analýzy jsme prokázali, že přestavby *IgH* genu, zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a současný výskyt více než dvou genetických aberací jsou spojeny s agresivnějším průběhem a horší prognózou onemocnění. Naopak jsme ve studii CMG 2002 neprokázali prognostický význam aberací chromosomu 13 a příznivý vliv t(11;14)(q13;q32). Potvrdili jsme, že chromosomové aberace v plasmatických buňkách jsou velmi heterogenní a často dochází k jejich kumulaci. Při stanovení prognózy nemocných je proto vždy nutné posuzovat současně všechny změny prokázané v karyotypu.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, chromosomové abarace.

#### Summary

From 2004 to 2006 we have used cIg-FISH method to analyze immunofluorescence-labeled plasma cells from 208 patients with multiple myeloma (MM) enrolled in the CMG 2002 clinical trial. The aim of our study was to evaluate the frequency and prognostic impact of selected chromosomal aberrations. Chromosome 13 aberrations were found in 52,9% of patients, *IgH* gene translocations in 58,6% of patients, *p53* gene deletions in 21,6% of patients, and 1q21 gains in 37,7% patients. Statistical analysis has shown that *IgH* translocations, 1q21 gain, and simultaneous presence of more than two different genetic aberrations were associated with aggressive course of the disease and poor prognosis. We have not confirmed the putative negative prognostic impact of chromosome 13 aberrations and the favorable prognosis associated with t(11;14)(q13;q32). There was a high degree of heterogeneity of genetic abnormalities in plasma cells and a high prevalence of multiple aberrations. Complex analysis of all detected chromosomal abnormalities is necessary for the evaluation of their impact on prognosis.

**Keywords:** multiple myeloma, cytogenetics, FISH, chromosomal aberration.

## příklady využití

### Úvod

Za jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů je u nemocných s MM považován nález klonálních chromosomových aberací v plasmatických buňkách v době stanovení diagnózy (4). K nejčastějším cytogenetickým nálezům u MM patří delece *RB1* genu v oblasti 13q14 a/nebo ztráta celého chromosomu 13 a translokace *IgH* genu v oblasti 14q32 (3, 5). *IgH* vstupuje do translokací s různými partnerskými geny a tyto přestavby jsou většinou spojeny se špatnou prognózou (4). Výjimku tvoří translokace t(11;14)(q13;q32), která je některými autory považována za příznivý prognostický ukazatel (6). V novějších studiích však příznivý prognostický význam této translokace nebyl potvrzen (2) a proto je v současnosti považována za prognosticky „neutrální“. K nepříznivým prognostickým faktorům patří dále nález amplifikace oblasti 1q21 a delece tumor supresorového genu *p53*.

### Soubor pacientů a metodika

Konvenční cytogenetickou analýzou a metodou cIg-FISH jsme vyšetřili imunofluorescenčně značené plasmatické buňky u celkem 208 pacientů s MM, kteří byli v letech 2003-2006 zařazeni do studie CMG 2002 (125 mužů, 83 žen; průměrný věk 56 let, medián 57 let). Medián sledování je 30,4 měsíců. Klinická charakteristika souboru je shrnuta v Tabulce č. 1.

Klinický stav (Durie-Salmon)	Stav I	12 (5,8%)
	Stav II	50 (24,0%)
	Stav III	146 (70,2%)
Typ paraproteinu (n=193)	IgG	124 (64,3%)
	IgA	48 (24,9%)
	lehké řetězce	7 (3,6%)
	volné řetězce	6 (3,1%)
	B-J	5 (2,6%)
	IgM	2 (1,0%)
	IgD	1 (0,5%)
ISS (n=188)	ISS 1	66 (35,1%)
	ISS 2	65 (34,6%)
	ISS 3	57 (30,3%)
Léčebná odpověď (6 měsíců po transplantaci)	ORR	77 (88,5%)
	CR	10 (11,5%)
	VGPR	28 (32,2%)
	PR	39 (44,8%)
	MR	5 (5,8%)
	SD	1 (1,1%)
	PG	4 (4,6%)

Tabulka č. 1: Klinická charakteristika souboru

ORR (overall response rate) četnost objektivní odpovědi; CR (complete response) celková odpověď; VGPR (very good partial response) velmi dobrá částečná odpověď; PR (partial response) částečná odpověď; MR (minimal response) minimální odpověď; SD (stable disease) stabilní onemocnění; PG (progression) progresse.

K analýze značených plasmatických buněk ve stádiu interfáze jsme použili I-FISH s lokus-specifickými sondami (Abbott-VYSIS™, Kreatech Biotechnology™), při jejich aplikaci jsme postupovali podle návodů doporučených výrobcem. U každého vzorku jsme hodnotili alespoň 50 plasmatických buněk. Hladina „cut-off value“ byla stanovena na 20% pro detekci delecí 13q14 a *p53* a na 10% pro detekci translokací *IgH* genu a amplifikace 1q21 (*Workshop of the European Myeloma Network, 22. 1. 2007, Nantes, Francie – dosud nepublikováno*).

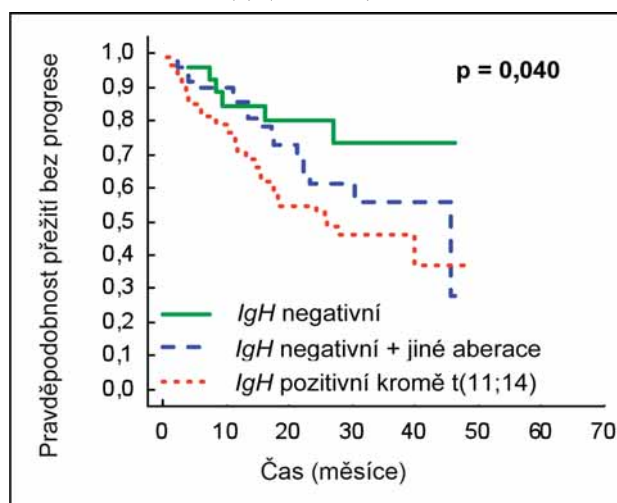
U všech nemocných zařazených do studie jsme provedli cIg-FISH se sondami pro detekci del(13)(q14) a přestaveb 14q23. U nemocných s prokázaným zlomem v *IgH* genu jsme dále pokračovali v hybridizaci se sondou pro detekci translokace t(11;14)(q13;q32). Kromě toho jsme u vybra-

ných pacientů retrospektivně vyšetřili archivovaný materiál se sondami pro detekci translokace t(4;14)(p16;q32), zisku chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a delecí tumor supresorového genu *p53* (17p13).

### Výsledky a diskuze

Metodou konvenční cytogenetické analýzy jsme detekovali chromosomové aberace celkem u 19,2% nemocných s MM. Nejčastěji se jednalo o strukturní aberace a/nebo komplexní přestavby karyotypu (26x), u 14 pacientů jsme detekovali aneuploidie. Normální karyotyp mělo 64,9 % nemocných a u 15,9% nemocných bylo cytogenetické vyšetření neinformativní. Analýza délky přežití prokázala statisticky významně kratší dobu přežití (OS,  $p=0,002$  a PFS,  $p=0,001$ ) u pacientů s komplexním karyotypem. Metodou cIg-FISH jsme prokázali přítomnost chromosomových aberací u 83,7% nemocných s MM. Aberace chromosomu 13 jsme detekovali celkem u 52,9% pacientů. Prognostický vliv monosomie/delece 13q na délku přežití nemocných nebyl v této studii prokázán (OS,  $p=0,955$  a PFS,  $p=0,315$ ). Předpokládáme, že prognózu pacientů bez prokázaných aberací chromosomu 13 negativně ovlivňují jiné genetické aberace, které mohou být přítomny v genomu plasmatických buněk.

Přestavby *IgH* genu jsme ve sledovaném souboru prokázali celkem u 58,6% nemocných. Statistická analýza potvrdila u pacientů s aberacemi *IgH* signifikantně kratší dobu přežití bez progresse (PFS,  $p=0,040$ ), což odpovídá údajům v odborné literatuře (5) (Graf č. 1).



Graf č. 1: Analýza délky přežití bez progresse (PFS) u nemocných rozdělených do skupin podle výsledků cIg-FISH se sondou pro detekci přestaveb *IgH* genu. Statistická analýza prokázala signifikantně kratší PFS ve skupině nemocných s prokázanými aberacemi *IgH* genu kromě translokace t(11;14)(q13;q32) ve srovnání s ostatními pacienty ( $p=0,040$ ).

Translokace t(11;14)(q13;q32) byla prokázána u 18,5% nemocných z této skupiny. Výsledky analýzy délky přežití nepotvrdily ve studii CMG 2002 příznivý prognostický význam této translokace (OS,  $p=0,707$  a PFS,  $p=0,702$ ). Pouze u tří pacientů však byla t(11;14)(q13;q32) detekována jako samostatná změna v karyotypu, ve všech ostatních případech se vyskytovala v kombinaci s dalšími chromosomovými aberacemi, které mohly mít nepříznivý

## příklady využití

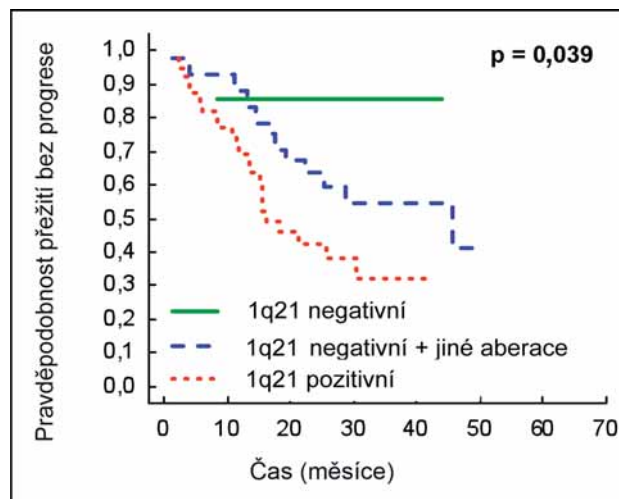
vliv na průběh a prognózu onemocnění. Translokaci t(4;14)(p16;q32) jsme detekovali u 15,8% nemocných. Z výsledků statistické analýzy je patrná tendence ke kratšímu přežívání u pacientů s prokázanou translokací ve srovnání s ostatními skupinami, rozdíl je však pod hladinou statistické významnosti ( $p=0,180$ ). Deleci genu *p53* jsme prokázali u 21,6% pacientů ve studii CMG 2002, nepotvrdili jsme nepříznivý prognostický význam této aberace při stanovení hladině cut off 20% (OS,  $p=0,796$  a PFS,  $p=0,601$ ). Podle nedávno publikovaných údajů má však tato aberace negativní prognostický význam, až pokud je přítomna ve více než 60% plasmatických buněk (1). Zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 jsme detekovali celkem u 37,7% vyšetřených nemocných. Statistická analýza prokázala ve studii CMG 2002 významně kratší dobu přežití u pacientů s touto aberací (OS,  $p=0,020$  a PFS  $p=0,039$ ; Graf č. 2).

Hodnotili jsme rovněž prognostický význam kumulovaných aberací. Ve sledovaném souboru jsme pouze u 22,4% nemocných detekovali některou z aberací jako samostatnou změnu v karyotypu, u dalších 77,6% případů jsme prokázali současný výskyt dvou a více chromosomových změn. Statistická analýza prokázala u pacientů s více než dvěma aberacemi významně kratší dobu přežití (OS,  $p=0,007$  a PFS,  $p=0,001$ ).

### Závěr

Komplexní molekulárně cytogenetická analýza značených plasmatických buněk podstatně zvyšuje záchyt chromosomových aberací u nemocných s MM. Ve studii CMG 2002 jsme jednoznačně prokázali, že přestavby *IgH* genu, zisk chromosomového materiálu v oblasti 1q21 a současný výskyt více než dvou aberací jsou spojeny s agresivnějším průběhem a horší prognózou onemocnění. Naopak jsme

v této skupině neprokázali prognostický význam delece/monosomie chromosomu 13 a příznivý vliv t(11;14)(q13;q32). Potvrdili jsme, že chromosomové změny v plasmatických buňkách jsou velmi heterogenní a často dochází k jejich kumulaci. Pro přesné stanovení prognózy nemocných je proto vždy nutné hodnotit současně všechny aberace přítomné v karyotypu.



Graf č. 2: Analýza PFS u nemocných s prokázaným ziskem chromosomového materiálu v oblasti 1q21. Statistická analýza prokázala významně kratší dobu přežití ve skupině pacientů s touto aberací ve srovnání s ostatními skupinami (PFS  $p=0,039$ )

### Poděkování

Práce byla podpořena granty IGA NR/8183-4, MZO00064165, MSM0021620808, MŠMT LC535, MSM0021622415, MSM0021622434 a MŠMT LC06027.

### Literatura

1. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 2007 Apr 15;109(8):3489-3495.
2. Avet-Loiseau H., Daviet A., Saunier S., Bataille R: Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *British Journal of Haematology*, 2000, 111: 1116-1117.
3. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al.: Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002 Sep 1; 100(5): 1579-1583.
4. Smajda NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al.: Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Oct 1; 98(7): 2229-2238.
5. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, et al.: A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):529-34.
6. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, et al.: Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplant, *J Clin Oncol* 1997, 15: 2659-2666.



### VÝZNAM CYTOGENETICKÝCH ZMĚN U RELABUJÍCÍCH PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM LÉČENÝCH NOVÝMI TYPY LÉKŮ

#### THE IMPACT OF CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN RELAPSED MULTIPLE MYELOMA PATIENTS TREATED WITH NEW DRUGS

ZAORALOVÁ R.<sup>1,2</sup>, KUGLÍK P.<sup>2</sup>, VRÁNOVÁ V.<sup>2</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, POUR L.<sup>1,5</sup>, KŘIVANOVÁ A.<sup>4</sup>, KREJČÍ M.<sup>4</sup>, ADAM Z.<sup>4</sup>, HÁJEK R.<sup>1,4,5</sup>

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

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PDM

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V této práci uvádíme příklad detekce specifických chromozómových aberací (delece 13q14, delece genu p53, translokace t(4;14) a zisk chromozómového materiálu v oblasti 1q21) pomocí imunofluorescenčního značení nádorových plazmatických buněk a techniky interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace s následným sledováním vlivu genetických aberací na úspěšnost léčby pacientů s mnohočetným myelomem (MM) léčených novými typy léků. Ve skupině 74 pacientů léčených terapií s bortezomibem (Velcade) nebo thalidomidem (Myrin) jsme pozorovali statisticky významně horší čas do progresu pouze u pacientů léčených thalidomidem, u kterých byl nalezen zisk 1q21 ( $p=0,015$ ). Tyto výsledky naznačují, že nové léky překonávají vliv cytogenetických negativních prognostických markerů s výjimkou zisku 1q21 u pacientů léčených thalidomidem.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, Velcade, bortezomib, thalidomid.

#### Summary

In this paper we show an example of use the detection of chromosomal abnormalities using modified fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and following searching for the impact of chromosomal abnormalities to successful treatment of multiple myeloma patients. In our group of 74 patients treated either by thalidomide (Myrin) or by bortezomib (Velcade) was only observed statistically significantly worse TTP in patients treated by thalidomide and having gain of CKS1B. According to our data the new drugs overcome the impact of negative cytogenetic prognostic markers with exception of patients with gain 1q21 treated by thalidomide.

**Keywords:** Multiple myeloma, cytogenetics, FISH, Velcade, bortezomib, thalidomide.

#### Úvod

Myelomové buňky se vyznačují výraznou genetickou nestabilitou. Zhodnocení prognostických faktorů při diagnóze mnohočetného myelomu (MM) je nezbytné pro stanovení prognózy, nově pak i pro výběr typu a intenzity léčebné strategie. Stanovení chromozómových aberací má zásadní prognostický význam u nemocných léčených konvenčními a myeloablativními režimy (2). Zcela nejasná je situace při použití nových léčebných strategií.

V této studii jsme se zaměřili na čtyři nejvýznamnější chromozómové aberace studované u MM: del(13)(q14) (gen RB-1), t(4;14), del(17)(p13) (gen p53), a gain(1)(q21) (gen CKS1B).

Cílem studie bylo zjistit, zda tyto chromozómové aberace působí jako negativní prognostické faktory u pacientů léčených bortezomibem nebo thalidomidem v kombinované terapii s dalšími látkami (alkylační cy-

tostatika, antracykliny, kortikoidy). Zaměřili jsme se na sledování vlivu uvedených cytogenetických změn na léčebnou odpověď pacientů s relapsem MM.

#### Soubor pacientů a metodika

Celkem jsme analyzovali 74 nemocných, 40 léčených bortezomibem a 34 léčených thalidomidem. Medián doby sledování pacientů od zahájení léčby byl ke dni zpracování analýzy 12,8 měsíců (95% IS = 12,6 - 17,1). Soubor nemocných měl následující popisné parametry: průměrný věk pacientů byl 64,9±9,6 let, 50% (37/74) pacientů byli muži. Celkem 65% (48/74) pacientů mělo klinické stádium III podle Durie Salmona a 82% (61/74) pacientů mělo stádium A (bez poškození ledvin). Pacienti léčení kombinací léků s bortezomibem byli více předléčení (medián počtu předchozích linií = 2, rozsah 0-3) než pacienti podstupující léčbu s thalidomidem (medián počtu předchozích linií = 1, rozsah 0-4).

## příklady využití

Cytogenetické změny byly studovány metodou interfázní FISH (I-FISH) prováděnou na myelomových buňkách separovaných pomocí imunomagnetické separace (MACS). U vzorků, u kterých nebylo možné provést separaci, byla využívána technika cFISH založená na imunofluorescenčním značení lehkých řetězců cytoplazmatických imunoglobulinů (7). Při našich studiích byly používány DNA sondy firmy Abbot-Vysis™ [LSI IGH/FGFR3 t(4;14)(p16;q32), LSI p53 (17p13.1) + CEP 17, LSI 13 (RB-1 locus, 13q14) + LSI 13q34] pro detekci translokace t(4;14), delece p53 a delece RB-1 a sonda vlastní výroby pro chromozómovou oblast 1q21 (gen CKS1B).

Jednotlivé preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a systémem analýzy obrazu LUCIA-KARYO/FISH/CGH (Laboratory Imaging, s. r. o., Praha). Na každém preparátu bylo hodnoceno minimálně 100 myelomových buněk. Jako aberantní byl hodnocen preparát s přítomností chromozómové abnormality u více než 20% hodnocených buněk.

Léčebná odpověď a léčebné intervaly byly hodnoceny dle doporučení IMWG (3). Vyhodnoceny byly korelace celkové léčebné odpovědi (ORR), celkové doby přežití (OS), času do progresu (PFS, TTP) a trvání léčebné odpovědi (DOR) s přítomností sledovaných cytogenetických změn i společný výskyt těchto změn mezi sebou. Pro hodnocení parametrů délky trvání odpovědi jsme použili Kaplan-Mayerovu analýzu křivek přežívání.

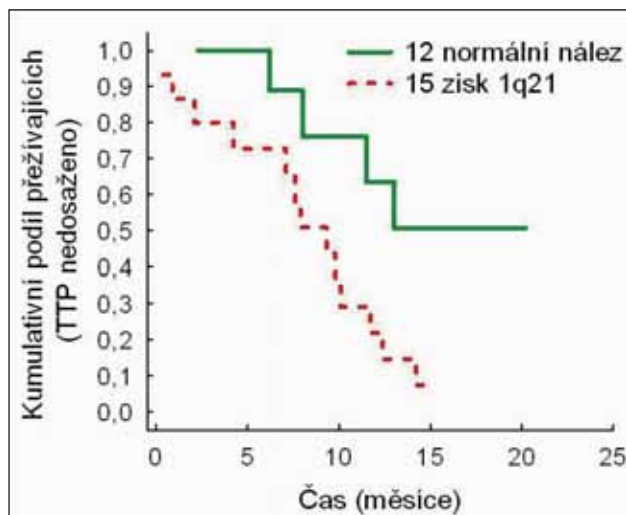
### Výsledky

*Výskyt cytogenetických abnormalit u souboru pacientů s relapsem MM léčených novými typy léků:*

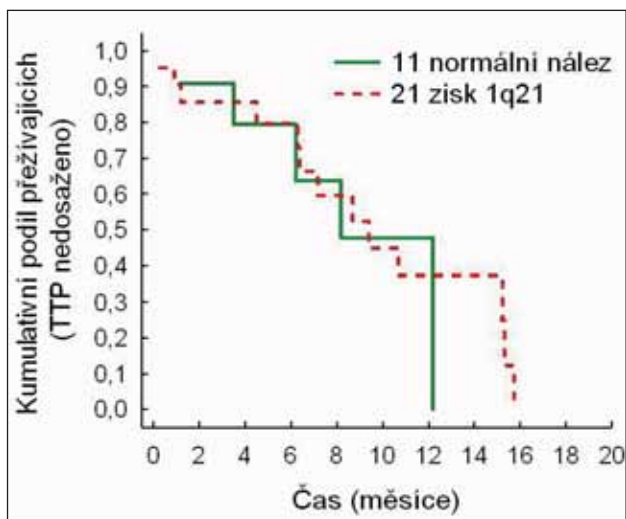
V celé skupině pacientů se delece 13q14/monozomie 13 vyskytovala u 55% (45/74) pacientů, delece genu p 53 u 16% (11/68) pacientů, translokace t(4;14) byla nalezena v 37% (22/60) případů a zisk chromozómového materiálu v oblasti 1q21 mělo 61% (36/59) pacientů. Delece genu p53 se často vyskytovala současně s delecí 13q14 ( $p=0,002$ ), u pacientů se ziskem v oblasti 1q21 jsme zachytili častěji i translokaci t(4;14) ( $p=0,053$ ).

*Vliv cytogenetických změn na úspěšnost léčby novými léky:*

Celková léčebná odpověď (ORR) byla dosažena u 61% (45/74) případů. Při hodnocení dosažené léčebné odpovědi jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl u žádné z provedených analýz. U celé skupiny všech pacientů léčených novými léky jsme statisticky významně prokázali kratší dobu do progresu (TTP) u pacientů se ziskem 1q21 (medián přežití 11,9 měsíců vs. 9 měsíců,  $p=0,033$ , Obrázek č.1). Pacienti podstupující léčbu s thalidomidem měli při přítomnosti zisku 1q21 kratší TTP i PFS (medián nedosažen vs. 8,1 měsíců,  $p=0,015$ , Obrázek č.2). U pacientů léčených bortezomibem jsme nepozorovali vliv zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na délku sledovaných intervalů a neprokázali jsme ani vliv ostatních sledovaných změn.



Obrázek č. 1: Vliv přítomnosti zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na čas do progresu (TTP) u pacientů léčených thalidomidem



Obrázek č. 2: Vliv přítomnosti zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na čas do progresu (TTP) u pacientů léčených bortezomibem

### Diskuze

Zhodnotili jsme přítomnost cytogenetických abnormalit u 74 pacientů léčených bortezomibem nebo thalidomidem. Pozorované četnosti chromozómových aberací se shodují s údaji v literatuře (4, 2, 6) s výjimkou vyššího záchyty t(4;14) u obou skupin.

Podle získaných výsledků žádná ze sledovaných aberací nemá vliv na úroveň léčebné odpovědi. Ve sledované skupině 74 pacientů jsme pozorovali rozdíl v délce TTP mezi pacienty léčenými terapií založenou na bortezomibu vs. thalidomidu, pokud byli rozděleni do dvou skupin podle přítomnosti zisku v oblasti 1q21 (gen CKS1B). U pacientů léčených thalidomidem se tato změna jevila jako negativní prognostický faktor, u pacientů léčených bortezomibem vliv změny nebyl pozorován. Vliv kombinované terapie s bortezomibem na překonání vlivu cytogenetických negativních prognostických faktorů pozorovala např. Mateos et al. (8).

Prokázání vlivu zisku 1q21 na prognózu již u malého

## příklady využití

ho počtu pacientů léčených thalidomidem ukazuje, že velikost souboru je dostatečná pro zachycení silného negativního prognostického faktoru. Získaná data naznačují, že kombinovaná terapie s bortezomibem nebo thalidomidem překonává potenciální negativní vliv většiny sledovaných cytogenetických aberací. V případě thalidomidu se tento výsledek neshoduje s publikací Attal *et al.* 2006 (1), který pozoroval výrazně horší EFS u pacientů s delecí v oblasti chromozómu 13. Tento rozdíl v pozorování může být způsoben buď malým vzorkem v našem experimentu, nebo odlišným nastavením léčebné strategie.

Při analýze společného výskytu aberací jsme statisticky významně neprokázali rozdíl mezi současným výskytem aberací u pacientů léčených bortezomibem a thalidomidem: můžeme tedy předpokládat, že v našem souboru nedošlo ke kumulaci vlivu zisku 1q21 a další změny.

Přímé srovnání vlivu bortezomibu a thalidomidu na léčbu pacientů nelze na základě našeho souboru dat provést, protože pacienti léčení bortezomibem jsou více předlčení než pacienti léčení thalidomidem, tedy

u nich lze předpokládat horší léčebné výsledky než u thalidomidu. Toto omezení se nevztahuje na předchozí porovnání pacientů uvnitř těchto skupin.

### Závěr

Ve většině analýz, které jsme provedli, jsme nepozorovali rozdíl v reakci na léčbu u pacientů s přítomností sledované chromozómové změny a bez ní. Vzhledem k tomu, že jsme sledovali cytogenetické změny prokázané jako negativní prognostické faktory při konvenční léčbě - t(4;14), delecí p53, zisk 1q21 - lze říci, že bortezomib a thalidomid překonávají potenciální negativní vliv těchto cytogenetických změn s výjimkou zisku 1q21, který je překonáván pouze kombinovanými režimy s bortezomibem. Potvrzení takového výsledku randomizovanou klinickou studií nebo analýzou randomizované klinické studie by přineslo zásadní potvrzení tohoto nálezu.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM0021622415 a IGA NR9317.

### Literatura

1. Attal, M., Harrouseau, JL, Leyvraz, S. et al: Maintenance therapy with thalidomide improves survival on patients with multiple myeloma. *Blood*, Nov 15;108(10):3289-94. Epub 2006 Jul 27.
2. Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007; 109: 3489-95
3. Durie, BG, Harousseau, JL, Miguel, JS et al.: International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, Sep;20(9):1467-73. 2006.
4. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research* 64: 1546-1558, 2004
5. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al.: Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 21: 143-150, 2007.
6. Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, et al.: Frequent gain of chromozóme band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 108: 1724-32, 2006.
7. Kuglík P, Filková H, Vranová V, et al.: Detection of chromozóme 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ.J. Hum. Genet. (suppl.)*, 12: 170, 2004.
8. Mateos, MW, Hernández, JM, Hernández MT et al.: Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica*. Apr;93(4):560-5. 2008. Epub 2008 Mar 5.
9. Wuilleme S, Robillard N, Lode L, et al.: Ploidy, as detected fluorescence in situ hybridization defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 19: 275-278, 2005



### STANOVENÍ HYPERDIPLOIDIE U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM POMOCÍ IMUNOFLUORESCENČNÍHO ZNAČENÍ PLAZMATICKÝCH BUNĚK A TECHNIKY TŘÍBAREVNÉ INTERFÁZNÍ FISH

### DETECTION OF HYPERDIPLOIDY IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA USING IMMUNOFLUORESCENT STAINING OF PLASMA CELLS AND THREE-COLOR INTERPHASE FISH TECHNIQUE

SMETANA J.<sup>1</sup>, KUGLÍK P.<sup>1</sup>, GREŠLIKOVÁ H.<sup>1,2</sup>, KUPSKÁ R.<sup>2</sup>, FILKOVÁ H.<sup>1,3</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, HÁJEK R.<sup>2,4,5</sup>

<sup>1</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>2</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V předkládané práci uvádíme příklad využití imunofluorescenčního značení nádorových plazmatických buněk a techniky tříbarevné interfázni fluorescenční in situ hybridizace se specifickými DNA sondami pro chromozómy 5, 9 a 15 k detekci hyperdiploidních karyotypů u nemocných s mnohočetným myelomem.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, hyperdiploidie.

#### Summary

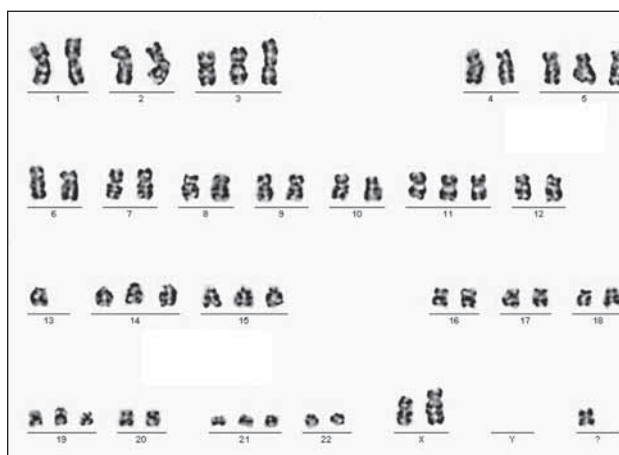
We focus on the applications of immunofluorescence labeling of tumor plasma cells and three-color interphase in situ hybridization with specific DNA probes for chromosome 5, 9, and 15 for the detection of hyperdiploidy in multiple myeloma.

**Keywords:** multiple myeloma, cytogenetics, FISH, hyperdiploidy.

#### Úvod

U mnoha nádorových onemocnění se setkáváme s početnými změnami chromozómů. Tyto změny mohou postihovat jednotlivé chromozómy v buňce (aneuploidie), nebo se mohou týkat zmnožení celých sad chromozómů (polyploidie). Také u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) jsou početní odchylky chromozómů velmi častým nálezem vyskytujícím se až u 2/3 pacientů (3). U MM jsou podle počtu chromozómů zjednodušeně rozlišovány dvě hlavní genetické podskupiny; hyperdiploidní varianta (H-MM), kam jsou zařazováni nemocní s výskytem 47 až 74 chromozómů v karyotypu a non-hyperdiploidní varianta (NH-MM) zahrnující nemocné s hypodiploidními (méně než 44 chromozómů), pseudodiploidními (45 až 46 chromozómů) a téměř tetraploidními (více než 75 chromozómů) cytogenetickými nálezy (1, 6). Zatímco nález hyperdiploidního buněčného klonu je obvykle spojen s lepší prognózou, kdy průměrně 33 % pacientů přežívá dobu 5 let od prvotního stanovení diagnózy, u nemocných s nonhyperdiploidními karyotypy průměrně pouze 10 % pacientů přežívá 5 let (1). Základní metodou stanovení hyperdiploidie je hodnocení metafázních chromozómů pomocí klasické cytogenetiky (Obrázek č.1). Vzhledem k nízké výtěžnosti této techniky jsou využívány pro stanovení početních změn chromozó-

mů i metody průtokové cytometrie založené na stanovení DNA indexu a techniky interfázni FISH (6).

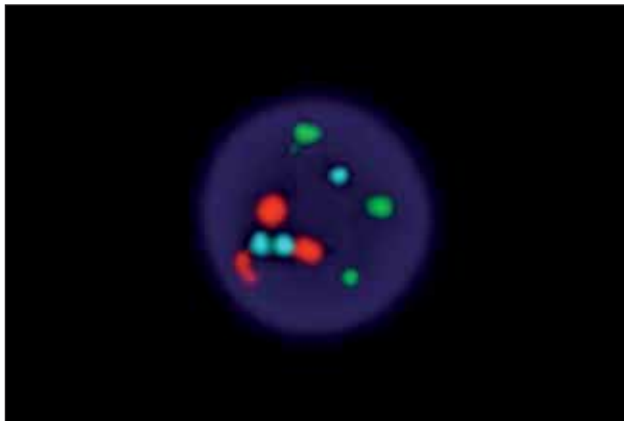


**Obrázek č. 1:** Ukázka hyperdiploidního karyotypu u pacienta s mnohočetným myelomem detekovaným metodou G-pruhování (53,XX,+3,+5,+11,-13,+14,+15,+19,+21,+mar). (OLG FN Brno, 2007)

V naší laboratoři je detekce H/NH karyotypů u pacientů s MM prováděna pomocí simultánního imunofluorescenčního značení klonálních plazmatických buněk a techniky

## příklady využití

tříbarevné interfázní FISH se specifickými sondami pro chromozómy 5, 9 a 15, které bývají nejčastěji zmnóžene u nemocných s hyperdiploidním karyotypem (1, 2). V předkládané práci prezentujeme výsledky stanovení hyperdiploidie pomocí této techniky ve vzorcích kostní dřevě u souboru 74 pacientů s mnohočetným myelomem.



**Obrázek č. 2:** Ukázka vyšetření chromozómových aberací u nádorové plazmatické buňky mnohočetného myelomu pomocí imunofluorescenčního barvení cytoplazmatických imunoglobulinů a techniky tříbarevné interfázní FISH. Plazmatická buňka vykazuje trisomii chromosomu 5, 9 a 15 (3 kopie chromosomu 5 - zelený signál, 3 kopie chromosomu 9 - modrý signál a 3 kopie chromosomu 15 - červený signál). (Smetana, 2007)

### Soubor pacientů a metodika

Metodou tříbarevné interfázní techniky FISH bylo vyšetřeno celkově 74 pacientů zařazených do studie Velcade/Thalidomid (37 žen, 37 mužů, průměrný věk 64,9 let, medián 65,1 let).

K identifikaci nádorových plazmocytů a stanovení hyperdiploidie byla využívána technika cIg-FISH založená na imunofluorescenčním značení lehkých řetězců cytoplazmatických imunoglobulinů (5) s využitím kitu DNA sond firmy Abbot-Vysis™ (LSI D5S23/D5S721, CEP 9, CEP 15 Multi-Color Probe Panel). Tento kit je tvořen specifickými DNA sondami pro chromozómy 5, 9 a 15, které jsou označeny třemi odlišnými fluorochromy – Spectrum Green, Spectrum Orange a Spectrum Aqua (Obr.2). Jednotlivé preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu

Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a systémem analýzy obrazu LUCIA-KARYO/FISH/CGH (Laboratory Imaging, s.r.o, Praha). Na každém preparátu bylo hodnoceno minimálně 100 myelomových buněk. Jako hyperdiploidní byla klasifikována buňka, u které byly zmnóžené alespoň dva ze tří studovaných chromozómů ve více než 20% hodnocených buněk (6).

### Výsledky

Pomocí techniky cIg-FISH s sondami pro chromozómy 5, 9 a 15 byla prokázána přítomnost hyperdiploidie celkově u 48% pacientů (35 z 74), non-hyperdiploidní karyotypy byly nalezeny u 52% pacientů (39 ze 74). V naší studii jsme zároveň potvrdili, že nemocní s hyperdiploidním karyotypem mají výrazně nižší výskyt translokace t(4;14) oproti nemocným s non-hyperdiploidním karyotypem (15% oproti 49%). Incidence dalších strukturních aberací typických pro MM (delece 13q14/monozomie 13 a delece genu p53) byla u H-MM pacientů také výrazně nižší (23% oproti 56%).

Analýza vztahů mezi H/NH karyotypy a dalšími klinickými parametry, zejména přežíváním pacientů u sledovaného souboru nemocných s MM, je součástí probíhající studie.

### Diskuse a závěr

Zavedení techniky tříbarevné interfázní FISH a vyšetřování hyperdiploidie u nemocných s MM doplňuje informace o genetické nestabilitě nádorových buněk, má přímý vztah k prognóze onemocnění i zásadní význam pro správné hodnocení dalších klíčových chromozómových aberací. Z literatury je známo, že hyperdiploidní karyotyp může u nemocných s MM maskovat přítomnost delece 13q14 a delece genu p53 stanovenou v interfázních nádorových buňkách metodou FISH až u jedné třetiny pacientů (4). Proto by měl být kladen důraz na vyšetřování hyperdiploidie jako důležité součásti panelu prognosticky významných chromozómových abnormalit sledovaných u pacientů s MM.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a VZ MŠM002162245.

### Literatura

1. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S., et al: Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003;17: 427-436.
2. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research*. 2004;64: 1546-1558.
3. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, et al.: The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003;102: 2562-2567.
4. Koren-Michowitz M, Hardan I, Berghoff J, et al: Chromosome 13q deletion and IgH abnormalities may be both masked by near-tetraploidy in a high proportion of multiple myeloma patients: A combined morphology and I-FISH analysis. *Cancer Letters*. 2007;255: 307-314.
5. Kuglík P, Filková H, Vranová V, et al.: Detection of chromosome 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ.J. Hum. Genet. (suppl.)*, 12: 170, 2004
6. Wullemme S, Robillard N, Lode L, et al.: Ploidy, as detected fluorescence in situ hybridization defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19: 275-278.

### DETEKCE NEBALANCOVANÝCH CHROMOZÓMOVÝCH ZMĚN U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM POMOCÍ TECHNIKY KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE

### DETECTION OF IMBALANCED CHROMOSOMAL CHANGES IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS USING COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH)

ZAORALOVÁ R.<sup>1,2</sup>, KUGLÍK P.<sup>2</sup>, VRÁNOVÁ V.<sup>2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUINA – UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM (URC-CMG), LF MU, BRNO

<sup>2</sup>ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup>INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Uvádíme příklad využití techniky klasické komparativní hybridizace (CGH) a komparativní hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH) u pěti pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Cílem experimentů bylo doplnit výsledky cytogenetických analýz prováděných pomocí techniky FISH o další nebalancované abnormality chromozómů a porovnat účinnost obou metod při vyšetření kostní dřeně s rozdílným stupněm infiltrace nádorovými plazmocytami.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, cytogenetika, chromozómové aberace, FISH, komparativní genomová hybridizace.

#### Summary

We show an example of the use classic CGH (comparative genomic hybridization) and HR-CGH (comparative genomic hybridization with higher resolution) in five multiple myeloma patients. The aim of the experiments was to combine the results of FISH with the analysis of imbalanced chromosomal abnormalities by CGH. Our other aim was to compare the use of these methods to detect chromosomal changes in samples with different infiltration by malignant plasma cells.

**Keywords:** Multiple myeloma, cytogenetics, chromosomal aberrations, FISH, comparative genomic hybridization.

#### Úvod

Molekulárně cytogenetické vyšetření pomocí techniky komparativní genomové hybridizace (CGH) patří k metodám komplexního genomového screeningu genetických abnormalit nádorových buněk. Tato metoda nevyžaduje metafázní chromozómy, a proto je vhodná zejména k vyšetřování solidních nádorů nebo hematologických malignit s nízkou mitotickou aktivitou nádorových buněk. Technika CGH umožňuje odhalit nebalancované přestavby vedoucí ke ztrátě nebo zmnožení genetického materiálu a je proto často využívána k diagnostice a prognostické klasifikaci jednotlivých maligních onemocnění či jejich subtypů. Také celkové počty zisků a ztrát DNA sekvencí lze použít jako prediktivní a prognostický marker vývoje nádorů (1).

Využití techniky CGH je omezeno svou relativně nízkou citlivostí. Dosavadní výsledky ukazují, že minimální délka sekvence DNA, jejíž delecí či amplifikaci lze pomocí klasické CGH zachytit, je přibližně 5 až 10 Mb, v nádorovém materiálu musí být přítomno alespoň 50 % buněk s danou aberací. V roce 1997 byla na pracovišti dr. Kirchhoffové proto vyvinuta metoda CGH s vysokým rozlišením (tzv. HR-CGH), která je již schopna zachytit drobné delecce či zisky DNA sekvencí o velikosti 3 Mb (5). V našich předchozích experimentech jsme využili techniku HR-CGH

při detekci chromozómových abnormalit u dětí s akutní leukémií (7) a prokázali jsme, že tato metoda umožňuje zachytit přítomnost aberantních klonů již s 20 až 30 % zastoupením nádorových buněk v analyzovaném vzorku (6). V této práci uvádíme příklad využití techniky klasické CGH a HR-CGH u 5 pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Cílem experimentů bylo doplnit výsledky cytogenetických analýz prováděných pomocí techniky FISH o další nebalancované abnormality chromozómů a porovnat účinnost obou metod při vyšetření kostní dřeně s rozdílným stupněm infiltrace nádorovými plazmocytami.

#### Metodika a soubor nemocných

K vyšetření byly použity vzorky kostní dřeně od 5 pacientů s MM, u kterých byla naměřena infiltrace myelomových buněk v kostní dřeni v rozsahu 18,4 - 81 % (Tabulka č.1). V naší práci byla jako sonda použita DNA (3 µg) izolovaná ze zamražené plné kostní dřeně metodou chloroformové extrakce. Techniku CGH/HR-CGH jsme prováděli dle dříve publikovaného protokolu (6). Fluorescenční signály byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a analyzovány pomocí počítačové analýzy obrazu LUCIA-CGH ADVANCED STATISTICS (Laboratory Imaging, s. r.o. Praha).

## příklady využití

Pacient č.	věk	pohlaví	infiltrace KD	FISH	CGH		HR-CGH	
					zisky	ztráty	zisky	ztráty
1	57	M	20	monozomie 13: 71 % t(4;14)(p16;q32): 100 %	0	0	9q34-qter, 19	13q21-q32
2	82	F	37,8	nehodnoceno	1q12-q42 16q22-qter	1p36.1-pter 3p21 14q24 X	1q12-qter 16q13-qter 17q23-qter	1p13-p31 3p21-p24 14q22-q24 X
3	60	M	81	monozomie 13: 98 % zlom IgH: 100 % delece p53: 23 % zisk 1q21: 100 %	1q 6p21-pter	11q14-qter 13	1q 6p21-pter	11q14-qter 13
4	50	M	18,4	delece 14q32 (IgH)	0	0	19p13-pter	13q21-q23
5	67	M	26,4	monozomie 13: 80 % zlom IgH: 100 % zisk 1q21: 99 %	1q12-q42	1p36.1-pter 22q12-qter	1q12-q42 4q12-q28	1p36.1-pter 20q 22q12-qter susp. 17p

**Tabulka č. 1:** Souhrn cytogenetických abnormalit zachycených u pacientů s MM pomocí techniky FISH, CGH a HR-CGH

### Výsledky

Pomocí klasické CGH bylo u 5 pacientů s MM nalezeno celkově 13 různých chromozómových změn (medián 3; rozptyl 0-6 v každém vzorku), zatímco technika HR-CGH zachytila u těchto pacientů 22 chromozómových změn (2-7 na vzorek, medián 4, rozptyl 2-7 v každém vzorku). Počet nalezených ztrát genetického materiálu (CGH- 8, HR-CGH -12) byl mírně vyšší než počet zisků (CGH 5, HR-CGH 10) - viz Tabulka č.1. Nejčastější chromozómovou změnou byl zisk v oblasti dlouhého raménka chromozómu 1 (1q). Celkově technika HR-CGH u nemocných s MM odhalila v genomu nádorových buněk o 40 % víc chromozómových abnormalit než klasická CGH.

### Diskuze a závěr

Pomocí metod CGH/HR-CGH jsme ve vzorcích kostní dřeně nemocných s MM nejen potvrdili přítomnost chromozómových abnormalit nalezených dříve metodou FISH (delece 13q, duplikace 1q), u ale navíc jsme zachytili i další nebalancované chromozómové abnormality (např. zisky 9q, 19p), které bývají opakovaně popisovány v karyotypu těchto nemocných (2).

Prokázali jsme, že technika HR-CGH je mnohem citlivější než metoda CGH. Ve vybrané skupině vzorků byly naměřeny hodnoty infiltrace kostní dřeně myelomovými buňkami ve velmi širokém rozsahu. Z Tabulky č.1 je patrné, že zatímco záchyt chromozómových abnormalit u vzorků kostní dřeně s infiltrací nádorovými plazmocytami nižší než 30 % klasickou CGH je velmi obtížný, technika HR-CGH zachytila spolehlivě přítomné chromozómové abnormality ve vzorcích s infiltrací nádorovými buňkami již kolem 20 %. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že techniky CGH a zejména HR-CGH představují vhodné technologie, které umožňují blíže analyzovat v rámci jediné hybridizační reakce celý genom a odhalovat další prognosticky významné chromozómové abnormality u nemocných s MM. Se zavedením analýzy genomu pomocí array-CGH se citlivost těchto vyšetření dále výrazně zvýší.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, VZ MŠM002162245 a IGA MZ ČR (NR9317).

### Literatura:

- Gebhart, E.: Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104(1-4):352-8.
- Largo C, Saez B, Alvarez S, et al.: Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocation. *Haematologica/the hematology journal.* 2007; 92: 795-802.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(2583): 818-821.
- Karhu R.: Improved methodology and potential clinical applications of comparative genomic hybridization. 1998;University of Tampere.
- Kirchhoff, M., Gerdes T., Rose H. et al.: Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry.* 1998;31:163-173.
- Vranová, V., Nečasová, E., Kuglík, P. et al.: Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncology Reports.* 2007;17, 2, p. 457-464.
- Vranová, V., Mentzlová, D., Oltová, A. et al: Efficacy of high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH) in detection of chromosomal abnormalities in children with acute leukemia. *Neoplasma.* 2008;55, 23-30.



## PRINCIP A VÝZNAM STUDIA EPIGENETIKY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### PRINCIPLES OF EPIGENETIC STUDIES IN MULTIPLE MYELOMA

BÁRTOVÁ E.<sup>1</sup>, KREJČÍ J.<sup>1</sup>, HARNIČAROVÁ A.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY v.v.i., BRNO

<sup>2</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Specifické přestavby chromozómů představují významné cytogenetické charakteristiky nádorových buněk a mnohočetný myelom (MM) není výjimkou. Změny v karyotypu jsou často doprovázeny řadou epigenetických modifikací, jak na úrovni DNA, tak i histonů. Mnoho změn v methylacích DNA nebo methylačních a acetylačních profilech histonů bylo popsáno pro geny zodpovědné za nádorovou transformaci buněk. Ve sdělení uvádíme přehled námi používaných metod při studiu epigenetiky u mnohočetného myelomu.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, genom, epigenom, chromatinová imunoprecipitace, exprese genů.

#### Summary

Chromosomal rearrangements can be frequently observed in tumor cells and multiple myeloma is not an exception. Karyotypic abnormalities of MM are accompanied by changes in the epigenome, including aberrant DNA/histone methylation and histone acetylation. Changes in DNA and/or histone methylation and histone acetylation were described for genes responsible for tumor cell transformation. Here we present methods used to study multiple myeloma epigenetics.

**Keywords:** multiple myeloma, genome, epigenome, chromatin immunoprecipitation, gene expression.

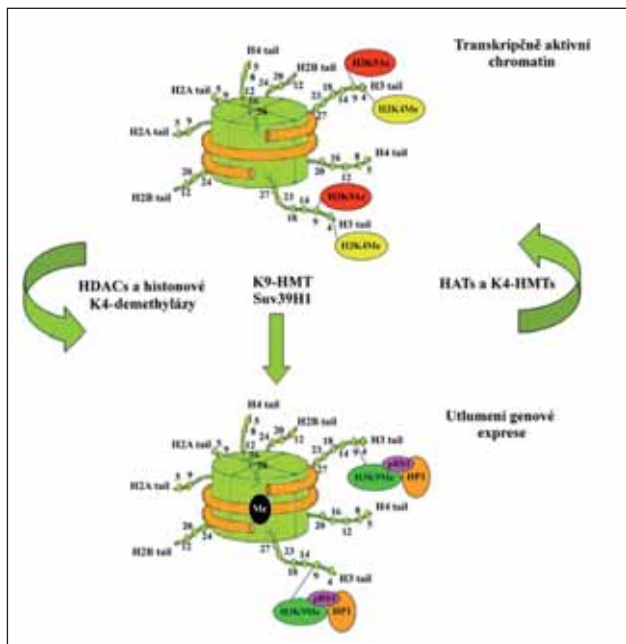
#### Úvod

##### Základní principy výzkumu epigenetiky

Genetické změny v nádorových buňkách jsou často doprovázeny různými epigenetickými modifikacemi kandidátních genů, které jsou asociovány s nádorovou transformací (7, 12). Epigenetika představuje dědičné změny ve fenotypu, které probíhají bez ohledu na změny v DNA sekvencích. Za hlavní epigenetický znak, často asociovaný s tumorigenezí, je považována methylace na úrovni DNA (3). Řada experimentů zabývajících se rozdíly v epigenetice normálních a nádorových buněk byla v minulosti směřována právě na studium DNA methylace (4, 7). Velký význam v terapii některých solidních nádorů, ale především myelodysplastického syndromu (MDS) a některých typů leukemií mají právě inhibitory enzymů zprostředkujících DNA methylaci (Dnmts). V tomto směru patří některé české laboratoře k nejvýznamnějším světovým vědeckým pracovištím, které se věnují zejména syntéze a laboratornímu testování nových derivátů inhibitorů Dnmts, jako jsou deriváty 5-azacytidinu a 5-aza-2'-deoxycytidinu (1, 2). Paralelně s DNA methylací se v genomu vyskytují různé typy modifikací histonů, kdy jako nejvýznamnější se jeví methylace N-terminálních konců histonu H3, a to především na jeho lysinových (K) reziduiích (Obrázek č. 1). Různé typy methylace histonů jsou považovány za důležitý epigenetický znak, který je zodpovědný jak za transkripční aktivitu, tak i utlumení exprese genů. Disba-

lance v epigenetických procesech vede k nádorové transformaci buněk. Je známo, že chromatin, který obsahuje velké množství transkripčně aktivních genů, je charakteristický vysokou mírou acetylace histonů a dále přítomností methylací typu H3K4, H3K36, H3K79. Na druhou stranu, transkripčně neaktivní lokusy nesou epigenetické znaky typu H3K9, H3K27 a H4K20 methylací, které se vyskytují ve formě mono-, di- a nebo tri-methylací (5). Utlumení genové exprese je spojeno s funkcí různých enzymů, které se uplatňují při formování epigenomu. Za jeden z těchto důležitých proteinů je považována histonová methyltransferáza (HMT), zvaná Suv39H1 (9). Tento enzym je zodpovědný za H3K9 methylaci, která představuje vazebné místo pro důležitý protein asociovaný s heterochromatinem (HP1). Zmíněný komplex se například uplatňuje v represivní funkci retinoblastomového proteinu pRb, který je zodpovědný za regulaci transkripce některých lokusů (8). Velký význam z hlediska protinádorové terapie mají inhibitory histonových deacetyláz (HDAC), které vedle histonových acetyltransferáz (HAT) zprostředkují procesy acetylace histonů. Navíc bylo zjištěno, že změny v mnoha jaderných funkcích mohou být indukovány ne-standardní aktivitou DNA methyltransferáz. Například exprese nádorově supresorového TP53 genu může být ovlivněna zmíněnými epigenetickými procesy (3), kdy po použití inhibitoru Dnmts zebularinu bylo zjištěno, že původní transkripce TP53 genu byla obnovena. Z výše uvedených

poznatků plyne, že studium epigenetických jevů je žádoucí především z hlediska pochopení nádorové transformace buněk a rovněž i z hlediska nádorové terapie.



**Obrázek č. 1:** Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom, který se skládá z oktameru histonů H2A, H2B, H3 a H4 a dvouřetězcové DNA o velikosti 146 párů bází. Obrázek nukleosomu znázorňuje N-terminální konce jednotlivých histonů, které vyčnívají z každého nukleosomu. V obrázku jsou uvedeny příklady nejčastějších epigenetických modifikací histonů transkripčně aktivního a neaktivního chromatinu a důležité proteiny regulující modifikace histonů a genovou expresi. V obrázku jsou použity zkratky H3K9Ac (acetylace); H3K4Me a H3K9Me (methylace histonů); HAT (histonové acetyltransferázy), HDAC (histonové deacetylázy); HMTs (histonové methyltransferázy); HP1 (heterochromatinový protein 1); pRb (retinoblastomový protein) a Me v černém kolečku znamená DNA methylace. Obrázek nukleosomu byl upraven podle <http://chemistry.gsu.edu/faculty/Zheng/>.

Výskyt epigenetických modifikací histonů může být studován různými metodami. Jako nejvýznamnější se jeví chromatinová imunoprecipitace (ChIP), která v kombinaci s PCR poskytuje informace o epigenetických změnách ve vybraných lokusech. Daleko rozsáhlejší poznatky jsou získány při použití ChIP-on-chip microarray technologie, která slouží k mapování epigenetických procesů v rozsahu celého genomu. Zmíněné metody jsou založeny na selekci specificky modifikovaných histonů, a to pomocí monoklonálních protilátek, kdy experimentálně vytvořený DNA-histon-imunokomplex je zpracován tak, aby získaná ChIP-DNA mohla být použita buď pro PCR analýzy vybraných genů a nebo pro DNA microarrays (chip). Detekce změn v DNA methylaci může být například provedena pomocí různých methylačně senzitivních enzymů a PCR nebo s využitím DNA methylačních microarrays. Uvedené metody zatím nemají přímé klinické uplatnění, ale v budoucnu by měly vést k pochopení rozdílů mezi genomem a epigenomem normálních a nádorově transformovaných buněk. Rovněž by tyto metody měly přispět k ověření účinnosti inhibitorů Dnmts, HDAC nebo nově i inhibitorů HMTs v klinické praxi. Dále tyto techniky představují slibný nástroj k posouzení cílených zásahů cytostatik do

lokusů, které jsou důležité z hlediska nádorové transformace nebo naopak nádorové suprese.

### Metodiky

#### Konvenční chromatinová imunoprecipitace (ChIP) kombinovaná s PCR

Vazba mezi histony a DNA byla vytvořena pomocí fixace buněk paraformaldehydem po dobu deseti minut, při 37 °C. Finální koncentrace formaldehydu byla 1%. Po odstranění kultivačního media byly buňky dvakrát opláchnuty studeným PBS pufrem, který obsahoval inhibitory proteáz (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µg/ml aprotinin and 1µg/ml pepstatin A). Další experimentální postup byl prováděn podle protokolu k ChIP assay kitu (Upstate, USA, #17-295). Podle zmíněného protokolu byly buňky lyzovány a sonikovány tak, abychom získali fragmenty DNA o délce 200 až 1000 pb. Úspěšnost sonikace byla ověřena na 1% agarózovém gelu. Takto připravený vzorek, obsahující DNA-histonový komplex, byl imunoprecipitován. V našem případě jsme použili následující protilátky: anti-acetyl H3K9 (Upstate, USA, #06-942) a anti-dimethyl H3K9 (Upstate, USA, #07-212). Po promytí DNA-histon-imunokomplexu následovalo zahřátí vzorku na 65 °C, což uvolnilo vazbu mezi histony a DNA, která byla dále izolována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (QIAGEN #51304). Po stanovení koncentrace a čistoty DNA byly vzorky použity v klasické PCR reakci. PCR produkty byly vizualizovány pomocí 2% agarózového gelu. Množství imunoprecipitované DNA bylo normalizováno na množství vstupní DNA (tzv. input), která představuje 2% buněčného lyzátu, který byl získán před imunoprecipitací. V popsáných experimentech byly studovány H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace u myelomových CD138/CD138<sup>+</sup> linií ARH-77 a MOLP-8 ovlivněných cytostatiky a gama zářením a v CD138/CD138<sup>+</sup> buněčné frakci získané z kostní dřeně pěti pacientů s diagnostikovaným MM.

#### ChIP-on-chip experimenty a analýzy

Acetylace histonu H3 v pozici lysinu 9 (K9) byla studována pro stovky promotorů vybraných genů pomocí RefSeq Promoters Array (NimbleGen, Systems, Inc., USA), s využitím RefSeq databáze. Použili jsme následující typ microarray: 2006-07-18\_HG18\_RefSeq\_promoterapronize uvedené účely byla porovnána ChIP-DNA a vstupní DNA, která byla izolována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (QIAGEN #51304). DNA amplifikace byla provedena pomocí "Ligation mediated PCR" (LM-PCR). V tomto případě jsme použili "GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit" (Sigma, Missouri, USA, #WGA2). Prvním krokem LM-PCR bylo přidání 2 µl 1x "Library Preparation Buffer" ke každému vzorku (10ng DNA), dále byl použit 1 µl "Library Stabilization Solution". Pak byly vzorky centrifugovány a umístěny na termální blok, který byl zahřátý na teplotu 95 °C po dobu 2 min a pak byly vzorky rychle chlazeny na ledu. Na závěr 1 µl "Library Preparation Enzyme" byl přidán ke vzorkům a proběhla inkubace při 16 °C, 24 °C, 37 °C (20 min každý krok) a potom při 75 °C po dobu 5 min. Vzorečky byly uchovány při 4 °C a skladovány při -20 °C, dokud neproběhla amplifikace v doporučeném pufru, za

následujících podmínek: úvodní denaturace byla při 95 °C, 3 min. (14 cyklů), pak při 94 °C po dobu 15 sec. Annealing/extenze probíhaly při 65 °C po dobu 5 min. Vzorečky byly purifikovány pomocí "PCR purification" kitu (QIAGEN #28104) a získaná ChIP-DNA byla rozpuštěna v deionizované vodě. Pak byla stanovena koncentrace DNA pomocí UV absorpce. Poměr OD260/280 musel být nejméně 1,7 a poměr OD260/230 nejméně 1,5. Kvalita DNA byla rovněž ověřena pomocí agarózového gelu a takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí RefSeq Promoters array (NimbleGen, Systems, Inc., USA). Statistická analýza byla provedena pomocí SignalMap softwaru, který byl poskytnut firmou NimbleGen, Systems, Inc., USA. Parametr  $\log_2$ -ratio představuje poměr vstupních signálů a signálů získaných z testovaného vzorku, který je hybridizován společně se vstupní DNA. Analýzy z laboratoří NimbleGen poskytují statistické zpracování dat, významnosti jsou uvedeny pro hodnoty tzv. "false discovery rate (FDR) score"  $\leq 0,05$ ;  $\leq 0,1$  a  $> 0,2$ , což představuje jednotlivé úrovně statistické významnosti výsledků.

#### Význam metody u MM stávající a očekávaný

Úroveň stanovení epigenetických změn u mnohočetného myelomu, ale i jiných nádorových onemocnění je stále experimentální. ChIP on chip, cDNA microarrays a DNA methylační microarrays by mohly v budoucnu rozšířit poznání klinického výzkumu, který testuje vliv cytostatik na expresi důležitých protoonkogenů a nádorově-supresorových genů. V rámci klinických studií jsou jedním ze zkoumaných typů léků rovněž různé inhibitory methylace DNA, či acetylace histonů. Lze tedy očekávat, že zmíněné metody budou užitečným nástrojem pro hodnocení efektu vybraných inhibitorů nebo predikci citlivosti pacienta na podaná léčiva.

Na druhou stranu zmíněné molekulárně-biologické metody vyžadují dostatečné množství klinického materiálu, což v případě separovaných CD138<sup>+</sup> buněk MM představuje náročné zpracování klinického materiálu. Rovněž ne u všech pacientů se podaří získat dostatečné množství buněčného materiálu pro příslušnou analýzu.

#### Diskuse a závěr

Z uvedených skutečností je zřejmé, že studium epigenetických změn u nádorových buněk je v současné době otázkou základního výzkumu. Naše výsledky však ukazují originální výstupy z ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz u klinických vzorků a dále poskytují užitečný návod, jak testovat a posoudit terapeutický potenciál cytostatik, které významně ovlivňují histonový kód. Pomocí ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz jsme došli k závěru, že řada cytostatik zvyšuje acetylaci v promotorech mnoha genů, které v našem případě byly studovány u vybrané myelomové buněčné linie a pacientů. Naše výsledky významně korelují se závěry experimentů autorů Turner et al. 2006 (11), kteří ukázali, že exprese genu kódujícího "breast cancer resistance protein" u pacientů s MM je regulována DNA methylacemi v promotoru daného lokusu. Podobné mechanismy zřejmě platí pro H3K9 acetylaci, která reguluje expresi CCND1 genu u buněk MM. Na druhou stranu u buněk MM bylo zjištěno, že exprese CCND1 genu je regulována procesy, které nejsou závislé na DNA methyloci a H4 acetylaci (6), avšak zvýšená CCND1 exprese je významně asociována s translokací t(11;14), která zahrnuje lokusy CCND1 a Igh (10).

#### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, AVOZ50040507 a AVOZ50040702.

#### Literatura

1. Fojtová M, Piskala A, Votruba I et al. Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer. *Pharmacol Res.* 2007;55:16-22.
2. Hájek M, Votruba I, Holý A et al. Alpha anomer of 5-aza-2'-deoxycytidine down-regulates hTERT mRNA expression in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:965-972.
3. Hodge D.R., Peng B., Cherry J.C. et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 2005;65:4673-4682.
4. Jones PA. DNA methylation and cancer. *Oncogene.* 2002;21:5358-5360.
5. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.
6. Krieger S., Gruntu C., Sabbah M., Sola B. Cyclin D1 gene activation in human myeloma cells is independent of DNA hypomethylation or histone hyperacetylation. *Exp Hematol.* 2005;33:652-659.
7. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002;62:6456-6461.
8. Nielsen S.J., Schneider R., Bauer U.M. et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature.* 2001;412:561-565.
9. Peters A.H., O'Carroll D., Scherthan H. et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001;107:323-337.
10. Pruneri G., Fabris S., Baldini L. et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am J Pathol.* 2000;156:1505-1513.
11. Turner J.G., Gump J.L., Zhang C. et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:3881-3889.
12. Zhu W.G., Hileman T., Ke Y. et al. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21/Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279:15161-15166.



### PŘÍKLADY VÝZKUMU EPIGENETICKÝCH ZMĚN U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

#### SELECTED EPIGENETIC CHANGES IN MULTIPLE MYELOMA

KREJČÍ J.<sup>1</sup>, BÁRTOVÁ E.<sup>1</sup>, HARNIČAROVÁ A.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY, v.v.i., BRNO

<sup>2</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V našich experimentech jsme se zaměřili na studium CD138<sup>+</sup> a CD138<sup>-</sup> buněk izolovaných z kostní dřeně pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem (MM). Studovali jsme epigenetické modifikace u myelomových buněčných linií, které byly ovlivněny klinicky využívanými cytostatiky. Chromatinová imunoprecipitace (ChIP) v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) nám umožnila studovat epigenetické profily, jako je H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace v promotorech a exonech genů, které jsou zodpovědné za patogenезi MM. Epigenetické modifikace těchto lokusů byly rovněž analyzovány u myelomových buněčných linií po ovlivnění vybranými cytostatiky. Pomocí ChIP-on-chip microarray analýzy jsme studovali v promotorech stovek genů zastoupení H3K9 acetylace, která je spojována se zvýšenou genovou expresí. Studium epigenetických změn u nádorových buněk je v současné době otázkou základního výzkumu. Naše výsledky ukazují originální výstupy z ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz u buněk pacientů s diagnostikovaným MM a buněčných linií ovlivněných cytostatiky. Naše experimenty poskytují užitečný návod, jak testovat a posoudit terapeutický potenciál cytostatik, které významně ovlivňují histonový kód.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, genom, epigenom, chromatinová imunoprecipitace, exprese genů

#### Summary

Epigenetic changes such as histone acetylation and di-methylation at promoters and coding regions of genes which play an important role in the pathogenesis of multiple myeloma (MM) can be analyzed using methods such as chromatin immunoprecipitation (ChIP) in combination with polymerase chain reaction (PCR). We have studied epigenetic changes in MM cells treated by selected cytostatics that are used in MM therapy. ChIP-on-chip or with microarrays (chip) analyses of histone acetylation enabled us to study epigenetic status of hundreds of genes after cytostatic treatment. This type of epigenetic modification is associated with increased gene expression. We have applied the ChIP-PCR and ChIP-on-chip methods to study epigenetics in MM cell lines as well as in clinical samples. Our experiments have led to the development of a useful method of assessing the therapeutic potential of cytostatic agents which have a significant impact on the histone code.

**Keywords:** multiple myeloma, genome, epigenome, chromatin immunoprecipitation, gene expression

#### Metodika a soubor pacientů

Epigenetické změny byly studovány pomocí ChIP-PCR a ChIP-on-chip metodologií. Pro analýzy se nám podařilo získat 4 vzorky CD138<sup>+</sup> a CD138<sup>-</sup> frakce separované z kostní dřeně pacientů s diagnostikovaným MM a dva vzorky lymfocytů zdravých dárců. Pro ChIP-on-chip analýzy jsme použili myelomovou buněčnou linii ARH77, která byla ovlivněna 20 μM Melphalanem. V tomto případě byly studovány změny v H3K9 acetylaci v promotorech stovek genů mapovaných na všech lidských chromozómech.

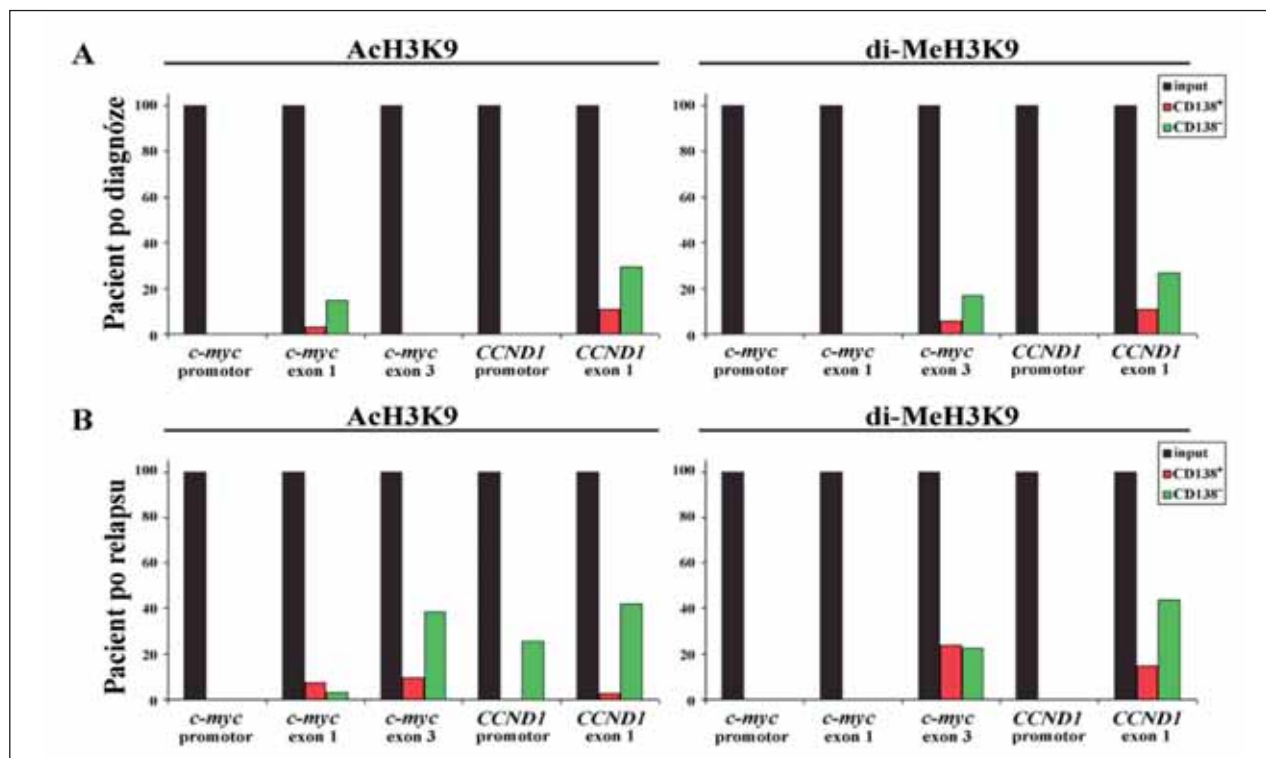
#### Výsledky epigenetických analýz

##### A) Změny v epigenetických modifikacích histonů u pacientů s diagnostikovaným MM

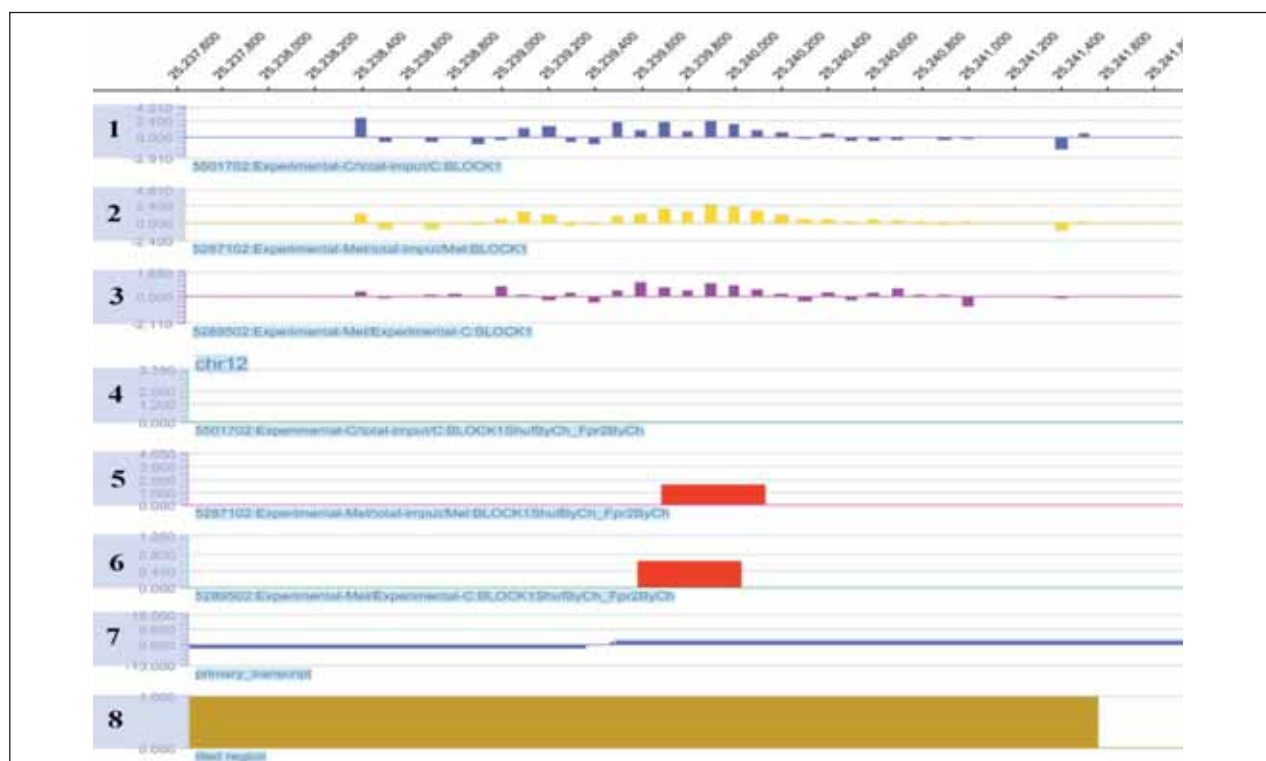
U buněk vybraných pacientů, s infiltrací CD138<sup>+</sup> buněk v kostní dřeni vyšší než 80 %, byla provedena chromatinová imunoprecipitace (ChIP). Změny v epigenetických profilech CD138<sup>+</sup> buněk byly porovnávány s CD138<sup>-</sup>

frakcí buněk každého pacienta a s ChIP-DNA získanou z lymfocytů periferní krve zdravých dárců. U některých pacientů jsme zjistili zvýšenou H3K9 dimethylaci v c-myc a CCND1 lokusech, obzvláště v CD138<sup>+</sup> frakci. Ve většině případů CD138<sup>-</sup> frakce a u lymfocytů periferní krve nebyla zjištěna H3K9 dimethylace ve vybraných lokusech, které jsou prognosticky významné z hlediska MM. U čtyř pacientů jsme pozorovali různé změny v H3K9 acetylaci a dimethylaci a tyto změny byly velmi heterogenní, pravděpodobně ovlivněné terapií. CD138<sup>+</sup> frakce, získaná z kostní dřeně pacientů, byla navíc často H3K9 acetylována, zatímco CD138<sup>-</sup> buňky a lymfocyty byly deacetylovány v promotorech a vybraných exonech genů c-myc a CCND1. Zvýšená acetylace, především v promotorech genů, je obecně spojována se zvýšenou expresí genů. V našem případě to byly geny zodpovědné za regulaci buněčného cyklu, tudíž za buněčnou proliferaci. Přítomnost H3K9 dimethylace, zodpovědné za utlumení transkripce,

## příklady využití



**Obrázek č. 1:** ChIP-PCR analýza H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace u CD138+ a CD138- buněk získaných z kostní dřeně pacienta s diagnostikovaným MM. Analýza byla provedena v čase diagnózy MM (A) a po léčbě thalidomidem a po relapsu onemocnění (B). Zvýšená H3K9 acetylace především v oblasti CCND1 upozorňuje na zvýšenou expresi CCND1 genu, která je často spojována s nepříznivou prognózou MM.



**Obrázek č. 2:** Příklad ChIP-on-chip analýzy (NimbleGen, Systems, Inc., USA) podle RefSeq databáze (2006-07-18\_HG18\_RefSeq\_promoter) stanovující H3K9 acetylaci v promotoru genu CASC1. Tento lokus nebyl významně acetylován v kontrolních buňkách myelomové linie, zatímco melphalan indukoval rozsáhlou H3K9 acetylaci v této oblasti genomu. Řádky 1-3 představují  $\log_2$  poměr pro srovnání kontrolní ChIP-DNA a vstupní DNA (1), dále srovnání melphalan ChIP-DNA a vstupní DNA (2) a jako další ověření byly společně hybridizovány vzorky kontrolní ChIP-DNA a melphalan ChIP-DNA (3). Řádky 4-6 vyjadřují tzv. "false discovery rate (FDR) score" pro řádky 1-3; červený sloupec ukazuje  $FDR \leq 0,05$ , čili statisticky významný rozdíl. Řádek 7 ukazuje primární transkript podle RefSeq databáze a řádek 8 ukazuje oblasti blízké promotoru studovaného genu CASC1.

ve vybraných oblastech genů u pacientů s MM představuje zajímavý epigenetický znak, jehož význam by měl být dále studován.

### **B) Vliv cytostatik na epigenom pacienta s diagnostikovaným MM**

Pro naše analýzy se nám podařilo získat vzorky pacienta v době diagnózy MM, po následné terapii thalidomidem a po relapsu onemocnění. V druhém případě jsme zjistili zvýšený výskyt acetylce H3K9 ve vybraných sekvencích genu *c-myc* a *CCND1* (Obrázek č. 1). Obzvláště exon 3 *c-myc* genu a promotor *CCND1* genu byly významně H3K9 acetylovány po působení cytostatik a po relapsu. H3K9 dimethylace se vyskytovala v exonu 3 *c-myc* genu a exonu 1 *CCND1* lokusu v čase diagnózy, ale thalidomid a relaps nezměnil profil této epigenetické modifikace (Obrázek č.1). U zmíněného pacienta nebyla zjištěna přítomnost často se objevujících translokací asociovaných s MM, a to t(11;14) a t(4;14), tudíž zmíněné epigenetické změny nejsou pravděpodobně spojené s těmito přestavbami chromozómů. Zvýšená acetylce v daném lokusu pravděpodobně ukazuje na zvýšenou transkripční aktivitu obou studovaných genů, především *CCND1* u MM pacienta po léčbě thalidomidem a během relapsu.

### **C) Melphalan zvyšuje H3K9 acetylaci některých genů u myelomových buněčných linií**

ChIP-on-chip analýza, cílená na promotory stovek genů, nám umožnila studovat H3K9 acetylaci u myelomových buněk ovlivněných melphalanem, který se používá v léčbě mnohočetného myelomu. V našich experimentech melphalan významně modifikoval proliferační charakteristiky buněk. V těchto analýzách jsme se zaměřili na lokusy významné z hlediska diagnózy a prognózy MM. Zaměřili jsme se na lokus 1q21, jehož amplifikace je často asociována s nepříznivou prognózou (2, 4). Dále jsme analyzovali acetylační status genů *RAN* (6p22.3), *ZHX-2* (8q24.13), *CHC1L* (13q14.2), jejichž nestandardní exprese byla spojována s rychlým relapsem onemocnění (3). Dále jsme studovali H3K9 acetylaci u lokusů *CCND1*, *c-myc*, *Rb1* a *TP53*. Velmi nízká H3K9 acetylce byla zjištěna pro oblast 1q21 zahrnující lokusy *BCL-9*, *MCL-1*, *JTB* a *IL6R*. Na druhou stranu *AF1Q* gen, rovněž mapován v této oblasti, byl silně acetylován, ale melphalan neměnil acetylační

profil tohoto genu. Nízká H3K9 acetylce byla pozorována u genů *RAN*, *ZHX-2*, *CCND1*, *Rb1*, avšak *TP53* nádorově supresorový gen byl charakteristický vysokou mírou H3K9 acetylce. V mnoha lokusech bylo zjištěno, že melphalan zvyšuje studovanou epigenetickou modifikaci, takovým příkladem je *CASC1* gen (cancer susceptibility candidate 1), jehož zvýšená H3K9 acetylce po působení melphalanu je uvedena v Obrázku č.2.

### **Diskuze a závěr:**

V uvedených příkladech jsme analyzovali změny v epigenetických profilech pacientů s diagnostikovaným MM. Zaměřili jsme se především na hlavní znak transkripčně aktivních lokusů, a to na H3K9 acetylaci a znak heterochromatinu H3K9 dimethylaci. U čtyř pacientů, jejichž vzorky byly vhodné pro ChIP analýzy, jsme zjistili nejednotný profil epigenetických modifikací v promotorech a exonech *c-myc* a *CCND1* genů. Pomocí ChIP-on-chip analýz jsme došli k závěru, že melphalan zvyšuje acetylaci v promotorech mnoha genů, které byly studovány u vybrané myelomové buněčné linie. Zvýšenou H3K9 acetylaci v *c-myc* a *CCND1* genech jsme rovněž pozorovali u pacienta, který byl léčen thalidomidem.

V experimentech, které byly publikovány Wachtersem et al. 2005 (5), bylo ukázáno, že melphalan, používaný v léčbě MM, má schopnost indukovat vazby mezi řetězci DNA, stejně tak jako to bylo popsáno například pro cisplatinu. V práci Bártová et al. 2003 (1) jsme studovali vliv cis-platiny na numerické aberace a strukturu *TP53* a *Rb1* genů. V tomto případě jsme zjistili významné změny v jaderném uspořádání vybraných lokusů. Z tohoto důvodu byl testován melphalan a jeho vliv na genom a epigenom u myelomových buněčných linií. Jak již bylo uvedeno, melphalan u MM linií a pravděpodobně i thalidomid u pacienta zvyšují H3K9 acetylaci, tudíž transkripční aktivitu některých lokusů. Výsledky těchto experimentů tedy naznačují, že ChIP analýzy by mohly v budoucnu rozšířit poznání klinického výzkum, který testuje vliv cytostatik na expresi různých klinicky významných genů.

### **Poděkování**

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, AVOZ50040507 a AVOZ50040702.

### **Literatura**

1. Bártová E., Kozubek S., Gajová H. et al. Cytogenetics and cytology of retinoblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129:89-99.
2. Hanamura I., Stewart J.P., Huang Y. et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood.* 2006;108:1724-1732.
3. Harousseau J.L., Shaughnessy J. Jr., Richardson P. Multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004;237-256.
4. Sonneveld P. Gain of 1q21 in multiple myeloma from bad to worse. *Blood.* 2006;108:1426-1427.
5. Wachters F.M., Wong L.S., Timens W. et al. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. *Lung Cancer.* 2005;50:211-219.

## VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR (KVANTITATIVNÍ PCR, PCR V REÁLNÉM ČASE) V HEMATOLOGII A STUDIU MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### APPLICATIONS OF REAL-TIME PCR IN HEMATOLOGY WITH SPECIAL FOCUS ON MULTIPLE MYELOMA

DUDOVÁ S.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Real-time PCR je citlivá metoda pro analýzu RNA založená na základě měření fluorescence. Je využívána v základním výzkumu, molekulární medicíně a v biotechnologiích. Kvantitativní PCR je jednoduchá, s vysokou citlivostí a spolehlivostí. Tato technika se rychle rozvíjí s objevem nových enzymů, chemikálií a přístrojů a slouží mimo jiné k potvrzení dat získaných pomocí sledování genové exprese mikročipovou analýzou. Tato práce seznamuje s principem real-time PCR a popisuje její využití ve studiu mnohočetného myelomu a celkově v hematologii.

**Klíčová slova:** real-time PCR, kvantitativní PCR, mnohočetný myelom

#### Summary

Real-time PCR is a sensitive method for RNA analysis based on fluorescence measurement. It is used in basic research, applied molecular medicine, and biotechnology. Real-time PCR assays are easy to perform and combine high sensitivity with reliability. The technology is evolving rapidly with the introduction of new reagents and instrumentation. It can be used for the confirmation of data acquired by microarray analysis of gene expression. We review basic principles of real-time PCR and describe its application in hematology and especially in multiple myeloma research.

**Keywords:** real-time PCR, quantitative PCR, multiple myeloma

#### Úvod

Každý typ buňky vytváří svůj soubor molekul mediátorové RNA (mRNA), tzv. transkriptom. Jako odpověď na stimul jsou buňky schopny zvyšovat nebo snižovat hladinu mRNA, které jsou poté překládány do proteinů. Použití cDNA mikročipů umožňuje detekovat v jednom experimentu změnu exprese až u 30 000 genů. S rozvojem nových metodik detekce genové exprese se objevuje potřeba jednoduchého a rychlého stanovení hladiny vybraných transkriptů. Toto splňuje metoda real-time PCR (kvantitativní PCR). Detekce pomocí kvantitativní PCR je charakteristická vysokou specifitou a citlivostí. Hladina mRNA byla dříve stanovována pomocí Northern blotu. Tato metoda bývá označována jako zlatý standard v měření genové exprese/hladiny mRNA. Používá radioaktivně značenou sondu komplementární k příslušné testované RNA. Po separaci transkriptů na elektroforéze a jejich přenesení na membránu, je reakce s radioaktivní sondou detekována na filmu. Tato technika je spolehlivá, její nevýhodou je však nižší citlivost, nutnost práce s radioaktivním materiálem a dostatečné vstupní množství RNA. V posledních letech byl Northern blot nahrazen metodou real-time PCR, která eliminuje zmiňované nevýhody.

#### Co je to real-time PCR?

Real-time PCR (kvantitativní PCR) je metodika založená na polymerázové řetězové reakci (PCR), objevené Kary Mullisem v roce 1983. V klasické PCR je amplifikovaný produkt (amplikon) detekován po skončení reakce elektroforeticky. Naproti tomu real-time PCR umožňuje měření zmnoženého produktu v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time). Detekce produktů reakce je umožněna využíváním fluorescenčních molekul, které odpovídají množství amplifikované DNA v každém cyklu. Tyto fluorescenční chemikálie mohou být barviva vázající se na DNA a nebo sekvenčně specifické primery či sondy. Protože hledaná sekvence DNA může být stanovena jak kvalitativně, tak i kvantitativně (počet kopií DNA), je real-time PCR označována také jako kvantitativní PCR (qPCR). Výhodou této metody je široký rozsah kvantifikace v řádu 7-8 logaritmických dekád, vysoká senzitivita (< 5 kopií) a vysoká přesnost (< 2% standardní odchylka) (3, 8). Vysoká specifita reakce je zajištěna třemi oligonukleotidy: dvěma primery a jednou sondou. První zmínka o real-time PCR se objevuje v roce 1992 (7). Reakce byla založena na interkalaci barviva ethidium bromid a amplifikaci zajišťoval upravený termální cykly pro ozařování vzorků ultrafialovým světlem a detekci fluorescence CCD kamerou.



## přehled

V současné době jsou pro detekci produktů využívány převážně čtyři různé metody. Nejjednodušší a nejlevnější varianta je založena na interkalaci fluorescenčních látek, které se váží na dvouřetězcovou DNA. Interkalární barvivo SYBR Green I se váže do malého žlábků dvouřetězcové DNA. Během PCR amplifikace se zvyšuje počet dsDNA produktů exponenciálně a tím se zvyšuje i množství barviva, které se na ně váže. Fluorescenční signál je nejvyšší na konci každé exponenciální fáze, v následující denaturační fázi je minimální. Detekce PCR produktů pomocí SYBR Green I není sekvenčně specifická, během reakce mohou vzniknout nespecifické PCR produkty a nebo produkty vzniklé reakcí samotných primerů (primer-dimery). Zbývající tři přístupy vychází z vazby fluorescenčně značených oligonukleotidů. V současnosti jsou nejvíce rozšířeny hydrolyzační sondy, tzv. Taqman systému. Krátká oligonukleotidová sonda komplementární k jednomu z řetězců obsahuje na jednom konci fluorescenční látku (tzv. reportér, např. FAM, VIC nebo JOE) a na druhém konci zhášec fluorochromu (např. TAMRA). Protože je v intaktní formě zhášec v blízkosti fluorochromu, je fluorescence vyzářená reportérem „absorbována“ zhášečem a není tak měřitelná (10). Při syntéze komplementárních vláken dochází 5'→3' aktivitou Taq DNA polymerázy k hydrolyze sondy, separaci reportérové molekuly a zhášec a tím k nárůstu fluorescence. Během dalších cyklů se fluorescence dále zvyšuje z důvodu exponenciálně se zvyšujících volných molekul fluorochromu. V závislosti na počtu cyklů, případně z kalibrační křivky paralelně amplifikovaného standardu, je pak možno stanovit koncentraci mRNA studovaného genu v neznámém vzorku (6, 5). Existují také další typy sond, například molekulární majáky (19), škorpiony nebo hybridizační sondy (21).

Existují dvě kvantifikační strategie – absolutní a relativní. Při absolutní kvantifikaci je stanovován přesný počet kopií templátu ve vzorku, zatímco relativní stanovení sleduje změny množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole. Jako interní kontrola (tzv. housekeeping gen) se používá gen, který má podobnou hladinou exprese v jednotlivých testovaných vzorcích, bez vztahu k buněčnému cyklu nebo aktivaci buněk (13). Nejčastěji se využívá gen pro albumin, β-aktin, β-globin nebo GAPDH (20, 16, 14, 9).

Hladiny RNA neodpovídají vždy hladině proteinů produkovaných buňkou z důvodu posttranskripčních úprav a regulace translace. I když kvantitativní PCR je citlivou a přesnou metodou, relevantní závěry o studovaných dějích vyžadují další informace o proteinové hladině a aktivitě.

### Specifické problémy a nastavení u mnohočetného myelomu

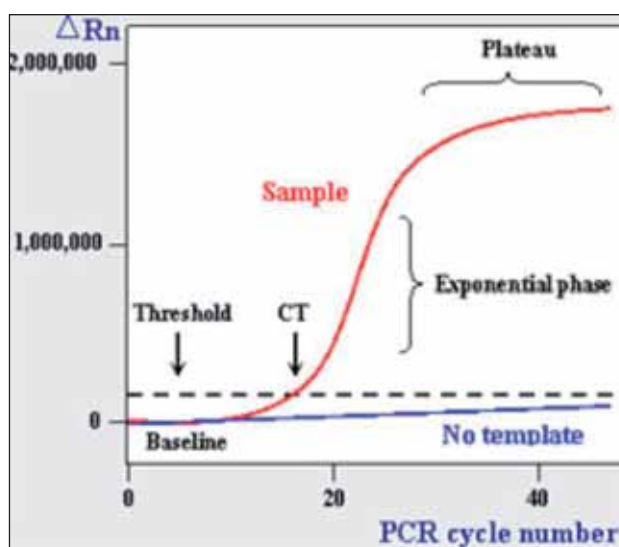
Pro stanovení genové exprese v testovaném vzorku je nutné zajistit v dostatečném množství a čistotě CD138 pozitivní buňky. Pro tento účel lze využít magnetické nebo flowcytometrické separace (MACS, FACS). Čistota potřebná pro analýzu (≥ 90% MM buněk) je stanovována morfologicky a s využitím průtokové cytometrie (1).

Pro sledování genových expresních profilů je důležité rychlé zpracování a izolace RNA po separaci CD138 pozitivních buněk. Expresce genů se rychle mění nejen v průběhu růstu a diferenciaci buněk, ale také jako reakce na změny prostředí. Zpoždění zpracování vzorků již o tři ho-

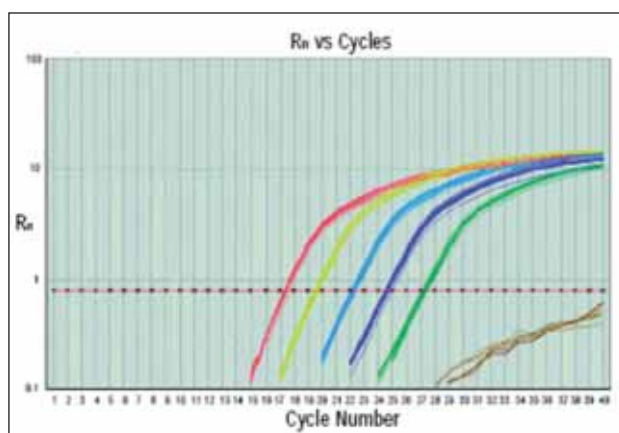
diny vede k podstatným změnám v genové expresi (2, 15). Pro expresní studie je nutné snížit čas nezbytný do izolace RNA (4).

### Ukázka reprezentativního výsledku

Amplifikační graf je zobrazení fluorescenčního signálu v závislosti na počtu cyklů (Obrázek č.1). V počátečních cyklech PCR je detekován pouze malý fluorescenční signál. Zvýšení signálu nad tzv. prahovou hodnotu značí počátek detekce hromadícího se produktu. Pro každý sledovaný gen je stanovena tzv. Ct hodnota (threshold cycle). Parametr Ct udává číslo cyklu, ve kterém fluorescence dosáhla nad prahovou hodnotu. Čím vyšší je počáteční množství vzorku, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota Ct. Výhodou parametru Ct je jeho dobrá reprodukovatelnost.

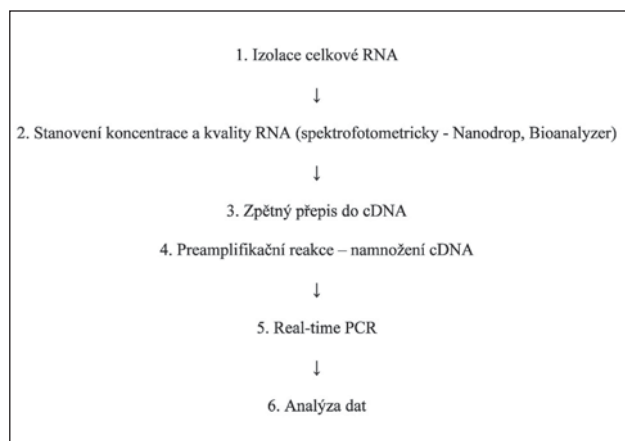


Obrázek č. 1: Detekce produktu real-time PCR a stanovení Ct hodnoty. Pevzato z <http://www.rt-pcr.com/>. Osa y představuje počet kopií genu, osa x počet cyklů amplifikace. Parametr Ct (threshold cycle) je definován jako číslo cyklu, ve kterém emise fluorescence překročí prahovou hodnotu (threshold). Čím nižší hodnota Ct, tím více kopií sledovaného genu je přítomno ve vzorku. Amplifikační graf vykazuje sigmoidální průběh s exponenciální, lineární a plató fází.



Obrázek č. 2: Stanovení fluorescence během 40 amplifikačních cyklů u vzorků se snižující se koncentrací DNA (červená až zelená křivka) a kontroly bez DNA templátu (hnědá křivka). Pevzato u <http://www.biotechnologie.unibo.it/capranicolab/realtime.php>

**Schéma 1:** Metody real-time PCR:



## Aplikace real-time PCR u mnohočetného myelomu

Metoda real-time PCR se ve studiu mnohočetného myelomu používá pro monitorování minimální zbytkové choroby (MRD minimal residual disease) a umožňuje tak předpovědět relaps onemocnění (12). Spolu s mikročipovou analýzou slouží ke stanovení exprese genů, které jsou spojová-

ny s přežitím pacientů či rezistencí na léčbu (17). Metoda umožňuje také stanovit míru exprese nádorových antigenů u myelomových buněk a tak posoudit vhodnost jejich použití v imunoterapii (18). V laboratořích Univerzitého výzkumného centra – CMG byl připraven panel genů významných u mnohočetného myelomu, jejichž exprese je sledována pomocí real-time PCR. Tyto geny podávají informaci o prognóze pacientů a jejich případné rezistenci na léčbu.

## Závěr

Analýza hladiny genové exprese pomocí kvantitativní amplifikace mRNA nalézá svůj význam v základním výzkumu, farmakogenomice a molekulární diagnostice. Při plánování designu experimentu je třeba provést rozhodnutí, zda expresi stanovovat pomocí absolutní nebo relativní kvantifikace a provést výběr vhodné interní kontroly. I když kvantitativní PCR je citlivá a přesná metoda v klinické diagnostice, musí být použita vhodně s vědomím určitých omezení.

## Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

## Literatura

- Agnelli L, Biccato S, Mattioli M et al. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J Clin Oncol.* 2005; 23(29):7296-306
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 2004; 5(5):347-53
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25(2):169-93
- Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M, Gathof BS, Pillai R, Zander T, Schultze JL. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(3):193-207
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):995-1001
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10):986-94
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992; 10:413-417
- Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P et al. Influence of pre-assay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001; 26(1):8-20
- Ladetto M, Omedè P, Sametti S et al. Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol.* 2002 ;30(6):529-36
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Jun;4(6):357-62
- Mahtouk K, Hose D, Raynaud P et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2007; 109(11):4914-23
- Martinez-Lopez J, Martinez-Sanchez P, Garcia-Sanz R et al. Application of self-quenched JH consensus primers for real-time quantitative PCR of IGH gene to minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *J Mol Diagn.* 2006; (3):364-70
- Nakamura H, Dan S, Akashi T et al. Absolute quantification of four isoforms of the class I phosphoinositide-3-kinase catalytic subunit by real-time RT-PCR. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(6):1181-4
- Pfützner T, Reiser M, Barth S et al. Quantitative molecular monitoring of residual tumor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2002 ;81(5):258-66
- Radich JP, Mao M, Stepanians S et al. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics.* 2004; 83(6):980-8
- Rasmussen T, Poulsen TS, Honoré L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol.* 2000; 28(9):1039-45
- Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007;109:2276-2284
- Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA et al. SSX cancer testis antigens are 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.* 2005; 28(6):564-75
- Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996;14(3):303-8
- van der Velden VH, Joosten SA, Willemsse MJ, van Wering ER et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15(9):1485-7
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997;22(1):130-1, 134-8

### 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.<sup>1,2,3</sup>, KADLECOVÁ J.<sup>4</sup>, SPĚŠNÁ R.<sup>4</sup>, PENKA M.<sup>5</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,6</sup>

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

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PDM

<sup>5</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

<sup>6</sup> 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 *Chenem 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 izoforem, které byly uspořádány do 44 rodin. Exprese CT genů v maligních nádorech je reaktivována hypometylační promotovorých 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)

Analyzovaný soubor		Expres genů		
		MAGE-A1	MAGE-A3	MAGE-A1 a 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



## příklady využití

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. Expresse různých CT antigenů v nádorech je v pozitivní korelaci, což naznačuje, že tyto geny mohou být aktivovány společnými mechanismy, např. demetylace (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

1. 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.
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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest.* 2002;20(2):222-36.
11. 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.
12. 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.
13. Monte M, Simonatto M, Peche 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.
14. Myajima Y, Kato K., Nemata S.-I., et al. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyroxine hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995;75:2757-2761.
15. 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.
16. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 2001 Mar 30;1:1.
17. 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.
18. Pellat-Deceunynck C, Mellerin MP, Labarriere 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.
19. Pellat-Deceunynck C. Tumour-associated antigens in multiple myeloma. *British Journal of hematology.* 2003; 120: 3-9.
20. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):615-25.
21. 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, Ruiters 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*

### **3<sup>RD</sup> MYELOMA WORKSHOP A 1<sup>ST</sup> 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*
- ❖ *zamražování a bankování myelomových vzorků*
- ❖ *nádorová imunoterapie*

*Pro více informací pište na: [petrovic@med.muni.cz](mailto: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*

### **3<sup>RD</sup> MYELOMA WORKSHOP AND 1<sup>ST</sup> IMMUNOTHERAPY WORKSHOP**

*at the University Campus Brno, building A3, Kamenice 5, on  
October 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup>, 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](mailto:petrovic@med.muni.cz)*

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

**Professor Jaroslav Michalek, MD PhD**  
Chairman of UCIC

### VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR VYBRANÝCH GENŮ U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

#### REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION OF EXPRESSION OF CRITICAL GENES IN MULTIPLE MYELOMA

DUDOVÁ S.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Real-time PCR je metoda, která se používá pro sledování hromadění produktů polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Je schopna detekovat již minimální množství nukleových kyselin s vysokou přesností a citlivostí. Tato technika se v laboratoři uplatňuje jak při stanovení diagnózy, tak ve výzkumu. V diagnostice umožňuje kvantitativní PCR detekci genů, které se hrají roli v rozvoji infekčního onemocnění, nádorů a genetických abnormalit. Ve výzkumu umožňuje metoda vysoce citlivé kvantitativní měření genové transkripce. V laboratoři může být použita pro stanovení změn genové exprese určitého genu v čase jako odpověď buněk po podání léku, v diferenciaci buněk nebo jako reakce na změnu podmínek prostředí. Tato práce se zaměřuje na využití real-time PCR při studiu mnohočetného myelomu.

**Klíčová slova:** real-time PCR, kvantitativní PCR, mnohočetný myelom, genová exprese.

#### Summary

Real-time PCR is a method used to monitor the amplification of polymerase chain reaction products in real time. It is able to detect minimal amounts of nucleic acid with high specificity and sensitivity. This technique is used both for diagnostic and research applications. Diagnostic real-time PCR enables the detection of genes involved in infectious diseases, cancer and genetic abnormalities. In the research setting, real-time PCR is used to provide highly sensitive quantitative measurements of gene transcription. The technique may be used to determine the genetic expression of a particular gene and its changes over time, e.g. in the analysis of cellular response to a therapeutic agent or to changes in the microenvironment, or to assess the progression of cell differentiation.

**Keywords:** real-time PCR, quantitative PCR, multiple myeloma, gene expression.

#### Minimální reziduální onemocnění

V klinické onkologii se metoda real-time PCR používá pro monitorování minimální zbytkové choroby (MRD minimal residual disease) zodpovědné za relaps onemocnění, což umožňuje předpovědět progresi onemocnění. Pro detekci MRD v hematologii je využíváno nejčastěji přeskupení imunoglobulinových genů a genů pro T-lymfocytární receptor TCR.

U myelomových plazmatických buněk vzniká v průběhu přeskupování genových segmentů imunoglobulinového těžkého řetězce (IgH) jedinečný klonotypický marker – oblast určující komplementaritu (CDR3). Kvantifikace reziduálních myelomových buněk může být použita jako prognostický faktor a marker účinnosti léčby (16, 17, 15).

Po allogenní transplantaci kmenových buněk mohou nastat komplikace způsobené akutní reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD). Znalost sekvence β-řetězce TCR receptoru jednotlivých T-buněčných klonů umožňuje sledovat přítomnost klonů specifických pro reakci štěpu proti hostiteli a reakci štěpu proti leukémii od pacientů po allogenní transplantaci kmenových buněk (11, 12). Alloreaktivní klony T-lymfocytů způsobující GVHD mohou být před transplan-

tací identifikovány a kvantitativně monitorovány pro časné zahájení imunosupresivní léčby před propuknutím GVHD. Také další práce potvrdily roli odlišných klonů T-lymfocytů u GVHD a GVM (reakce štěpu vůči myelomu) u mnohočetného myelomu (MM) (4).

Voena a kolektiv sledovali souvislost mezi onemocněním reakce štěpu proti hostiteli a odpovědí pacienta na onemocnění. S použitím kvantitativní PCR prokázali, že perzistentní molekulární onemocnění se s časem dynamicky mění. (25).

#### Stanovení prognózy

V souvislosti se změnami v karyotypu u pacientů s MM, jako jsou například delece chromozomu 1 a 13 nebo reciproké translokace lokusu pro těžký řetězec (IgH) zahrnující chromozomy 4, 11, 14 a 16, dochází ke změně exprese genů, které jsou umístěny ve zmiňovaných oblastech (14). Pro nádorové buňky je typická zvýšená exprese transkriptů podporujících proliferaci buňky a tak mohou přispívat k nekontrolovatelnému množení maligních buněk. Nižší hladina RNA bývá zjištěna u antiapoptických genů, naopak zvýšená u proapoptických. Kvantitativní PCR je metoda vhodná pro

zjištění pacientů s lepší či horší prognózou na základě porovnání exprese vybraných genů.

Pro stanovení prognózy pacientů s MM se v současnosti používá tzv. stážovací systém ISS (International Staging System), který nahradil stážovací systém Durie-Salmon. Jako možnost predikce rizika MM se také nabízí cytogenetické hodnocení translokací chromozomu 14, delece 13 a stupeň ploidie. Stejně informace podává také molekulárně biologické vyšetření aktivity vybraných genů. Shaughnessy et al., v USA pomocí cDNA mikročipů zavedli tzv. 70-genový model, později omezili soubor ze 70 na 17 genů významných pro predikci rizika (27, 18). Expresí genů souvisejících s přežitím pacienta jsou podobné jak u nově diagnostikovaných pacientů s MM, tak i u pacientů v relapsu, bez závislosti na způsobu léčby. Využití expresních profilů umožňuje odlišit pacienty rezistentní na současně používané léky nebo léčebné kombinace (27). Změněná regulace transkripce genů může ovlivňovat vývoj onemocnění. Sledování exprese pomocí real-time PCR tak přispívá k identifikaci pacientů s vysokým rizikem progresu onemocnění. Jedním z genů, které jsou dávány do souvislosti se stanovením prognózy u MM je cyklin D1 (CCND1 gen). Při sledování pacientů s MM pomocí cytogenetických metod a stanovením exprese RNA byla zjištěna vyšší hladina CCND1 mRNA u těch pacientů, kteří měli t(11;14) nebo trizomii 11 než u pacientů bez abnormalit jedenáctého chromozomu. V italské studii z roku 2003 ze 74 pacientů s nově diagnostikovaným MM jich 43% vykazovalo vyšší expresi cyklinu D1. U těchto pacientů byla zjištěna delší doba remise a delší doba přežívání bez příznaků choroby (EFS – event-free survival). Nebyl nalezen rozdíl u pacientů léčených jednoduchou nebo dvojitou autologní transplantací (21). Tajima a kolektiv publikovali v roce 2005 výsledky své práce, ve které se zaměřili na stanovení exprese šesti protoonkogenů (CCND1, FGFR3, c-MAF, MAFB, MUM1/IRF4, and c-MYC), které jsou spojovány s translokací 14q32. Expresí genů CCND1, FGFR3, c-MAF, MAFB byla vyšší u myelomových buněčných linií, které obsahují translokace zahrnující tyto lokusy, než u vzorků kostní dřeně. U dalších dvou genů, MUM1 a c-MYC, byla hladina RNA vyšší u linií než u myelomových buněk kostní dřeně, a to bez ohledu na stav chromozomálních translokací (22).

Enzym spojený se zánětlivou odpovědí, cyklooxygenáza 2 (COX-2) byla zjištěna u 11% MGUS, 31% MM v době diagnózy a 47% relapsů/refrakterního onemocnění. Pozitivita COX-2 je spojena s horší prognózou (8).

Kvantitativní PCR se uplatňuje také při studiu mikroprostředí kostní dřeně. Heparanáza je enzym, který štěpí heparan sulfát proteoglykan (syndecan-1). Vyšší exprese heparanázy v mikroprostředí kostní dřeně je spojena s kratším přežitím pacientů (9).

### Geny rezistence

Existují geny determinující rezistenci buněk na léčbu, u kterých byla popsána změněná exprese u různých typů maligních onemocnění. Příkladem jsou mnohočetné lékové rezistence, které vznikají na celou skupinu léčiv s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. Stežejním faktorem této skupiny genů je gen pro mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR1, ABCB1), který kóduje P-glykoprotein (p-gp) s funkcí trans-

portního proteinu. Pacienti s MM, kteří neodpovídají na chemoterapii často mají zvýšenou hladinu MDR1 RNA (13). Také u připravených chemorezistentních linií byla zjištěna vyšší exprese tohoto genu na rozdíl od senzitivních buněk (24). Substrátem P-gp jsou některá protinádorová léčiva (antracykliny, vinca alkaloidy, kolchicin, actinomycin D). Expresí P-gp koreluje s rezistencí vůči taxanům a doxorubicinu *in vitro* (10). V případě zvýšené exprese MDR1 mohou být léčiva, která jsou substráty P-gp, předčasně vylučována z nádorových buněk, což může vést k poklesu účinku léčby. Sledování exprese genu MDR1 tak může sloužit k predikci úspěšnosti chemoterapie. Vysoká exprese MDR1 je často pozorována u pacientů již dříve léčených cytostatiky, což podporuje názor, že tento gen je indukován selektivním procesem během opakovaného vystavení lékům (5). Také protinádorové agens mohou aktivovat transkripci P-gp (3,7). Další z genů dávány do souvislosti s rezistencí na chemoterapii a kratším přežitím u pacientů s MM je LRP (lung resistance protein), který zabezpečuje intercelulární a nukleocytoplazmatický transport (13). MRP (multidrug-resistance associated protein) gen leží na chromozomu 16 a funguje jako transportér. Podobně jako P-gp přispívá k rezistenci k anthracyklinům (6, 19, 20). Na rezistenci MM buněk se podílí také gen ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein). Expresí tohoto genu v MM liniích je zvýšena po vystavení buněk chemoterapeutickým agens, které jsou substráty ABCG2 (23).

### Nádorové antigeny

Real-time PCR slouží také ke stanovení a potvrzení hladiny exprese nádorově specifických antigenů. Nádorové testikulární antigeny (CT), které jsou exprimovány pouze v maligních buňkách a testes, představují atraktivní cíl pro imunoterapeutické přístupy. Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny, zpravidla prostřednictvím dendritických buněk (DB), které jsou naloženy specifickým nádorovým antigenem. Prostřednictvím aktivace protinádorových T-lymfocytů dochází k cílenému zabíjení nádorových buněk.

Condomines a kolektiv (2) sledovali expresi 46 CT antigenů. Z nich 35 bylo exprimováno u purifikovaných MM buněk alespoň u jednoho pacienta. Expresí 6 CT genů je spojena s kratší dobou přežívání bez příznaků choroby (EFS, event-free survival). Všechny tyto geny (CTAG1B, CTAG2, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A6) leží na chromozomu X. Myelomové buňky 98% pacientů exprimují alespoň jeden CT gen, 86% sledovaných pacientů exprimovalo dva a 70% minimálně tři CT antigeny. Skupina autorů z Brazílie sledovala 14 vybraných CT antigenů u vzorků zdravých tkání, kostní dřeně, vzorků MGUS, solitárního plazmacytomu, MM vzorků a buněčné linie. Jako kandidáty pro imunoterapii našli tři geny – MAGEC1/CT7, MAGEA3/6 a LAGE-1, které jsou nacházeny u 85% všech MM vzorků. Potvrdili, že vliv na prognózu MM pacientů má exprese genů rodiny GAGE, > 6 CT antigenů a MAGEC1/CT7 (1).

### Poděkování:

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; 8:2
- Condomines M, Hose D, Raynaud P et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol.* 2007; 178(5):3307-15
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 1987; 84: 265-9
- Galimberti S, Benedetti E, Morabito F et al. Different gamma/delta T clones sustain GVM and GVH effects in multiple myeloma patients after non-myeloablative transplantation. *Leuk Res.* 2006;30(5):529-35
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal National Cancer Institute* 1989; 2: 116-24
- Hart SM, Ganeshaguru K, Hoffbrand AV et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) in acute leukaemia. *Leukemia* 1999; 48: 2163-8
- Kohno K, Sato S, Takano H et al. The direct activation of human multidrug resistance gene (mdr1) by anticancer agents. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1989; 165: 1415-21
- Ladetto M, Vallet S, Trojan A et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood.* 2005; 105(12):4784-91
- Mahtouk K, Hose D, Raynaud P et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2007; 109(11):4914-23
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S et al.: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2): 389-398
- Michalek J, Collins RH, Durrani HP et al. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):1180-4 a)
- Michalek J, Collins RH, Hill BJ et al. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet.* 2003;361(9364):1183-5 b)
- Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, et al. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol.* 2006;81(11):824-31
- Nishida K, Tamura A, Nakazawa N et al. The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood.* 1997;90(2):526-34
- Raab MS, Cremer FW, Breitkreutz IN et al. Molecular monitoring of tumour load kinetics predicts disease progression after non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Ann Oncol.* 2005;16(4):611-7
- Ralph QM, Brisco MJ, Joshua DE et al. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene. *Blood* 1993; 82:202-6
- Sarasquete ME, García-Sanz R, González D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica.* 2005;90(10):1365-72
- Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007 Mar 15;109(6):2276-84
- Schneider E, Cowan KH, Bader H et al. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed leukemia. *Blood* 1995; 85: 186-90
- Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood* 1994; 84: 3113-21
- Soverini S, Cavo M, Cellini C et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood.* 2003;102(5):1588-94
- Tajima E, Uranishi M, Iida S et al. Global real-time quantification/reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation in multiple myeloma. *Haematologica.* 2005; 90(4):559-62.
- Turner JG, Gump JL, Zhang C et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108(12):3881-9
- van Hille B, Lohri A, Reuter J, Herrmann R. Nonradioactive quantification of mdr1 mRNA by polymerase chain reaction amplification coupled with HPLC. *Clin Chem.* 1995;41(8 Pt 1):1087-93
- Voena C, Malnati M, Majolino I et al. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(8):791-3
- Zhan F, Barlogie B, Mulligan G et al. High-risk myeloma: a gene expression based risk-stratification model for newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose therapy is predictive of outcome in relapsed disease treated with single-agent bortezomib or high-dose dexamethasone. *Blood.* 2008; 111(2): 968-9
- Zhan F, Huang Y, Colla S et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(6):2020-8

## ANALÝZA PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU A JEJÍ VÝZNAM V KLINICKÉ ONKOLOGII

### ANALYSE OF GENE EXPRESSION PROFILES OF MULTIPLE MYELOMA AND ITS SIGNIFICANCY FOR CLINICAL ONCOLOGY

ŠVÁCHOVÁ H.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

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

<sup>2</sup>ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup>LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup>INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Klinická a genetická heterogenita je charakteristickým rysem mnohočetného myelomu (MM) a navzdory intenzivnímu úsilí o porozumění patogenezi MM, zůstává řada procesů zahrnutá ve vývoji MM neobjasněna. Nové metodologické přístupy, jako je studium profilů genové exprese (GEP), jsou vhodným nástrojem spojujícím klinické výstupy (odpověď na léčbu a přežití) s molekulární a genetickou variabilitou onemocnění. Hlavním úkolem je nyní definovat diagnostický a prognostický význam GEP technologie v klinické praxi.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, microarrays, čipy, profilování genetické exprese (GEP), individualizovaná léčebná strategie.

#### Summary

Clinical and genetic heterogeneity is a characteristic feature of multiple myeloma (MM). Despite intensive efforts to clarify the pathogenesis of MM, mechanisms of MM development remain enigmatic. Novel methodological approaches, such as gene expression profiling (GEP), are valuable tools in order to link clinical endpoints, such as response to treatment and survival, with the molecular and genetic heterogeneity of the disease. The main challenge of current studies is to define diagnostic and prognostic relevance of GEP technologies in a clinical management.

**Keywords:** multiple myeloma, microarrays, chips, gene expression profiling (GEP), individual therapy.

#### Úvod: Historie microarray profilování MM

Patofyziologie MM je ovlivněna mikroprostředím kostní dřeně a škálou molekulárních signálů, podílejících se na procesech diferenciaci B-lymfocytů a plazmatických buněk. Microarray technologie spolu s analýzou profilů genetické exprese nabízí cenný nástroj pro studium těchto procesů a přináší nový pohled na základní molekulární děje postihující vývoj MM (18).

První DNA čip byl vyvinut roku 1989 týmem S. P. A. Fodora spojením fotolitografické technologie, používané při výrobě polovodičů, a syntézy oligonukleotidů *in situ*. Na principu „Fodorova“ čipu založila firma Affymetrix v roce 1994 výrobu komerčních čipů pod značkou „GeneChip“ (9).

V roce 1995 Mark Schena ze Stanford University, USA představil jiný typ čipu, tzv. komplementární DNA čip neboli zkráceně cDNA čip. V tomto případě byly fragmenty komplementární DNA na sklíčko umístěny pomocí vysokorychlostního robotického tisku (19).

Pro studium MM byly čipové technologie poprvé použity vědeckým týmem De Vose (6). V této práci použili lidské myelomové linie a cDNA mikročipy o nízké hustotě k identifikaci klíčových intracelulárních signálních genů exprimovaných v maligních plazmatických buňkách (PC).

Claudio a kolegové (2002) použili kombinaci „high-throughput“ DNA sekvenování a microarray analýzy plazmatických buněk pocházejících z různých typů leukémií. Cílem bylo vytvořit komplexní seznam genů exprimovaných u MM. Důležitým mezníkem pro studium GEP bylo zavedení automatizované imunomagnetické separace PC z plné kostní dřeně pomocí monoklonálních protilátek (BB4 – anti-syndecan-1/CD138) a objev metody pro *in vitro* diferenciaci B-lymfocytů periferní krve (23, 21). Od roku 1997 začali tyto „high-throughput“ technologie využívat i Shaughnessy a jeho kolegové (Myeloma Institut for Research and Therapy, Arkansas) pro studium biologie a terapie tohoto geneticky velmi komplexního onemocnění. V roce 2000 zahájili analýzu CD138<sup>+</sup> PC z kostní dřeně zdravých dárců, nově diagnostikovaných a konečných stadií MM, dále MGUS, SMM (Smoldering multiple myeloma) a pacientů s Waldenströmovou makroglobulinémií. Do dnešních dnů prostudovali více než 5000 případů (17).

#### Princip metody

Microarray technologie vychází z předpokladu, že množství mRNA pro každý gen v dané buňce odráží, ve většině případů, množství proteinu a tím i biologickou charakteristiku genu (5).

Princip microarrays spočívá v tom, že RNA extrahovaná z tkáně našeho zájmu je přepsaná pomocí reversní-transkripce do cDNA. V protokolech používaných především pro tištěné cDNA mikročipy jsou v tomto kroku do cDNA inkorporovány fluorescenčně značené oligonukleotidy; v protokolech pro oDNA mikročipy je značena cRNA, která vzniká *in vitro* transkripcí z cDNA pomocí T7 RNA polymerázy. V obou případech se značená cDNA nebo cRNA nechává hybridizovat na destičku a intenzita hybridizace k individuálním cDNA fragmentům nebo oligonukleotidům na destičce je zachycena skenerem s vysokým rozlišením. Hybridizační signál je pak použit pro stanovení hladiny exprese každého genu reprezentovaného na destičce ([www.medscape.com](http://www.medscape.com)).

Po detekci, kvantifikaci a normalizaci intenzit signálů pomocí specializovaného softwaru je vytvořen tzv. „gene expression profile“ (GEP) analyzovaného vzorku, který pak lze srovnávat s expresními profily dalších vzorků (13).

### Typy arrays

Rozlišujeme několik typů microarrays v závislosti na technologii výroby a použitém materiálu. Obecně lze čipy rozdělit na komplementární DNA (cDNA) čipy a „high-density“ oligonukleotidové arrays – oligonukleotidové čipy o vysoké hustotě (oDNA).

První typ čipů je vyráběn pomocí vysokorychlostního robotického tisku cDNA fragmentů na neporézní nosič. Každý gen je zde reprezentován dlouhou dvouřetězcovou DNA sondou nebo EST (expressed sequence tags), která je generována pomocí PCR (polymerase chain reaction) (*Schena et al., 1995*).

cDNA čipy mají řadu výhod i nevýhod. Pozitivem je, že není nutná primární znalost cDNA sekvence, nárůst intenzity signálu pozitivně koreluje s délkou sondy, delší sonda navíc umožňuje nastavit přísnější podmínky a tím snížit intenzitu pozadí, je také cenově výhodnější.

Nevýhoda spočívá v nutnosti udržovat DNA knihovny, může docházet ke cross-hybridizacím a ke kontaminacím cDNA klonů/PCR produktů (11, 13).

Kombinací fotolitografické technologie a „in situ“ syntézy DNA jsou vyráběny vysokohustotní oligonukleotidové mikročipy označované jako oDNA mikročipy. Tato technologie byla vyvinuta firmou Affymetrix. Hustota nejnovějších Affymetrix mikročipů je až 1 300 000 oligonukleotidů / 1,25 cm<sup>2</sup> a jsou schopny detekovat expresi více než 47 000 transkriptů. Ve srovnání s cDNA čipy je zde každý gen reprezentován 25 bp oligonukleotidy, což umožňuje navrhnout oligonukleotidové sondy, které budou hybridizovat se specifickým exonem daného genu ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)).

Další typ čipů vyrábí firma Agilent Technologies, Santa Clara, Californie. Tyto čipy obsahují, na rozdíl od čipů Affymetrix, 60-merní sondy, což zvyšuje citlivost i pro nízká množství transkriptů. Technologie Agilent využívá mnohonásobný skenovací systém, který dále zvyšuje senzitivitu detekce ([www.agilent.com](http://www.agilent.com)).

Účinné a cenově výhodné mikročipy nabízí NimbleGen Systems, Madison, Wisconsin. Jejich čipy jsou vyráběny metodou modifikované fotolitografie s využitím dynamického mikrosklíčka namísto světelné masky (Affymetrix). Nejnovější čipy NimbleGen obsahují více než dva milióny

sond. Výhodou těchto čipů je, že kombinují vysokou hustotu a dlouhé 60-merní sondy (8).

### Analýza dat

Microarray experiment vytváří velké množství dat, která vyžadují složitou analýzu pomocí sofistikovaných biostatistických nástrojů. Tyto metody lze rozdělit do tří velkých skupin: shlukovací metody, metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů a klasifikační metody. Cílem shlukovacích metod může být nalezení skupin genů, které vykazují v průběhu experimentu podobné chování, nebo skupin pacientů s podobným expresním profilem. Do druhé skupiny patří metody, jejichž úkolem je vytipovat geny zodpovědné za různé vlastnosti biologických vzorků (t-test a jeho modifikace). Úkolem klasifikačních metod je na základě intenzit genové exprese získaných z experimentu zařadit zkoumaný vzorek do některé z definovaných tříd (16).

### Vstupní materiál

Výchozím materiálem jsou plazmatické CD138<sup>+</sup> buňky, které jsou získávány imunomagnetickou separací mononukleární frakce buněk z aspirátů kostní dřevě. Microarray vyžaduje 85 – 95% čistotu. Čistota se hodnotí morfologicky a flowcytometricky na základě exprese CD38<sup>+</sup> a CD45<sup>(dim)</sup> (24). Po separaci následuje extrakce RNA, která je většinou prováděna pomocí komerčně dodávaných kitů. Vstupní množství RNA se pohybuje v rozmezí 5 – 40 µg, ale vzhledem k tomu, že jde o klinický materiál, jehož množství je omezeno, je možné vycházet již z množství 1 – 15 µg celkové RNA (0,2 µg – 2 µg mRNA). Malá vstupní množství RNA vyžadují lineární amplifikaci cDNA, která nám umožní „namnožení“ cDNA. Zařazením dvoukolové lineární amplifikace nám umožňuje snížit vstupním množstvím celkové RNA až na 10 – 100 ng [[www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)].

### Specifická nastavení u MM

Použití čipové technologie při studiu MM nevyžaduje žádné specifické modifikace postupu, je potřeba pouze splnit již zmíněné požadavky na vstupní materiál a použít vhodné statistické metody pro analýzu dat.

### Specifické problémy u MM

Přestože je zřejmé, že microarrays a GEP se stávají významným diagnostickým a prognostickým nástrojem v klinické péči krevních nádorových chorob, je nutné si uvědomit, že metoda má stále svá technologická omezení – neexistuje žádná univerzální microarray, odlišnosti vznikají již při výrobě a v laboratořích, dalším omezením je i vysoká cena.

Rizikovým místem je odběr a zpracování vzorku vyžadující separaci CD138<sup>+</sup> plazmatických buněk, kvalifikovaný personál a čas. Otázkou zůstává, do jaké míry ovlivňuje separace buněčné interakce a expresi genů a zda separace eliminuje subpopulaci CD138<sup>-</sup> negativních buněk. Variabilita může být způsobena i velkým časovým odstupem mezi odběrem a zpracováním vzorku. I po separaci však může být detekována vnitronádorová heterogenita a lze pak těžko určit, zda je daný gen aktivní ve všech buňkách nebo pouze v subpopulaci (17).



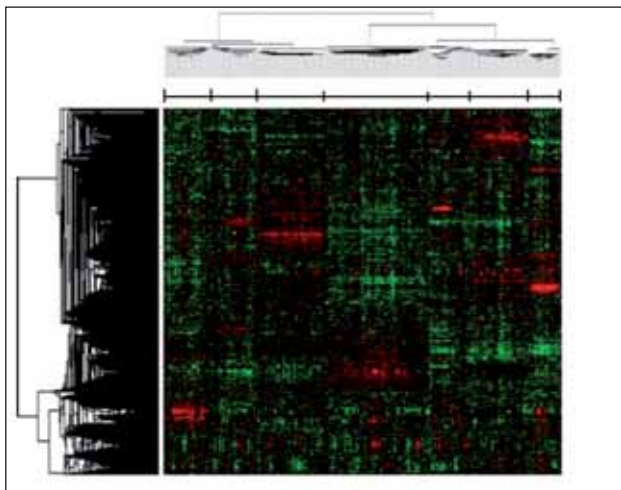
Potenciálním problémem je „unsupervised“ hierarchická shlukovací metoda používaná pro statistickou analýzu GEP. Tato metoda využívá informace poskytované všemi geny, které jsou v dané tkáni exprimované. Jejím nevýhodou je, že vykazuje nízký, ale významný stupeň plasticity, tzn. po zařazení dalšího vzorku či genu do analýzy může dojít k přesunu vzorků z jedné definované podskupiny/klastru do jiné (13).

GEP analýzy jsou limitovány velkou komplikovaností lidského genomu, kterou navíc zvyšuje alternativní sestřih a alelické variace (17).

Studium genové exprese poskytuje užitečné informace pro klinický i základní výzkum, přesto však předkládá do jisté míry zkreslený pohled na genovou expresi a vyžaduje validaci pomocí standardních laboratorních technik (real-time PCR, ELISA) (17).

### Ukázka reprezentativního výsledku

Interpretace velkého množství dat z DNA čipů vyžaduje pokročilé statistické nástroje, které jsou schopny podchytit složitost genetických změn v dané tkáni. Jedním z přístupů je „unsupervised“ analýza, která vyhledává podobnosti v expresních profilech mezi jednotlivými vzorky. Příkladem metody, která testuje a vyhledává podobnosti mezi GEP, je „unsupervised“ shlukovací analýza, která poskytuje dendrogramy podobné evolučním stromům (13). Tato metoda byla použita i pro analýzu GEP nově diagnostikovaných pacientů s MM. Výsledkem byl dendrogram se dvěma hlavními větvemi a 7 podvětvemi, na jehož základě bylo identifikováno 7 molekulárních podskupin MM (Obrázek č.1). Větve dendrogramu byly významně ovlivněny silně exprimovanými geny. Geny jsou reprezentovány jednotlivými tečkami, kterým jsou během skenování počítačově přiřazovány pseudobarvy. Intenzita signálu pak odpovídá velikosti exprese daného genu (24).



**Obrázek č. 1: Dendrogram shlukové analýzy**

Expresce genů je v dendrogramu kódovaná barevně. Průměrným hodnotám genové exprese byly po normalizaci intenzit fluorescence přiřazeny pseudobarvy. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi genů v daném vzorku. Dendrogram vzorků nahoře a dendrogram genů vlevo odráží vztah mezi vzorky. Větve dendrogramu jsou ovlivněny výraznými shluky silně exprimovaných genů. Dendrogram byl převzat a upraven z citace Zhan *et al.* (2006).

### Význam metody u MM stávající

Čipové technologie nám nabízejí nebyvalou příležitost pro lepší pochopení deregulací genové exprese a molekulární podstaty vývoje MM (viz. význam GEP u MM). V současné době byly použity v těchto oblastech výzkumu (<http://myeloma.uams.edu/lambertlab/>)

- rozpoznání kritických genetických změn, které odlišují normální a myelomové buňky
- korelace genetické exprese s klinickým výstupem – definice genetických podskupin
- stanovení genetických změn v nenádorových buňkách kostní dřeně
- sledování změn v genové expresi v nádorových a nenádorových buňkách kostní dřeně v odpovědi na léčbu
- identifikace změn v genové expresi asociovaných s vývojem lékové rezistence
- nalezení genetických a biochemických drah, které mohou být cílem nových chemoterapeutik
- porozumění mechanismu vzniku kostních lézí

### Význam metody u MM očekávaný

V poslední době jsme svědky nástupu farmakogenomických metod, mezi něž patří právě microarrays, které umožňují sledovat efekt podávané látky na úrovni celého genomu, tedy transkriptomu (20). S rostoucím počtem nových léků pro léčbu MM narůstá i potřeba přesně definovat jejich optimální užívání dle farmakogenomických zásad, tedy individualizovat léčbu tak, aby u pacientů s lepší prognózou byla minimalizována toxicita, u pacientů s horší prognózou to znamená včasné zahájení specifické vysokodávkové (high dose) terapie (25). Současné klinické prognostické parametry však nejsou dostačující pro rozpoznání nejrizikovějších skupin pacientů. Předpokládá se, že genomika s GEP by mohla být novým prognostickým a prediktivním nástrojem pro klinickou odpověď a toxicitu asociovanou s novými léky (bortezomib, lenalidomid, melphalan, thalidomid a další imunomodulátory) (3, 14). Zhan *et al.* (2008) vytvořili na základě GEP nový stratifikační model rozdělující pacienty v relapsu po léčbě bortezomibem nebo high dose dexametazonem do rizikových skupin. Ukázalo se, že tento model je schopný identifikovat nejrizikovější skupiny i u nově diagnostikovaných pacientů léčených následně high dose terapií a zdá se být nezávislý na různých formách léčby. Předpokládá se, že tento model je schopný identifikovat pacienty, kteří jsou obecně necitliví k současně používaným lékům nebo jejich kombinacím.

Výstupy ze současných klinických studií nám umožňují vytvořit seznamy genů, které by mohly sloužit jako potenciální prediktory rezistence a odpovědi na léčbu, a dokonce by mohly vést k vytvoření zákaznických arrays, které by sloužily jako základ pro optimální léčebnou strategii u pacientů s MM (10).

### Závěr

Microarray technologie jsou velmi cenným nástrojem poskytujícím důkladný pohled na mechanismy zahrnuté ve vývoji B-lymfocytů a plazmatických buněk a jejich fyziologické interakce s dalšími buněčnými populacemi,



obzvláště v mikroprostředí kostní dřeně (7). Je patrné, že genomika hraje významnou roli v základním a preklinickém výzkumu a její význam roste i v klinickém výzkumu, méně jasné je, kdy a jak se čipové technologie začnou uplatňovat i v rutinní diagnostice. Vše bude záviset na ceně, uživatelské nenáročnosti technologie a také

na existenci vhodných statistických nástrojů pro zpracování dat.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. <http://www.affymetrix.com/index.affx> (Version Date: 1-16-2006).
2. <http://www.agilent.com> (© Agilent 2000-2008)
3. Broyl A, Hose D, Knecht de Y et al. In *Haematologica*. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s. 65. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
4. Claudio JO, Masih-Khan E, Tang H et al. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood* 2002, 100:2175-2186
5. Dahlgaard JO, Dybkaer K, Johnsen HE. A novel Chemo Sensitivity Index for Melphalan Based on Gene Expression Profiling (GEP). Session Type: Publication Only. Program and abstracts of the American Society of Hematology's 49<sup>th</sup> Annual Meeting, December 8-11, 2007, Atlanta, GA.
6. De Vos J, Couderc G, Tarte K et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by usány complementary DNA arrays. *Blood* 2001;98:771-780.
7. De Vos J, Hose D, Rème T et al. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev.* 2006 Apr; 210:86-104.
8. Eisenstein M. Microarray quality control. *Nature*. London: Aug 31, 2006. Vol. 442, Iss. 7106; p. 1067
9. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991, 251(4995): 767-773.
10. Kumar S. Microarray analysis to predict response to Thalidomide and the IMiDs. In *Haematologica*. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.9-10. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
11. Lausted C, Dahl T, Warren C et al. POSaM: a fast, flexible, open-source, inkjet oligonucleotide synthesizer and microarrayer. 2004;5(8):R58. Epub 2004 Jul 27.
12. <http://www.medscape.com/home> (Medscape General Medicine 5(3), 2003. © 2003Medscape)
13. Merkerová , Kráčmarová A, Bruchová H, Brdička R. Využití biočipových technologií v onkologii. *Klinická onkologie*, Brno: ApS Brno, spol.s r.o., 19, 12/2006, 2006. ISBN 0862-495X, s. 333-337.
14. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B et al. Gene expression profilig and correlation with autcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*.2007;109:3177-3188.
15. <http://myeloma.uams.edu/lambertlab/>
16. Pavlák T., Jarkovský J.: Statistické metody v analýze dat z DNA mikročipů. *Klinická onkologie*, Brno: ApS Brno, spol.s r.o., 19, 12/2006, 2006. ISBN 0862-495X, s. 365-368.
17. Shaughnessy JD Jr, Barlogie B. Interpreting the molecular biology and clinical behaviour of multiple myeloma in the kontext of global gene expression profilig. *Immunol Rev.* 2003 Aug;194:140-63.
18. Shaughnessy JD Jr. Clinical use of genomics in multiple myeloma. *Clin Adv Hematol. Oncol.* 2006 Jun; 4(6):419-21.
19. Shena M, Heller RA, Theriault, TP et al. Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology* 1998, 16: 301-306.
20. Šeda O, Šedová L. Farmakogenomika a nutrigenomika: Komplexní interakce genů s prostředím. *Klin Farmakol Rarm.*2005;19:116-120.
21. Tarte K, De Vos J, Thykjaer T et al. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood* 2002;100:1113-1122.
22. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bonemarrow plasma cells. *Blood* 2002;99:1745-57.
23. Zhan F, Tian E, Buml et al. Gene expression profilig of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma basen on similarities to distinct stages of late stage B-cell development. *Blood* 2003; 101:1128-1140.
24. Zhan R, Juany Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gusta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. Sep 2006;15;108(6):2020-8. Epub 2006 May 25.
25. Zhan F, Barlogie B, Mulligan G et al. High-risk myeloma: a gene expression based risk-stratification model for newly diagnose multiple myeloma treated with high-dose tharapy is predictive of outcome in relapsed disease treated with single-agent bortezomib or high-dose dexamethasone. *Blood*.2008;111:968-969.

### MOLEKULÁRNÍ DEFINICE RIZIKA JAKO NOVÝ PROGNOSTICKÝ NÁSTROJ PRO MNOHOČETNÝ MYELOM

### MOLECULAR DEFINITION OF RISK AS A NEW PROGNOSTIC TOOL FOR MULTIPLE MYELOMA

ŠVÁCHOVÁ H.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO

<sup>4</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Heterogenní podstata mnohočetného myelomu a nedostatečnost současných klasifikačních systémů a laboratorních parametrů neumožňuje přesné stanovení vysoce rizikových případů s MM (high-risk, HR). Potřeba nových prognostických nástrojů vedla k vytvoření řady klasifikačních schémat definujících jednotlivé varianty MM na základě genetických/cytogenetických markerů získaných analýzou expresních profilů a pomocí cytogenetických technik.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, microarrays, profilování genetické exprese.

#### Summary

Heterogeneity of multiple myeloma and insufficiency of current classification systems and laboratory parameters do not facilitate definition of patients with high-risk outcome. The need of new prognostic tools lead to the range (in creation of plenty) of classification scheme describing variants of MM based on detection of genetics/cytogenetics markers by gene expression profiling and cytogenetics.

**Keywords:** multiple myeloma, microarrays, gene expression profiling.

#### Úvod

Nástup „high-density“ oligonukleotidových DNA microarrays umožnil simultánní analýzu exprese tisíce různých genů, jež jsou vztaženy k rozličným biologickým funkcím. Kombinací GEP a cytogenetických technik (FISH, aCGH) bylo možné identifikovat skupiny genů, jejichž aktivita může předpovědět vysoce rizikové případy s variabilním klinickým výstupem, který lze pouze obtížně předpovědět pomocí současných laboratorních parametrů. Ohodnocení hladiny exprese těchto genů může potenciálně poskytnout jednoduchý a přitom efektivní molekulárně-prognostický test. Na základě molekulární definice rizika bude možné zpřesnit výběr nejvhodnějšího terapeutického zásahu, např. u 85% pacientů s nízkým rizikem (low-risk; LR) MM může být zvolena méně intenzivní terapie, naopak u pacientů s vysokým rizikem (high-risk; HR) MM zajistíme včasné zahájení vhodné léčby (5, 4).

Pomocí GEP a „unsupervised“ hierarchického shlukování byl vytvořen 70-genový klasifikační model, který prokázal existenci 7 molekulárních podskupin MM se silnou korelací s hyperdiploidii a opakujícími se translokacemi (6).

#### Metodika a soubor nemocných

Microarray analýzy byly provedeny pomocí Affymetrix U133Plus2.0 microarrays na CD 138<sup>+</sup> myelomových buňkách získaných separací mononukleární frakce kostní dřeně (viz. metodika) Buňky pocházely ze 414 nově diagnostikovaných pacientů s MM léčených dle dvou samostatných protokolů (6).

#### Výsledky

Analýza více než 54 000 genů odhalila 70 genů spojených s časným úmrtím, z nichž 30% bylo lokalizováno na chromozomu 1 (Tabulka č.1). Většina genů se zvýšenou expresí se vyskytovala na chromozomu 1q. Amplifikace 1q genů byla pozorována především u high-risk PR (proliferative) a MS (MMSET) skupiny (Tabulka č.2). Geny se sníženou expresí byly lokalizovány na 1p (5). Na základě molekulární klasifikace bylo popsáno 7 podskupin, které korelovaly se známými aktivačními translokacemi – c-MAF, MAFB, CCND1 a CCND2 a hyperdiploidii. (Tabulka č.3) (6).

Nadměrná aktivace CCND1/CCND2 byla pozorována v 95% případů, zvýšená exprese CCND2 byla patrná u PR, LB (low bone disease) a MS skupiny, nízká exprese CCND1 byla v HY (hyperdiploid). Exprese CCND1/

## příklady využití

CCND3 byla typická pro CD-1 a CD-2 třídu. Skupiny PR, MS a MF (MAF/MAFB) charakterizovaly nemocné s nepříznivou prognózou, ale s delším celkovým přežitím (overall survival; OS), skupiny HY, CD-1, CD-2, LB vykazovaly delší dobu přežití bez významné události (event-free survival; EFS) a příznivější prognózu (Graf č.1) (6). Další validační analýzy zredukovaly počet genů na 17. Ve srovnání se 70-genovým modelem byl 17-genový model schopný předpovídat high-risk s 97,7% přesností (Tabulka č. 4) (5).

1q geny	Symbol genu
1q22	AIM2
1q43	OPN3
1q31.3	ASPM
1q21.2	CKS1B
1q22	IFI16
1q23.3	TAGLN2
1q43	NA
1q21.2	PSMD4
1q32.1	KIF14
1p geny	Symbol genu
1p36.33	FLJ13052
1p11	MGC57827
1p36.13	ENO1
1p13	NA
1p13.2	AHCYL1
1p13.3	MCLC
1p22	EVI5
1p13.3	AD-020
1p13.1	TRIM33
1p34	FUCA1
1p22.1	PARG1
1p22	CTBS

Tabulka č. 1: Geny spojené s časným úmrtím lokalizované na chromozomu 1q a 1p. Tabulka byla převzata a upravena z citace Zhan *et al.* (2006).

Chromozom	Počet genů							P	
	Celkem	PR	LB	MS	HY	CD-1	CD-2		MF
1q	2003	178	52	162	22	21	37	38	<.001
1p	2453	39	20	69	67	38	132	46	<.001

Tabulka č. 2: Výskyt 1q a 1p genů se zvýšenou expresí v 7 molekulárních podskupinách. Tabulka byla převzata a upravena z citace Zhan *et al.* (2006).

Molekulární klasifikace MM							
Název skupiny	1	2	3	4	5	6	7
Chrom. aberace			t(4;14)	trizomic 3,5,7,9,11,15,19,21	t(11;14)	t(14;14) t(6;14)	t(14;16) t(14;20)
EXPRES	↑ •bun.cykly •proliferace •MAGE •GAGE	•EDN1	•FGFR3 •MMSET •kaderiny •WNT receptor •PBX1	•GNG11 •TRAIL •FRZB •DKK1 •CCRS •IFI geny	•Kelch-like 4 •INHBE •FYN •NF-IL6 •EVER L2	•CD20 •VPREB •PAX5	•MAF geny •MAFB geny •SFRP2
		•DKK1 •IFI geny •FRZB	•ICAM4 •N-kaderin •kaderin 7 •PAX5	•CD52 •1q geny	•není CD 59 •NOTCH2NL •HES1		•TNFAIP8 •DKK1

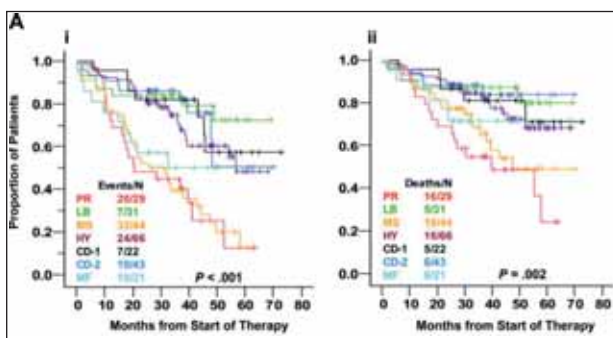
Tabulka č. 3: Molekulární klasifikace MM definující 7 molekulárních podskupin (Zhan *et al.*, 2006).

PR (proliferace); LB (low bone disease); MS (MMSET); HY (hyperdiploid); CD1 (CCND1/CCND3); CD2 (CCND1/CCND3); MF (MAF/MAFB)

Symbol genu	Lokalizace na chromozomu	70-genový kvartil
KIF14	1q32.1	Q4
SLC19A1	21q22.3	Q4
CKS1B	1q21.2	Q4
YWHAZ	8q23.1	Q4
MPHOSPH1	10q23.31	Q4
TMPO	12q22	Q4
NADK	1p36.21	Q4
LARS2	3p21.3	Q4
TBRG4	7p14-p13	Q4
AIM2	1q22	Q4
NA	1q43	Q4
ASPM	1q31	Q4
AHCYL1	1p13.2	Q1
CTBS	1p22	Q1
MCLC	1p13.3	Q1
LTBP1	2p22-p21	Q1
NA	6p21	Q1

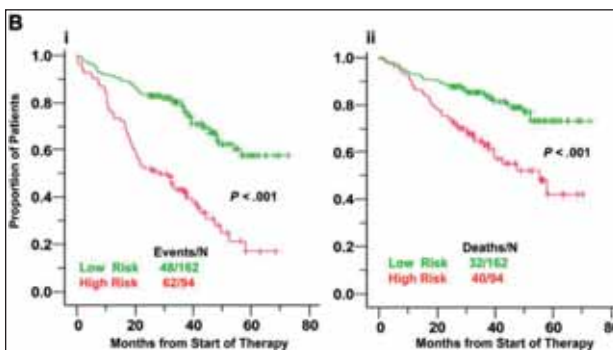
Tabulka č. 4: 17-genový model odvozený ze 70-genové UAMS klasifikace.

Tabulka byla převzata a upravena z citace Shaughnessy *et al.* (2007).



Graf č. 1: Kaplan-Meierovy křivky přežívání nemocných s mnohočetným myelomem (MM)

(A) Kaplan-Meierovy křivky EFS a OS v 7 skupinách prokázal pravděpodobnost 3-letého EFS v 84% LB; 72% HY; 82% v CD-1; a 86% v CD-2. Výsoké riziko bylo spojené s PR, MS a MF skupinou; tříletý odhad EFS byl 44% u PR, 39% u MS a 50% u MF. Pravděpodobnost 3-letého OS byla 55% v PR, 69% v MS, 71% v MF, 81% v CD1, 84% v HY, 87% v LB a 88% v CD2. Graf byl převzat a upraven z citace Zhan *et al.* (2006).



Graf č. 2: Kaplan-Meierovy křivky přežívání nemocných s mnohočetným myelomem (MM).

(B) EFS a OS analýza LR (low-risk) v HY, CD1, CD2, LB a HR (high-risk) v PR, MF, MS skupinách. Graf byl převzat a upraven z citace Zhan *et al.* (2006).

### Diskuze

High-risk onemocnění definované na základě tohoto modelu představuje nezávislou a významnou prognostickou proměnou, která však vyžaduje ohodnocení ve spojení s dalšími léčebnými přístupy. Klinický potenciál, který tento model má, je ve schopnosti kvantitativně analyzovat riziko. Pomocí tohoto modelu bylo možné rozpoznat high-risk onemocnění u 13% pacientů, u nemocných v relapsu toto číslo vzrostlo na 76% a jasně identifikovalo pacienty s krátkým klidovým obdobím. Agresivnější myelomový fenotyp, vznikající *de novo* nebo druhotně získaný a charakterizovaný zvýšenou expresí proliferčních genů, je pravděpodobně vyžadován pro přechod do více agresivnějších stadií. Snahou je vyvinout nová léčiva cíleně zaměřená na signální dráhy typické pro tuto rizikovou skupinu, a prodloužit tak přežití nemocných s high-risk MM (5, 6).

Dalším klinicky významným rysem vyplývajícím z tohoto modelu je, že zisk/amplifikace 1q21 může být klíčovou genetickou událostí v patogenezi a progresi MM (6). Ze 70 definovaných genů spojených s časným úmrtím bylo 30% lokalizováno na chromozomu 1. Většina genů se zvýšenou expresí se vyskytovala na dlouhém rameni 1q. Podobné poznatky byly získány i pomocí high-resolution aCGH (array comparative genomic hybridisation). Na základě této analýzy byla identifikována skupina pacientů s hyperdiploidním MM, která vykazovala zvýšenou expresi genů lokalizovaných na 1q21-q23 a horší prognózu (2, 5). Navíc se potvrdilo, že progresse onemocnění není závislá pouze na zvýšeném počtu kopií, ale také na procentu buněk nesoucích 1q21 amplifikaci (3).

Kombinací microarray analýz a high resolution aCGH bylo identifikováno 47 „minimal common regions“ (MCRs) a bylo zjištěno, že pouze geny na MCRs v místech 1q21, 1q22 a 1q43-q44 měly významně zvýšenou expresi u HR MM (2, 5).

Ačkoliv UAMS klasifikace definuje geny lokalizované na chromozomu 1 jako klíčové v progresi onemocnění, výskyt

dalších 4 genů, FABP5, YWHAZ, EXOSC4 a EIFC2 na 8q21-8q24 předpokládá, že zisk 8q také přispívá k vývoji HR MM. Tyto geny zahrnují nedávno popsané zisky/amplifikace v 8q24.12-8q24.13 a 8q24.2-8q24.3 na MCRs (2; 5). S horší prognózou u MM byla spojena i ztráta jediné kopie genu lokalizovaného na chromozomu 13q14, RFP2, který byl již dříve popsán jako kandidátní nádorově-supresorový gen u B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia) s významnou homologií k BRCA1. RFP2 také vykazuje v MM expresi citlivou na počtu kopií (copy number-sensitive expression) (5).

Prognostický význam častých změn na chromozomu 1 podporuje jejich výskyt i v dalších typech nádorů, jako je např. 1q21 amplifikace v non-Hodgkinském lymfomu, Wilmsově nádoru, Ewingově sarkomu a u rakoviny prsu a vaječníků (5).

### Závěr

Přestože je málo pravděpodobné, že bude UAMS klasifikace v blízké době využita v klinické praxi, může sloužit jako vhodný „orientační bod“ v klinických studiích, které srovnávají vysoce rizikové případy (1). Předpokládá se také vytvoření a ověření kvantitativní RT-PCR assay, která bude kombinovat geny spojené se stadiem/ rizikem a geny spojené s molekulárními subtypy/etiologií, odvozené z tohoto modelu. Hodnocení hladiny exprese těchto genů může sloužit jako jednoduchý, ale citlivý molekulárně-prognostický test. Test bude eliminovat potřebu hodnotit řadu v současnosti používaných standardních prognostických proměnných s limitovaným vlivem na přežití. Použití PCR metodiky umožňuje také dramatické snížení času a úsilí vynakládaného ve FISH analýzách a navíc i významné snížení množství materiálu potřebného pro analýzu (5).

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Fonseca R.: Clinical and pathological implications form myeloma subtypes. In Haematologica. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.4-5. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
2. Carrasco D, Tonon G, Huang Y, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinicopathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. Cancer Cell. 2006;9:313-325.
3. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem cell transplantation. Blood. 2006 Sep 1;108(5):1724-32.
4. www.medscape.com (Medscape Medical News 2007. © 2007 Medscape)
5. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al.: A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. Blood. 2007 Mar 15;109(6):2276-84.
6. Zhan R, Juany Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gusta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, et al. The molecular classification of multiple myeloma. Blood. Sep 2006;15;108(6):2020-8. Epub 2006 May 25.



## POUŽITÍ JEDNO-NUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFIZMŮ U ANALÝZY MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### USE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN MULTIPLE MYELOMA ANALYSIS.

SLANÝ M.<sup>1</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

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

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Klasifikace nádorových onemocnění a identifikace terapeutických cílů pro jejich léčbu vyžaduje důkladnou znalost a popis genetických změn. Analýza single nukleotidových polymorfizmů je cenným nástrojem pro detekci a charakterizaci genetických variací u nádorových onemocnění. Účelem této práce je podat souhrnný přehled o metodách detekce SNP aplikovatelných na výzkum MM.

**Klíčová slova:** genomika, jedno-nukleotidové polymorfizmy, signální dráhy, mnohočetný myelom.

#### Summary

Tumor classification and identification of targets for therapeutic applications requires very good knowledge and description of genetic changes connected to an illness. SNP analysis seems to be a valuable tool for detection and characterisation of genetic variations in cancer. The aim of this review is to summarise methods usable for SNP detection and its applicability for MM research.

**Keywords:** genomics, single nucleotide polymorphisms, signalling pathways, multiple myeloma.

#### Úvod

Vznik nádorového onemocnění je složitý, mnohastupňový proces. Pro vznik onemocnění je nutné aby buňka prošla procesem maligní transformace za účasti mnoha faktorů. Nádorová buňka se oproti normální liší především nekontrolovanou schopností dělit se. Na regulaci buněčného cyklu se podílí velké množství genů. Narušení určitých genů může "odblokovat" kontrolní mechanismy buněčného cyklu a způsobit nekontrolované dělení dané buňky. V nádorových buňkách tudíž nacházíme mutace v určitých genech. Dalším charakteristickým znakem nádorové buňky je přítomnost různých chromozómových aberací (21, 12, 27), přičemž některé mohou být úspěšně využity jako prognostické znaky u nádorových onemocnění jako je Chronická myeloidní leukémie nebo Mnohočetný myelom (8, 25). Genetické změny probíhající v nádorové buňce zahrnují různé změny jako je bodová mutace, malé delece/inzerce, delece části chromozómů, translokace, změny počtu kopií genů nebo ztráta heterozygoty (LOH). Jednou z možných aplikací metod molekulární biologie pro studium genetických změn u nádorových onemocnění je detekce jednobodových nukleotidových polymorfizmů (SNP). SNP analýza je nástroj, který byl primárně zamýšlen využívat pro detekci genetických polymorfizmů asociovaných s nemocí (14). S rozvojem čipových technologií se SNP analýza začala používat jako alternativní technika ke komparativní genomové hybridizaci (CGH) pro defino-

vání LOH a počtu změn kopií genů (7, 30). Široká aplikace CGH na téměř všechny typy nádorů nám v posledních letech poskytla detailní znalost chromozómalní přestavby u rozmanitých nádorových onemocnění (2, 1, 26). S definicí LOH a změn počtu kopií genů byla SNP analýza zahrnuta do oblasti patologie nádorových onemocnění jako jsou chronická myeloidní leukémie (CML) nebo mnohočetný myelom (MM) (18, 30). Možnost použití polymorfizmů specifických genů jako prognostických znaků pro predikci léčebné odpovědi v oblasti farmakogenomiky je další možností jak tuto oblast aplikovat do klinické praxe (22, 29, 5). Účelem této práce je poskytnout souhrnný přehled metod SNP detekce a možnost jejich aplikace na studium MM.

#### Teoretické základy SNP

SNP je sekvenční variace vyskytující se při záměně některého z nukleotidů (A,T,C nebo G) v primární sekvenci DNA za nukleotid jiný. Jako SNP je považovaná taková nukleotidová záměna, která se v populaci vyskytuje s četností větší než 1%, jinak se jedná o jednobodovou mutaci (4). Téměř 90% variability lidského genomu je právě způsobeno SNP. Jako nejčastější záměna byla popsána výměna cytosinu (C) za thymin (T), což lze vysvětlit velmi vysokou incidencí deaminace 5-metylcytosinu na thymin v dinukleotidech CpG. SNP se může vyskytnout jak na kódující (gen) tak nekódující oblasti genomu. Více jak 99%

## přehled

Metoda	Výhody	současné omezení	reference
Čipové matrice	(i) prověření velké škály polymorfizmů	(i) Specifita určena hybridizací - není možno rozlišit všechny polymorfizmy - problém detekovat SNP na nízké úrovni (ii) Každý nový SNP vyžaduje přípravu nové matrice (iii) vyžaduje současně PCR amplifikaci	Ji et al., 2004 Dinas et al., 2005 Kors et al., 2006
Real-time PCR	(i) uzavřená reakce - eliminace kontaminace - nevyžaduje elektroforetickou separaci  (ii) amplifikace cílového místa (iii) jednokroková amplifikace a detekce	(i) omezené použití multiplexních reakcí (ii) Specifika určena hybridizací - není možno rozlišit všechny polymorfizmy  (iii) specifické podmínky pro PCR reakci	De La Vega et al., 2005 Vandsted et al., 2007 Hosono et al., 2008
Extenze primeru	(i) Aplikovatelné pro MALDI-TOF, Nevyžaduje použití značení	(i) není možno detekovat jedno-nukleotidové repetice, inserce a delece	Blondal et al., 2003
Invader essay	(i) Izotermální reakce nevyžadující PCR (ii) uzavřená reakce - eliminace kontaminace (iii) jednokroková amplifikace a detekce	(i) omezené použití multiplexních reakcí (ii) neschopná detekovat malé delece a inserce (iii) vyžaduje velmi čisté sondy pro zamezení kontaminace	Hosono et al., 2008
Oligonukleotidová ligázová reakce	(i) Vysokokapacitní multilexní vlastnosti (ii) Vysoká úroveň citlivosti a specifity (iii) Detekce všech variant bodových mutací a malých delecí a insercí	(i) nutnost provést PCR před nebo po ligačním kroku	Zhang et al., 2008

Tabulka č. 1: Srovnání používaných technik pro identifikaci známých mutací a polymorfizmů

Metoda	Výhody	současné omezení	reference
Sekvenace	(i) analýza všech změn primární struktury DNA do velikosti 600 bp / reakce (ii) velmi přesná	(i) omezená detekce mutací s malou četností v populaci (ii) citlivá na kontaminující DNA	Chadwick et al., 1996 Lijavetzky et al., 2007
SSCP	(i) detekce mutací s nízkou četností (ii) rapidní,	(i) nepostihne 30% možných mutací (ii) nespecifikuje umístění polymorfizmu (iii) nemusí detekovat mutaci blízko častého polymorfizmu	Hayashi et al., 1991
DGGE, DHPLC	(i) detekce mutací s nízkou četností (ii) rapidní	(i) testování velké škály změn nepostihne 13 % polymorfizmů (ii) nutno použít oligonukleotid s GC svorkou (iii) technicky náročné reprodukovat výsledky (iv) nespecifikuje umístění polymorfizmu	Hayes et al., 1999 Underhill et al., 1997
Sekvenčně Specifická PCR	(i) metodicky a finančně nenáročné	(i) omezené použití multiplexních reakcí	

Tabulka č. 2: Srovnání používaných technik pro identifikaci neznámých mutací a polymorfizmů

genomové DNA je v lidské populaci shodné. Ovšem, i tak malá variabilita DNA hraje významnou roli v celkové charakteristice lidského organismu, jak odpovídá na nemoci, léčbu nebo vliv prostředí. Právě tato skutečnost dělá SNP cennými pro biomedicínký výzkum, vývoj farmaceutických produktů nebo diagnostiku.

Genetický fond každého člověka obsahuje jedinečné SNP vzory tvořené různými genetickými variacemi. Bylo zjištěno, že většina SNP není odpovědná za vlastní onemocnění. Namísto toho slouží jako biologické markery pro specifikaci místa na lidské genomové mapě asociovaného s nemocí, neboť jsou zpravidla umístěny blízko genu identifikovaného jako původce onemocnění. Tento postup, často používaný v nepřímé diagnostice dědičných chorob, je založen na analýze vazebné nerovnováhy genů. Příležitostně může být přítomnost SNP vlastním původcem onemocnění, což nám umožní vyhledat a izolovat odpovědný

gen. V případě onemocnění, u kterého byl identifikován defektní gen, lze prověřit DNA izolovanou ze souboru zdravých a postižených pacientů na přítomnost různých SNP vzorů a pomocí asociační studie identifikovat SNP vzor charakteristický pro přítomnost nemoci. Většina SNP nemá vliv na funkci buňky, ale některé mohou způsobit predispozici člověka k nemoci nebo ovlivnit jeho odpověď na podaný lék. Pro přehlednější charakterizaci polymorfizmů v lidském genomu byla SNP konsorciem vytvořena podrobná mapa (<http://snp.cshl.org>).

### Metody detekce SNP

Pro detekci polymorfizmů jsou dostupné různé metodiky. Většina technik pro detekci polymorfizmů je variací hybridizačních nebo enzymatických technologií. V literatuře lze nalézt několik souhrnných prací popisujících tyto metody (19, 16). Klasickou metodou využívanou v různých

obměnách je polymerázová řetězová reakce (PCR), přičemž nejčastěji používanou modifikací pro klinickou aplikaci je Real-Time PCR využívající fluorescenčně značené sondy. V dnešní době se biomedicinský výzkum v oblasti klinických aplikací preferenčně zaměřuje na kvantitativní analýzu SNP pomocí čipových technologií. Použití SNP čipů umožňuje v jednom běhu analyzovat vzorek na velké množství polymorfizmů umístěných na různých pozicích v genomu, což snižuje spotřebu vstupního materiálu a dobu analýzy. Nevýhodou jsou technické nároky na přípravu matrice čipů, drahé přístrojové vybavení a hlavně možnost analyzovat pouze identifikované polymorfizmy. Další metody použitelné pro analýzu známých polymorfizmů jsou uvedeny v Tabulce č.1. Identifikace nových polymorfizmů je možná pomocí klasicky používaných metodik molekulární biologie (viz. tabulka č.2).

### Specifické nastavení u MM

Genomická analýza nám zatím v klinické praxi neumožňuje předpovědět vývoj nemoci nebo reakci pacienta na specifickou léčbu. Právě Aplikace SNP čipových technologií by mohla být jednou z možností, jak vyřešit problém nevhodné léčby u MM. Hlavními kritérii pro výběr vhodné metody pro detekci SNP jsou citlivost, specifita, požadavky metody na vzorek a cena. Pro klinické aplikace je také dalším kritériem rychlost metody. Jako vstupní materiál pro klinickou analýzu polymorfizmů se používá genomová DNA izolovaná z periferní krve, kostní dřeně nebo specificky separovaných CD138+ buněk. Vůdčím projektem zaměřeným na charakterizaci polymorfizmů u MM je Bank on a cure (<http://myeloma.org/>). SNP analýza v tomto projektu je zaměřena na identifikaci predispozice k MM, predikci léčebné nebo toxické odpovědi u stávajících léků (Velcade, Thalidomid) a výběr vhodných léků a jejich kombinací pro léčbu MM.

### Specifické problémy u MM

Využití SNP analýzy u MM má dozajista uplatnění v oblasti studia nádorových onemocnění. Právě přítomnost polymorfizmu na genomu člověka je jedním z faktorů, který způsobuje odlišnost lidských jedinců. V dnešní době je jistá oblast genomické analýzy MM zaměřena na měření hladiny exprese vytypovaných genů, aby bylo možno stanovit obecný model pro předpověď výsledného efektu po podání nějakého léčebného přípravku. Z tohoto pohledu je nutné vzít v potaz vliv polymorfizmů při studiu MM. Právě přítomnost polymorfizmu v genu podílejícím se na meta-

bolické nebo signální dráze podaného léku může způsobit rozdílný efekt u jedinců zařazených do stejné analytické skupiny. Hlavním omezením pro úspěšnou aplikaci SNP do klinické praxe je zatím nedostatečná znalost interakcí v genech asociovaných s MM.

### Význam metody u MM stávající

Charakteristické nastavení analýzy SNP u MM závisí na požadavcích a stavbě studie. Obecně lze říci, že čipovou platformu je výhodnější použít pro genomickou analýzu u již známých polymorfizmů asociovaných s onemocněním. Tento přístup přispívá ke snížení množství vstupního materiálu pro analýzu, což je pro klinické aplikace podstatné. Je nutné si ovšem uvědomit, že zatím není stanoveno obecné schéma sloužící k predikci rozvoje nemoci a léčebné odpovědi. Je nutné vybrat skupinu polymorfizmů s prediktivními vlastnostmi, než dojde k jejich aplikaci na čipovou platformu. K tomuto procesu nám poslouží právě nízkopacitní metody pro detekci SNP jako je sekvenace nebo Real-time PCR. Stávající nastavení detekce polymorfizmů u MM je prozatím na experimentální úrovni. Současné práce jsou zaměřeny na validaci SNP jako prognostických znaků u vybraných kandidátních genů. V Tabulce č.3. jsou uvedeny vybrané geny, u kterých byla popsána asociace polymorfizmu s MM.

Geny opravy DNA	Riziko vývoje MM	Odpověď na léčbu thalidomidem
<i>ATM</i>	<i>GSTT1</i>	<i>CYP2C19</i>
<i>MRE11A</i>	<i>MTR</i>	<i>CY3A5</i>
<i>XRCC4</i>	<i>TNF-1</i>	<i>TNF-1</i>
<i>NBS1</i>	<i>HPSE</i>	<i>CD3EAP</i>
<i>RAD50</i>	<i>MDR1</i>	<i>XRCC3</i>
	<i>IL1A</i>	<i>ERCC2</i>
	<i>IL1B</i>	

Tabulka č. 3: Polymorfizmy v genech asociovaných s prognózou u MM. Vybraný soubor genů u kterých byla popsána asociace s MM.

### Závěr

Právě studium DNA polymorfizmů nám pomůže v budoucnu pochopit rozdíl mezi jednotlivci ve schopnosti absorbovat nebo odstranit specifický lék, či specifikovat vliv genetické predispozice na vedlejší efekty léčby. Z tohoto důvodu se další studium SNP jeví, také jako schůdná cesta pro vývoj různých systémů aplikovatelných do preventivní a léčebné medicíny. Hlavní snahou je proto charakterizovat dostatečné množství genů s klinicky významnou výpovědní hodnotou u MM.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

- Albertson DG, Ylstra B, Segraves R et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet.* 2000; 25:144-146.
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A.* 2005; 134(3):259-67.
- Blondal T, Waage BG, Smarason SV et al. A novel MALDI-TOF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(24):e155.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003; 33 Suppl:228-37. Review.
- Buda G, Maggini V, Galimberti S et al. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol.* 2007; 137(5):454-6.
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment

- of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005; 573(1-2):111-35.
7. Dutt A, Beroukhim R. Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19(1):43-9.
  8. Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Curr Opin Hematol.* 2005; 12(1):33-9.
  9. Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1991; 1(1):34-8.
  10. Hayes VM, Wu Y, Osinga J et al. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(20):e29
  11. Hosono N, Kubo M, Tsuchiya Y et al. Multiplex PCR-based real-time invader assay (mPCR-RETINA): a novel SNP-based method for detecting allelic asymmetries within copy number variation regions. *Hum Mutat.* 2008; 29(1):182-9.
  12. Howarth KD, Blood KA, Ng BL et al. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene.* 2007 Dec 17 [Epub ahead of print]
  13. Chadwick RB, Conrad MP, McGinnis MD et al. Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. *Biotechniques.* 1996; 20(4):676-83.
  14. Irizarry K, Kustanovich V, Li C et al. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nat Genet.* 2000 ;26(2):233-6.
  15. Ji M, Hou P, Li S, He N, Lu Z. Microarray-based method for genotyping of functional single nucleotide polymorphisms using dual-color fluorescence hybridization. *Mutat Res.* 2004; 548(1-2):97-105.
  16. Kirk BW, Feinsod M, Favis R et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(15):3295-311.
  17. Korsching E, Agelopolous K, Schmidt H et al. Improvements in the analysis strategy make single nucleotide polymorphism analysis a powerful tool in the detection and characterization of amplified chromosomal regions in human tumors. *Pathobiology.* 2006; 73(1):18-25.
  18. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008; 111(6):2962-72.
  19. Kwok PY Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2:235-58.
  20. Lijavetzky D, Cabezas JA, Ibáñez A et al. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics.* 2007; 8:424.
  21. Mehrotra B, George TI, Kavanau K et al. Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+lin-) in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1995; 86(3):1139-47.
  22. Nebes K, Mytilineos J, Moehler TM et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2002; 100(6):2263-5.
  23. Patiño-García A, Sotillo-Piñero E, Modesto C, Sierrasesúmaga L. Screening of the human tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter polymorphisms by PCR-DGGE analysis. *Mutat Res.* 1999; 406(2-4):121-5.
  24. Ribas G, González-Neira A, Salas A et al. Evaluating HapMap SNP data transferability in a large-scale genotyping project involving 175 cancer-associated genes. *Hum Genet.* 2006; 118(6):669-79.
  25. Smejkalová J, Vranová V, Oltová A et al. Comparison of standard prognostic factors with the deletion of 13q14 detected by interphase fluorescence in situ hybridization on separated and unseparated bone marrow cells in multiple myeloma. *Cas Lek Cesk.* 2005; 144(7):483-8.
  26. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stülgemayer S et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancor* 1997; 20:399-407.
  27. Stallings RL. Origin and functional significance of large-scale chromosomal imbalances in neuroblastoma. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 118(2-4):110-5.
  28. Underhill PA, Jin L, Lin AA et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 1997; 7(10):996-1005.
  29. Vangsted A, Gimsing P, Klausen TW et al. Polymorphisms in the genes ERCC2, XRCC3 and CD3EAP influence treatment outcome in multiple myeloma patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *Int J Cancer.* 2007; 120(5):1036-45.
  30. Walker BA, Leone PE, Jenner MW et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108(5):1733-43.
  31. Zhang H, Yang X, Wang K et al. On-chip oligonucleotide ligation assay using one-dimensional microfluidic beads array for the detection of low abundant DNA point mutations. *Biosens Bioelectron.* 2008; 23(7):945-951.



### PRAKTICKÁ APLIKACE JEDNO-NUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFIZMŮ U ANALÝZY MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### PRACTICAL APPLICATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN MULTIPLE MYELOMA ANALYSIS

SLANÝ M.<sup>1</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

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

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>4</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Studium polymorfizmů v genech asociovaných s mnohočetným myelomem (MM) je atraktivní oblastí výzkumu, který může přispět k celkovému pochopení této nemoci. Výzkumy v oblasti polymorfizmů u MM jsou zatím na experimentální úrovni. Cílem této práce je demonstrovat na vybraných zahraničních pracích možnost klinického využití polymorfizmů v oblasti MM.

**Klíčová slova:** genomika, jedno-nukleotidové polymorfizmy, signální dráhy, mnohočetný myelom.

#### Summary

Study of polymorphisms in genes associated with multiple myeloma (MM) is promising field of research. Study of this field could bring important piece to a global understanding of this illness. Research of polymorphisms associated with MM still remain at experimental stage. The aim of this work is to demonstrate a possible clinical utilization of polymorphisms in MM field.

**Keywords:** genomics, single nucleotide polymorphisms, signalling pathways, multiple myeloma.

#### Úvod

Jednou z možných aplikací metod molekulární biologie pro studium genetických změn u MM je detekce jednobodových nukleotidových polymorfizmů (SNP). Studium asociace SNP s nádorovými onemocněními zažilo v posledním desetiletí nebyvalého rozmachu. Tato oblast se zdá být nadějnou pro farmakogenomické aplikace. Většina prací je zatím pouze na experimentální úrovni, neboť stále probíhá testování kandidátních polymorfizmů na jejich klinickou relevanci. Jelikož se ale jedná o komplikovanou oblast výzkumu MM byly v literatuře zatím popsány pouze ojedinělé práce s klinicky významným výstupem.

#### Praktická aplikace SNP technologií

Možnou klinickou aplikovatelnost SNP analýzy MM je možno demonstrovat na studii vlivu polymorfizmu u genů DNA opravy (*ERCC1*, *ERCC2*, *XRCC3*) a apoptických genů (*PPP1R13L*, *CD3EAP*) na účinnost chemoterapie (Melphalan) u 348 pacientů s MM (2). Analýza polymorfizmů byla provedena pomocí Real-time PCR za použití TaqMan sond. Bylo zjištěno, že přítomnost polymorfizmů *ERCC2 K751Q*, *CD3EAP G-21A* a *XRCC3 T241M* je spojená s prodloužením intervalu pro účinnou dobu léčby (TTF) pomocí Melphalanu (Tabulka č.1). Přítomnost polymorfizmů forem genů vede k nižší kapacitě opravy DNA, a proto je daleko pravdě-

podobnější usmrcení maligních buněk. Vlivem vysoké koncentrace alkylačního činidla dochází k poškození DNA plazmatických buněk, což při nedostatečné opravě DNA u jedinců s indikovanými polymorfizmy vede k indukci apoptózy.

Dalším příkladem pro možnost aplikovat detekci polymorfizmů do oblasti studia MM je práce Nebena a spol. z roku 2002 (1). Byla provedena studie vlivu polymorfizmu promotoru genu pro Tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) na účinnost thalidomidové léčby u pacientů s MM. Thalidomid má antiangiogenní a imunomodulační vlastnosti a inhibuje tvorbu *TNF- $\alpha$  in vitro*. Studie prověřila polymorfizmy na promotoru *TNF- $\alpha$*  v pozicích -308 G/A a -238 G/A. Typizace odpovídajících polymorfizmů byla provedena pomocí sekvenčně specifické PCR. Souběžně byly imunochemicky měřeny hladiny *TNF- $\alpha$*  u pacientů s MM (relabování nebo s perzistentním MM). Bylo zjištěno, že alela -238A je asociována s vyšší hladinou *TNF $\alpha$*  před léčbou. Vysoký medián přežití byl pozorován ve skupině pacientů majících alelu -238G (viz. obrázek č.1).

#### Závěr

Využití SNP analýzy u MM má dozajista uplatnění v oblasti studia nádorových onemocnění. Právě přítomnost polymorfizmu na genomu člověka je jedním z faktorů, který způsobuje odlišnost lidských jedinců. Například přítom-

## příklady využití

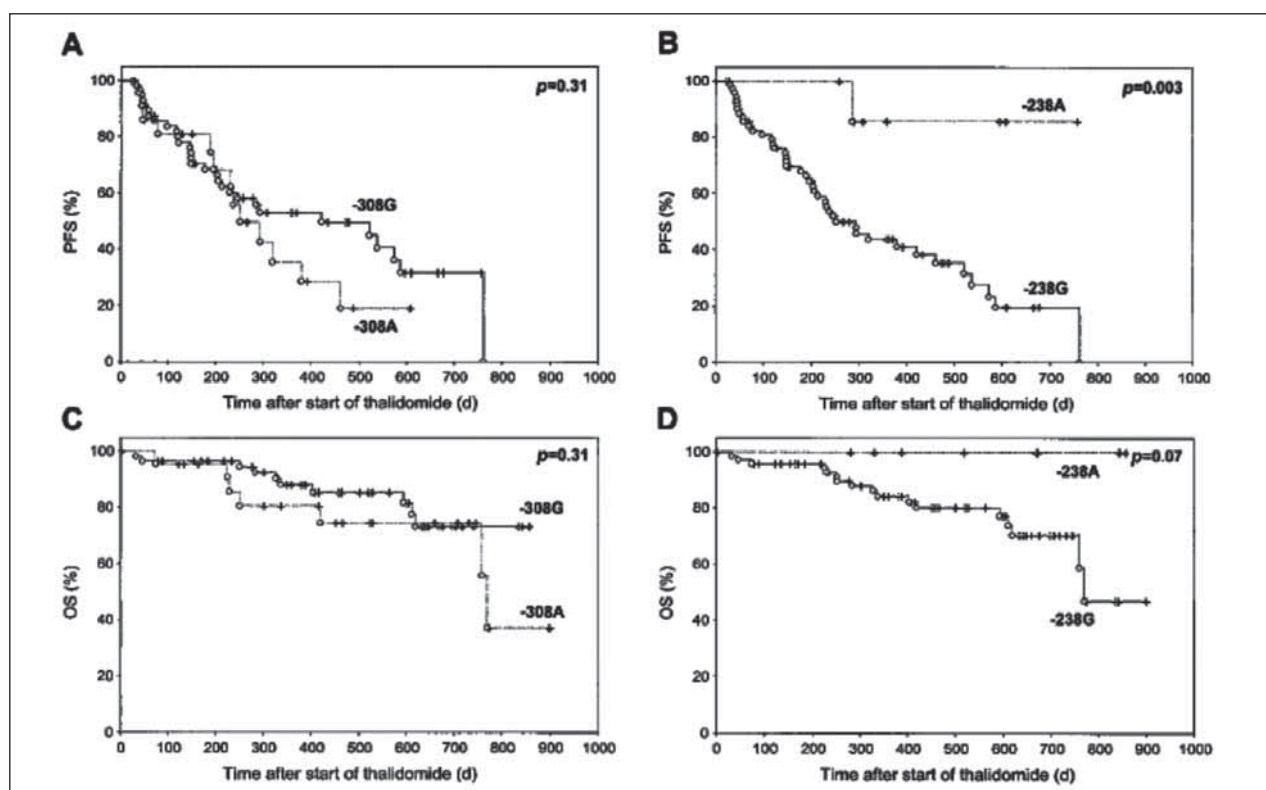
nost polymorfizmu v genu podílejícím se na metabolické nebo signální dráze podaného léku může způsobit rozdílný efekt u jedinců zařazených do stejné analytické skupiny. Hlavním omezením pro úspěšnou aplikaci SNP do klinické praxe je zatím nedostatečná znalost interakcí v genech asociovaných s MM. Důkladná znalost klinicky relevantních polymorfizmů pomůže při diagnostice onemocnění, stanovení prognózy nebo pro výběr efektivní léčebné strategie.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

ERCC2 K751Q	CD3EAP G-21A	XRCC3 T241M	N	Median TTF (mo)	HR	p
AA <sup>1</sup>	GG	NI <sup>2</sup>	94	23.4	1	
AA	AG + AA <sup>3</sup>	NI	42	28.6	0.6 (0.4–1.0) <sup>4</sup>	0.046
AC + CC	GG	NI	128	27.6	0.7 (0.5–0.9)	0.019
AC + CC	AG + AA	NI	68	48.6	0.4 (0.3–0.6)	<0.0001
AA <sup>1</sup>	NI	CC	46	17.5	1	
AA	NI	CT + TT	51	29.9	0.7 (0.4–1.2)	0.25
AC + CC	NI	CC	63	27.6	0.7 (0.5–1.2)	0.21
AC + CC	NI	CT + TT	81	49.9	0.4 (0.2–0.6)	0.0001
NI	GG	CC	78	22.5	1	
NI	GG	CT + TT	80	45.4	0.5 (0.3–0.7)	0.0004
NI	AG + AA	CC	31	69.4	0.4 (0.2–0.7)	0.001
NI	AG + AA	CT + TT	52	46.8	0.4 (0.3–0.7)	0.0006

Tabulka č. 1: Univariantní analýza vlivu kombinací polymorfizmů na TTF a medián přežití u pacientů s MM léčenými Melfalanem. <sup>1</sup>homozygotní nositel wild type alely, <sup>2</sup>nezahrnuto do analýzy, <sup>3</sup>heterozygotní nebo homozygotní nositel alely (Převzato Vangsted et al., 2007)



Obrázek č. 1: Charakterizace bezpříznakového období (PFS) a mediánu přežití (OS) u 81 pacientů s relabovaným a perzistentním MM pomocí polymorfizmů TNF- $\alpha$  -308A/G a TNF- $\alpha$  -238A/G. PFS byl počítán od začátku léčby thalidomidem do progresu onemocnění nebo smrti. Léčba thalidomidem byla zahájena dávkou 100 mg/den, poté byla každý týden dávka navýšena o 100 mg. Finální koncentrace thalidomidu 400 mg byla podána 22 týden po zahájení léčby (Převzato Neben et al., 2002).

### Literatura

- Neben K, Mytilineos J, Moehler TM et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*. 2002; 100(6):2263-5.
- Vangsted A, Gimsing P, Klausen TW et al. Polymorphisms in the genes ERCC2, XRCC3 and CD3EAP influence treatment outcome in multiple myeloma patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *Int J Cancer*. 2007; 120(5):1036-45.

## PROTEOMICKÁ ANALÝZA A JEJÍ VYUŽITÍ VE VÝZKUMU MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### PROTEOMICS AND ITS APPLICATION IN MULTIPLE MYELOMA RESEARCH

POTÁČOVÁ A.<sup>1</sup>, ČUMOVÁ J.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup>LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup>INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Základní metodou pro studium exprese proteinů je kombinace dvourozměrné elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu proteomu u pacientů s mnohočetným myelomem je možno využít plazmatické buňky či plazmu pacientů před léčbou, po léčbě a v průběhu onemocnění, což umožní monitorování léčebných odpovědí a možnost objevení nových biomarkerů zodpovědných za rezistenci či senzitivitu k podávanému léčivu.

**Klíčová slova:** proteomika, identifikace proteinů, dvourozměrná elektroforéza, mnohočetný myelom, plazma.

#### Summary

Two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry has become a fundamental technique for the study of protein expression. Proteomic analysis of plasma cells or plasmatic proteins can be done before and after treatment. Proteomics offers the possibility of identification of disease-associated protein markers for prognostic evaluation and for the selection of targets for specific drug therapy.

**Keywords:** proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, protein identification, multiple myeloma, plasma.

#### Úvod

Proteomika je vědní odvětví, pomocí něhož je možné analýzou všech proteinů přítomných v plazmě či buňkách charakterizovat strukturu a funkce celého proteomu za definovaných podmínek v daném okamžiku. Jejím cílem je separovat, identifikovat a charakterizovat proteiny a určit jejich vzájemné interakce. Proteomická analýza může být využita pro různé druhy vzorků jako jsou sérum a plazma, sliny, exudáty, buňky a jiné. Základní metodou pro studium exprese proteinů je kombinace dvourozměrné elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) s hmotnostní spektrometrií (MS), pomocí níž je možné identifikovat separované proteiny (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Schéma návaznosti jednotlivých kroků proteomické analýzy (2D-PAGE/MS)

Metoda 2D-PAGE byla poprvé popsána v roce 1975 O'Farrellem (10). Další vývoj vedl ke kombinaci elektroforetických technik s chromatografií či hmotnostní spektrometrií, čímž bylo umožněno separovat a identifikovat proteiny i ze složitých komplexních vzorků, jako je například lidská plazma.

#### Vstupní materiál, požadavek na kvantitu, kvalitu a čistotu

Aby byla proteomická analýza využitelná v klinické praxi, je nutno vyšetřit co největší soubor pacientů, což umožní monitorování léčebných odpovědí a možnost objevení nových biomarkerů zodpovědných za rezistenci či senzitivitu k podávanému léčivu. Pro analýzu proteomického profilu u pacientů s mnohočetným myelomem je možno využít plazmatické buňky vyseparované z kostní dřeně, plazmu, popřípadě sérum.

Platná norma pro zpracování vzorku pro proteomickou analýzu neexistuje. Obecné doporučení pro 2D-PAGE je provést separaci vzorků ihned, to však z hlediska sběru biologického materiálu a technické náročnosti není možné, a proto se doporučuje veškerý materiál okamžitě po odběru zamrazit ve vzduchotěsných kryotubách a uchovávat v tekutém dusíku nebo v hlubokomrazicích boxech s konstantní teplotou minimálně -80°C. Tyto vzorky zpracovat ihned po rozmražení a opakovaně nezamrazovat (13, 12, 9).

Před separací pomocí 2D-PAGE musí být proteiny ve

vzorku solubilizovány, denaturovány, redukovány a alkylovány, aby byly narušeny veškeré mezimolekulové interakce, a aby každý výsledný proteinový spot reprezentoval jen jeden samostatný polypeptid. K solubilizaci vzorku se používají pufrů obsahující chaotropní látky (urea, thiourea), detergenty (dodecylsiran sodný, Triton X-100, CHAPS) a redukční činidla (dithiothreitol). Směs urea/thiourea je nezbytná pro účinné rozrušení vodíkových můstků a hydrofobních interakcí (3, 4). Detergenty se používají preventivně, aby bránily interakcím mezi hydrofobními doménami proteinů a redukční činidla proti zpětné oxidaci disulfidických vazeb. Pomocí těchto pufrů lze dosáhnout kompletního rozvolnění proteinů ve směsi.

### Princip metody

#### 2D-elektroforéza

2D-PAGE je založena na rozdělení proteinové směsi podle izoelektrických bodů a molekulových hmotností jednotlivých proteinů. Vzorek je nejprve separován v tenkém proužku akrylamidového gelu s imobilizovaným gradientem pH (IPG strip). V tomto kroku se bílkoviny rozdělí podle jejich okamžitého náboje, ten je nulový v oblasti pH odpovídající izoelektrickému bodu. Bílkoviny v izoelektrickém bodě tak ztrácejí mobilitu a nemohou již z tohoto místa migrovat dále. Poté je proužek gelu s rozdělenými bílkovinami převeden na horní okraj polyakrylamidového gelu. V elektrickém poli, kolmém na původní směr dělení, migrují proteiny k anodě v prostředí SDS a separují se podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je dvourozměrná mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristickou pozici. V závislosti na zvoleném pH gradientu stripu pro izoelektrickou fokusaci a na použité velikosti gelu je tato technika schopna rozdělit velká množství proteinů s molekulovou hmotností 6-300 kDa. Pomocí vysokokapacitních elektroforetických aparatur probíhá proteomická analýza u 12 vzorků současně, čímž se zvyšuje reprodukovatelnost vytvořených proteinových map. Nevýhodou této techniky je vysoká náročnost na kvalitu a kvantitu vstupního materiálu, nemožnost úplného kvantitativního vyhodnocení v celém rozsahu koncentrací, jelikož se hladiny proteinů pohybují v širokém dynamickém rozmezí až 10 řádů. Další limitací je stále velice obtížná analýza hydrofobních proteinů, velmi malých a extrémně velkých proteinů (5, 11, 14, 7).

#### Vizualizace proteinů

Po 2D-elektroforéze je třeba separované proteiny na gelu zafixovat a poté vizualizovat. Fixace probíhá několik hodin v roztoku ethanolu/kyseliny octové a vody a poté je možno barvit proteiny vybranou technikou. Jednotlivé typy značení proteinů mají své přednosti, ale i své nevýhody. Nejběžněji používanými jsou barvení Coomassie brilliant blue a stříbrem. Barvení Coomassie blue je jednoduché, je však limitováno detekčním limitem (0,2 µg proteinu na spot), a umožní tak detekovat pouze majoritní složky proteinové směsi (3). Naproti tomu stříbření je mnohem vhodnější nástroj pro detekci proteinů s nízkými koncentracemi ve vzorku, neboť je až 100 krát senzitivnější než Coomassie blue. Obě tyto techniky však vykazují poměrně malé dynamické rozmezí, tendenci k negativnímu barvení jistých

proteinů a malou reprodukovatelnost, která je u barvení Coomassie o něco vyšší, jelikož se jedná se o end-point techniku barvení, zatímco stříbření je založeno na subjektivním vyhodnocení intenzity barvení, což snižuje využitelnost pro další kvantitativní vyhodnocování. Zavedením fluorescenčních barvicích technik se na trhu objevila alternativa k stříbření. Barvení proteinů pomocí Sypro Orange, Sypro Red a Cy2, 3 a 5 má srovnatelnou senzitivitu se stříbřením, což umožňuje detekovat i nízkoabundantní proteiny ve směsi a navíc disponují tyto techniky širokým dynamickým rozmezím, a tudíž jsou mnohem efektivnější (5). Pro kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení proteomických map nabízí několik firem hardwarové vybavení (scannery, fluorescenční scannery) a softwarové vybavení, například Bio-Rad (PDQuest), Amersham Biosciences (ImageMaster).

#### Hmotnostní spektrometrie

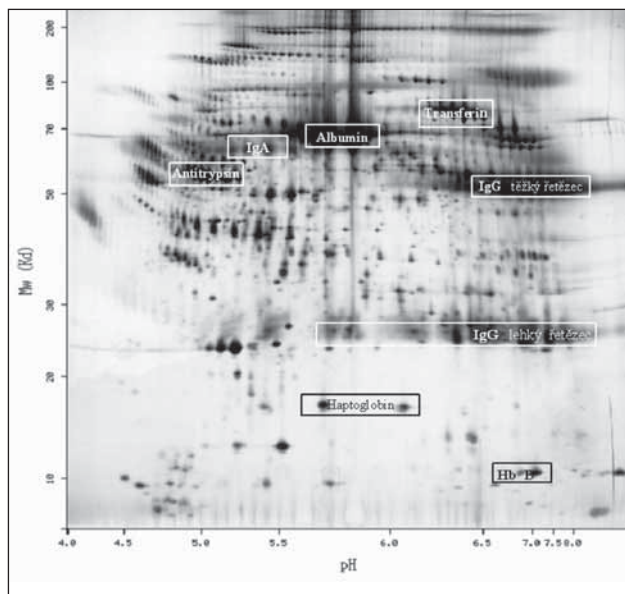
Před vlastní analýzou na hmotnostním spektrometru je nutné vybrané spoty z gelu vyřezat, převést do roztoku a bílkoviny enzymaticky naštěpit na směs menších peptidů. Nejčastěji je používán trypsin, který až na výjimky štěpí za argininem a lyzinem, a generuje tak peptidy o délce cca 10-30 aminokyselin (11).

Pro identifikaci proteinů (z jednotlivých spotů, vyřezaných z gelu) se využívá hmotnostní spektrometrie, která na základě analýzy naštěpených peptidů poskytuje vedle vlastní identifikace i informaci o aminokyselinové sekvenci proteinu či o druhu a lokalizaci modifikací. MS je založena na rozdělení iontů analyzovaných látek podle jejich poměru hmotností a náboje ( $m/z$ ) v elektrickém/magnetickém poli. K analýze proteinů se například používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s analyzátozem doby letu (TOF, time-of-flight). Po ionizaci jsou látky urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a vstupují do trubice analyzátozem doby letu, kde jsou separovány, následně dopadají do detektoru. Z doby průletu je pak zjištěn jejich  $m/z$ , resp. molekulová hmotnost. Jako komplementární ionizační technika k MALDI pro analýzu peptidů a proteinů se používá elektrosprej, schopný produkovat vícenásobně nabitě ionty, které jsou pak analyzovány hmotnostními analyzátozem různého typu (např. iontová past). V proteomické analýze se obvykle používá ve spojení on-line s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tato kombinace umožňuje snadnější analýzu směsí, příp. odlišení analytu od kontaminujících složek. Vyšší specifitu a podrobnější informace je možné získat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ( $MS^n$ ). Vybraný iont je fragmentován (např. za přítomnosti helia, methanu) a poskytuje  $MS/MS$  spektrum. Současné spektrometry automaticky produkují  $MS/MS$  spektra na základě různě nastavených parametrů, např. intenzity přítomných iontů, přítomnosti vybraného iontu, jednoho ze seznamu vyprodukovaných iontů apod. Další možné modifikace  $MS$  technik jsou podrobněji popsány v článkách Zelená (14), Petrák (11).

Získaná  $MS$ , resp.  $MS/MS$  data jsou pak použita k vyhledávání a identifikaci proteinu pomocí databázového prohledávání. Na internetu je dostupných několik data-



bázi zaměřených na identifikaci proteinů, např. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. K dispozici jsou i vzorové 2D-proteinové mapy pro jednotlivé typy vzorků (Obrázek č. 2), viz ExPASy Molecular Biology Server <http://www.expasy.ch/> (7).



Obrázek č. 2: Ukázka 2D mapy proteinového profilu lidské plazmy. Převzato a doplněno z <http://www.expasy.ch>

### Specifická nastavení a problémy u MM

Proteomická analýza výše zmíněných biologických materiálů však narazí na určité limity. Klíčovou podmínkou pro vytvoření proteinového profilu myelomových buněk pomocí 2D-PAGE je jejich dostatečné množství a vysoká čistota. Proto je nutno před vlastní analýzou získat například imunomagnetickou separací (MACS) alespoň jeden milion plazmatických buněk s čistotou vyšší než 90%. Základním problémem při proteomické analýze plazmy či séra je detekovat minoritní proteiny s malou molekulovou hmotností v přítomnosti vysokoabundantních proteinů (5), kterých je v plazmě 85-90% z celkového množství proteinů. U těchto vzorků se doporučuje selektivně odstranit tyto majoritní proteiny a provádět 2D separaci pouze z minoritně zastoupených proteinů (viz níže).

### 2-DE analýza lidské plazmy

Plazma, základní a nejdostupnější klinický vzorek, obsahuje značné množství (60-80 mg/ml) a široké spektrum proteinů. Mnohých z nich je již po dlouhá léta využíváno jako ukazatelů fyziologických funkcí a biomarkerů patofyziologických procesů. Studium proteomu plazmy slibuje pokrok v oblasti biologického a klinického výzkumu mnoha onemocnění, což se sebou přináší naději na objevení nových biomarkerů použitelných pro diagnostiku onemocnění, předpověď odezvy na terapii a monitorování progresu onemocnění (1, 6, 8).

Pro proteomickou analýzu se obecně doporučuje plazma sbíraná do EDTA nebo citrátu zpracovaná co nejrychleji od odběru. Lidská plazma obsahuje kolem 10 000 různých proteinů a disponuje velice širokým kvalitativním i kvant-

titativním dynamickým rozmezím, přičemž rozdíly mezi hladinami majoritních a minoritních proteinů se pohybují v rozmezí 10 řádů (1). Většina z nich jsou proteiny s velmi nízkým zastoupením. Nejpočetněji zastoupenými proteiny v plazmě jsou albumin (50 – 70%) a imunoglobulin G (8 – 26%). Během separace na gelu vysoké koncentrace těchto proteinů maskují přítomnost proteinů, které mají stejný izoelektrický bod či podobnou molekulovou hmotnost. Aby bylo možno detekovat minoritní proteiny, je třeba nejdříve odstranit většinou zastoupené proteiny. Toho je možno docílit pomocí afinitní kolony či za použití specifických protilátek. K tomuto účelu je na trhu dostupných několik analytických metod využívajících různých deplečních principů (2).

Na našem pracovišti jsou využívány dvě metody:

- 1) ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit od Sigmy-Aldrich, pomocí něhož lze ze séra či plazmy odstranit albumin a IgG
- 2) High Capacity Multiple Affinity Removal System od Agilent Technologies (MARS). Jedná se o separaci pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie za použití speciální afinitní kolony pro vysoce specifickou imunoseparaci šesti v plazmě majoritně zastoupených proteinů: albuminu, IgG, IgA, haptoglobinu, antitrypsinu a transferrinu.

### Stávající význam a očekávaný přínos 2D-PAGE u MM

Uplatnění proteomiky v problematice MM je doposud minimální. Proteomika by měla navázat tam, kde již genomický přístup nestačí. O rozvoji a dynamice onemocnění rozhodují kromě vlastností myelomových plazmatických buněk i jejich vzájemné interakce s prostředím kostní dřene (6). Cytokinové interakce mezi plazmatickými buňkami a buňkami kostní dřene umožňují růst, přežívání a migrace myelomových buněk a předpokládá se, že částečně odpovídají za přechod monoklonální gamapatie do MM. Analýzou proteomu můžeme získat hlubší a komplexnější vysvětlení příčin progresu monoklonální gamapatie nejasného významu do MM, příčin rezistence a senzitivity pacientů s MM na léčbu. Pomocí proteomické analýzy by mohl být nalezen nový panel biologických markerů zodpovědných za rezistenci či citlivost na danou léčbu, či na testované nové látky, což by umožnilo v klinické praxi předem specifikovat optimální léčebnou strategii pro konkrétního pacienta, a tak léčit MM maximálně efektivně.

	Výhody 👍	Nevýhody 👎
1) ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit	rychlá, instrumentálně nenáročná, přijatelná cena, možnost depletovat až 25 vzorků paralelně, kompatibilní s 2D-PAGE a hmotnostní spektrometrií	depletuje pouze albumin (95%) a IgG (80%), má nižší účinnost
2) High Capacity Multiple Affinity Removal System	depletuje 6 vysokoabundantních proteinů, což znamená až 85-90% celkových proteinů plazmy	časově náročná, drahá, není možné separovat vzorky paralelně, vzorky je nutno zkoncentrovat a odsolit

Tabulka č. 1: Porovnání ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit s MARS kapalinovou chromatografií

### Závěr

Ač se jedná o časově a instrumentálně velice náročnou metodiku, která má stále mnoho omezení převážně v oblasti reprodukovatelného kvantitativního vyhodnocení, představuje rozvoj proteomiky novou a vzrušující cestu k bližšímu poznání patologických procesů na molekulární úrovni. Informuje nás o expresi specifických proteinových profilů a o jejich změnách významných pro různé patologické stavy. Předpokládá se, že dalším rozvojem proteo-

mických metod a v kombinaci s výsledky z gemonických analýz budeme moci složit úplný a vyčerpávající obraz většiny patologických stavů a najít nové biomarkery, které by sloužily pro diagnostiku onemocnění, předpověď odezvy na terapii a monitorování progresu onemocnění.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov;1(11):845-67. Review. Erratum in: *Mol Cell Proteomics*. 2003 Jan;2(1):50.
2. Björnhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*. 2005 Jan;5(1):307-17.
3. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):3665-85. Review. Erratum in: *Proteomics*. 2005 Feb;5(3):826-7.
4. Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1999 Apr-May;20(4-5):660-3.
5. Herosimczyk A, Dejeans N, Sayd T, et al. Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 7:81-93.
6. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):509-24.
7. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*. 2000 Nov;192(3):280-8.
8. Kim MR, Kim CW. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr 15;849(1-2):203-10.
9. Lundblad RL. Considerations for the Use of Blood Plasma and Serum for Proteomic Analysis. *The Internet Journal of Gastroenterology* 2005; 1(2).
10. O'Farrell H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*. 1975; 250: 4007-4021.
11. Petrák J. Proteomics and its role in medicine *Cas Lek Cesk*. 2005;144(6):365-70.
12. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. 2005 Aug;5(13):3262-77.
13. Tworoger SS, Hankinson SE. Collection, processing, and storage of biological samples in epidemiologic studies: sex hormones, carotenoids, inflammatory markers, and proteomics as examples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Sep;15(9):1578-81.
14. Zelená J, Hájek R. Proteomics techniques and their application in haemato-oncologic malignancies. *Cas Lek Cesk*. 2007;146(7):586-92.

## APLIKACE PROTEOMIKY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### APPLICATIONS OF PROTEOMICS IN MULTIPLE MYELOMA

POTÁČOVÁ A.<sup>1</sup>, ČUMOVÁ J.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, OKH (LEHABI), FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Dokonalé poznání klíčových molekul signálních drah je atraktivní strategií pro vývoj a volbu nových mnohem efektivnějších léků. Tato práce se zaměřuje na využití proteomických metod při studiu mnohočetného myelomu a předkládá stručný přehled doposud publikovaných zahraničních prací zaměřených na toto téma.

**Klíčová slova:** proteomika, identifikace proteinů, signální dráhy, mnohočetný myelom.

#### Summary

Comprehensive knowledge of signaling pathways in cancer should lead to the development of novel and more effective treatment strategies. This review focuses on applications of proteomics in multiple myeloma and includes a brief literature survey of this topic.

**Keywords:** proteomics, protein identification, signaling pathways, multiple myeloma.

#### Úvod

Zavedením nových technik genomické a proteomické analýzy došlo k dramatickému nárůstu nových informací o molekulární podstatě rozvoje mnoha krevních nádorových onemocnění či proteinových změn vzniklých následkem léčby. Proteomické studie patří mezi nejnovější a také neobtěžnější. Jsou mimořádně metodicky náročné. Doposud lze ve světové odborné literatuře nalézt jen ojedinělé práce z oblasti proteomiky zaměřené na mnohočetný myelom (MM) a monoklonální gamapatie nejasného významu. Níže uvádíme stručný přehled doposud publikovaných zahraničních prací zaměřených na toto téma.

#### Proteinový profil myelomových buněk

Genetické aberace a interakce mezi myelomovými buňkami a mikroprostředím kostní dřeně jsou klíčovými jevy v patofyziologii maligního růstu MM (1). V tomto prostředí dochází k vyplavování důležitých cytokinů včetně IL-6, vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), TNF  $\alpha$ , které podporují vlastní nádorový růst a mohou chránit myelomovou buňku před léky indukovanou apoptózou. Doposud byly tradičními proteinovými analýzami (ELISA, western blot) a oligonukleotidovými microarrays studovány jednotlivé dráhy a markery růstu a přežívání myelomových buněk např.: proteinkináza aktivovaná mitogenem (MAPK), kináza související s tyrozin-proteinkinázou fokální adheze (RAFTK= related adhesion focal tyroxine kinase), fosfatidylinositol 3-kináza/Akt (PI3K/Akt), nukleární faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a Notch signalizace a heat shock proteiny (2, 4).

Mezi současné metody v proteomické analýze patří i kom-

binace proteinových čipů umožňujících předseparaci vzorků s hmotnostní spektrometrií (SELDI-TOF MS). Pro kultivaci byly použity myelomové plazmatické buňky izolované z kostní dřeně 50 pacientů s MM metodou imunomagnetické separace (autoMACS). Při analýze interakcí mezi myelomovými plazmatickými buňkami a osteoklasty (7) byla nalezena zvýšená hladina chondroitin syntázy 1 (CHSY1). Předpokládá se, že tento enzym přímo ovlivňuje Notch signalizaci, a to jak vazbu, tak i post-translační modifikaci, a tím zasahuje do interakčních dějů mezi myelomovými buňkami a mikroprostředím kostní dřeně. Aktivace Notch1 chrání buňky před léčivem navozenou apoptózou. CHSY1 stimuluje Notch2 a inhibuje Notch1 signalizaci a tím značně ovlivňuje senzitivitu myelomových buněk na chemoterapii (7).

Pomocí kombinace kapilární kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (nano-LC-MS/MS) byly v proteomu izolovaných plazmatických buněk pacientů s MM zaznamenány abnormální exprese proteinů, které přímo souvisejí se změnami vedoucími k jevu nazývanému stres endoplazmatického retikula (3). Tyto změny zahrnovaly proteiny účastníci se oxidace mastných kyselin (Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, VLCAD), vzniku oxidačního stresu (ste20/oxidant stress responsive kinase 1), modifikace DNA (transforming protein ERG, methyltransferase-like protein 7A), apoptózy a přežívání (hsp75, apoptosis-inducing factor1), syntézy bílkovin (ribosome-binding protein, Unc-13D), adhezních proteinů a signálních drah (sts-1, stem cell growth factor, small inducible cytokine B7).

V roce 2007 byla vydána publikace, v níž autoři popisují

## příklady využití

změny v proteomu plazmatických buněk *in vitro* na buněčných liniích senzitivních a rezistentních na dexamethason (6). Po kultivaci senzitivní linie MM.1S s dexamethasonem byly vzorky analyzovány pomocí 2D-elektroforézy kombinované s hmotnostní spektrometrií. Kromě redukce mitochondriálního membránového potenciálu a snížení exprese NF- $\kappa$ B, jednoho z centrálních transkripčních faktorů myelomových buněk, bylo zjištěno, že většina identifikovaných proteinů s významně sníženou hladinou je zahrnuta v procesech proliferace a přežívání buněk. Z identifikovaných proteinů jmenujme například kofaktor DNA polymerázy (PCNA = proliferating cell nuclear antigen),  $\gamma$  podjednotku eukaryotického translačního elongačního faktoru 1, která je odpovědná za enzymatický přenos aminoacylu tRNA na ribozom, SUMO-1 aktivující enzym, jenž kontroluje degradaci proteinů v buňce, fortilin – protein regulující apoptózu. Dále byla pozorována zvýšená exprese FK506 vazebného proteinu 5 (FKBP5), RAFTK a prolyl 4-hydroxylázy  $\alpha$ -1. FKBP5 je členem komplexu Hsp90 steroidních receptorů, který je důležitý při udržování konformace glukokortikoidů ve stavu schopném vázat steroidy. Hsp90 je jedním z nejvíce zastoupených chaperonových proteinů buňky. Chrání před agregací proteinů, pomáhá stabilizaci proteinů společně s usnadněním aktivace mnoha jeho vazebných proteinů. Hladina FKBP5 byla u senzitivní linie naměřena po expozici dexamethasonem signifikantně vyšší ve srovnání s rezistentní linií, u níž došlo pouze k minimální indukci (6). Lze tedy předpokládat,

že měření hladin FKBP5 by mohlo být užitečné při screeningu klinické rezistence/senzitivity pacienta na terapii dexamethasonem.

### Závěr

Hledání klíčových molekul signálních drah je atraktivní strategií pro vývoj nových léků nejen v onkologii. Jde především o dráhy působící na růst, množení, diferenciaci nebo apoptózu nádorových buněk. Proteomická analýza by měla být doplněním a klíčovým vyústěním analýzy genomu, obzvláště když regulace proteinové exprese na translační a post-translační úrovni může tlumit změny dané na úrovni transkripce genu a informace získané studiem mRNA nevypovídají o konečném množství, struktuře a aktivitě proteinů. Doposud publikované práce zabývající se studiem proteomu myelomových buněk poskytují zatím neucelené a kusé informace o funkcích jednotlivých signálních drah při rozvoji onemocnění a o možné odpovědi na konkrétní léčbu. Otevřenou otázkou stále zůstává, jak získané poznatky uplatnit v klinické praxi. Důkladná znalost proteinového profilu a vzájemných interakcí klíčových proteinů pomůže při diagnostice onemocnění, k stanovení prognózy a při výběru efektivní cílené léčebné strategie.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006; 42(11):1574-80.
2. Chatterjee M, Jain S, Stühmer T et al. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*. 2007; 109(2):720-8.
3. Drach J, Slany A, Sagaster V et al. A Cellular Proteome Map of Human Multiple Myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 111.
4. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*. 2008; 111(4):2220-9.
5. Petrák J. Proteomics and its role in medicine *Cas Lek Cesk*. 2005;144(6):365-70.
6. Rees-Unwin KS, Craven RA, Davenport E, Hanrahan S et al. Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007; 139(4):559-67.
7. Yin L. Chondroitin synthase 1 is a key molecule in myeloma cell-osteoclast interactions. *J Biol Chem*. 2005; 280(16):15666-72.



## FLOWCYTOMETRICKÁ ANALÝZA PLAZMATICKÝCH BUNĚK U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF PLASMA CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

KOVÁŘOVÁ L.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Imunofenotypizace myelomových buněk přináší dostatek informací k charakterizaci a odlišení těchto heterogenních neoplastických plazmocytů od jejich normálních protějšků a své uplatnění tedy nalézá v diferenciální diagnostice. Stanovení antigenního profilu PC může též napomoci identifikaci prognostických markerů, které by vedly jednak k jednoznačnému stanovení diagnózy a určení pravděpodobnosti progresu u asymptomatických monoklonálních gamapatií, ale také k případnému hodnocení minimální reziduální choroby či účinnosti léčby u mnohočetného myelomu. Je snahou Evropské myelomové sítě (European Myeloma Network), EMN, sjednotit a standardizovat flowcytometrické vyšetření plazmocytů v rámci monoklonálních gamapatií.

**Klíčová slova:** monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, plazmatické buňky, flowcytometrie.

#### Summary

Immunophenotyping of myeloma cells is used to characterize the malignant plasma cells and to distinguish them from their normal counterparts. Flow cytometry is mostly used for the diagnosis of plasma cell proliferations but a detailed analysis of plasma cell immunophenotype can identify disease markers that are associated with the progression of monoclonal gammopathy of unknown significance to multiple myeloma (MM), the prognosis of MM, the response to treatment, and the presence of minimal residual disease. The aim of the European Myeloma Network (EMN) is to unify and standardize immunophenotyping methods for the analysis of plasma cells in monoclonal gammopathies.

**Keywords:** monoclonal gammopathy, multiple myeloma, plasma cells, flow cytometry.

#### Úvod

Průtoková cytometrie se v diagnostice mnohočetného myelomu (MM) uplatňuje od 90. let 20. století, přestože se nejprve u plazmatických buněk (PC) věnovala spíše DNA analýze (15, 3). Postupně, s vývojem monoklonálních protilátek, se objevovaly údaje o fenotypu PC, které se dále zpřesňovaly (2, 33, 12, 36). Studovány byly také rozdíly ve fenotypu normálních a maligních PC (38, 9). Jako zásadní se jeví objev protilátky B-B4 proti znaku CD138 (Syndecan-1), který významně doplňuje identifikaci PC (39). Časem bylo vymezeno spektrum povrchových a intracelulárních markerů, které jsou i nadále využívány v analýzách fenotypu PC a jeho vztahu k diferenciální diagnostice onemocnění, nicméně v současnosti je stále více pozornosti věnováno také možnostem stanovení prognózy pacientů a detekci minimální reziduální choroby (MRN) (24, 4, 30).

Lidské plazmocyty tvoří heterogenní populaci buněk a mohou být rozděleny do několika podtypů. V lymfoidních tkáních se nacházejí proliferující plazmablasty s krátkou dobou života, v periferní krvi (PK) přechodné plazmatické buňky a v kostní dřeni (KD) se nalézají většinou neproliferující plazmocyty s dlouhou dobou života (20). Pro identifikaci všech typů PC je zásadní znak CD38, který je

na PC silně exprimován, přestože není jejich specifickým markerem (10). Je známo, že zralé neoplastické PC mohou CD38 exprimovat s nižší intenzitou než fyziologické PC (16). Naopak CD138 je exprimován pouze na PC, normálních i patologických, a to již ve stádiu prekurzorů (11). Ztráta exprese CD138 a jeho uvolnění do plazmy vede k apoptóze PC, což vypovídá o regulační funkci tohoto proteoglykanu (6). Další informaci přináší exprese znaku CD45, který mizí v průběhu diferenciace a na zralých PC již nebývá exprimován, avšak u cirkulujících či reaktivních nemaligních PC může být exprese zachována (27). Bylo zjištěno, že také v KD pacientů s MM existuje subpopulace CD45<sup>+</sup> PC tvořící proliferující složku PC (32). Z hlediska posuzování „normality“ PC je důležitá exprese B lymfocytárního markeru CD19, tento může být využit pro identifikaci potenciálně fyziologických reziduálních PC, které vykazují polyklonální charakter, zatímco exprese znaku CD56 je významně častější u patologických monoklonálních PC (4, 22). Pro fyziologické PC je také charakteristická exprese znaku CD27, jehož exprese na PC se pojí s lepší prognózou pacientů (8). Naopak mezi aberrantně exprimované markery neoplastických PC jsou u pacientů s MM řazeny B-lymfocytární marker CD20, kostimulační molekula T lymfocytů CD28 a CD117 (c-KIT),

přičemž pro tyto znaky byl prokázán vztah mezi antigenním profilem PC, DNA ploidií a specifickými genetickými změnami (18).

### Princip metody a její různé podtypy

Každá buňka je charakterizována systémem povrchových a intracelulárních antigenů, které mohou být využity k její identifikaci. Tzv. CD klasifikace (clusters of differentiation, CD) byla ustanovena v r. 1982 v Paříži, přičemž nejprve obsahovala pouze leukocytární antigeny, posléze byly zahrnuty i znaky dalších buněčných populací a v současné době už obsahuje 350 znaků (40).

Průtoková cytometrie využívá k identifikaci subtypů buněk jejich funkčních i strukturálních vlastností. Buňky v suspenzi jsou unášeny nosnou kapalinou a jedna po druhé se potkávají s paprskem laseru o určité vlnové délce, přičemž dochází jednak k rozptylu světla na buňkách, ale také k excitaci fluorochromů konjugovaných s protilátkami navázanými na buňkách. Pohlčená energie je následně emitována formou fluorescence, která je v přístroji dále zpracovávána. Všechny parametry získané převodem světelného signálu na elektronický na patřičných detektorech přístroje jsou zaznamenávány a uchovány. Výhodou oproti fluorescenčnímu mikroskopu je jednak vyšší množství současně použitých fluorochromů definujících jednotlivé antigeny, ale také podstatně vyšší množství analyzovaných částic. Klasická imunofenotypizace tedy využívá, kromě znalosti velikosti a granularity analyzovaných buněk, elektronickou „vizualizaci“ vazby protilátka-antigen, přičemž nejčastěji je využíváno komerčních monoklonálních protilátek. Při DNA analýze je „vizualizován“ obsah DNA v buňkách, a to prostřednictvím stechiometrické interkalace propidium jodidu (PI) mezi báze DNA analyzovaných buněk, které mohou být současně označeny navázanou protilátkou.

V současnosti je v imunofenotypických analýzách stále více využíváno nejen mnohobarevné (multicolor, multiparametric) průtokové cytometrie, ale také tzv. polychromatické průtokové cytometrie, která pracuje s kombinacemi 5-18 fluorescencí (17). Takovéto průtokové cytometry využívají k excitaci fluorochromů 1-4 laserů, ašak zatím se jedná spíše o experimentální přístup.

### Vstupní materiál, požadavek na kvantitu a kvalitu, čistotu

K imunofenotypické analýze PC může být využita jednak KD, ale svůj diagnostický význam má také analýza PK, kde se mohou nacházet cirkulující PC. Obecně nejsou dány žádné požadavky na kvantitu, kvalitu a čistotu materiálu, přestože je zřejmé, že v případě KD by analýza měla být provedena nejlépe z 1. aspirátu. Vzorky PK i KD, odebrané do EDTA, by měly být zpracovány pokud možno do 24h od odběru.

### Odkaz na platnou normu či závazné doporučení

Za základě dvou uskutečněných workshopů pořádaných Evropskou myelomovou sítí (European Myeloma Network, EMN) byl vytvořen „manuál“ pro analýzu PC, který obsahuje několik doporučení (30).

### Specifická nastavení u MM

Všeobecně se soudí, že průtoková cytometrie není zásadním vyšetřením u MM, a to zejména proto, že existují další parametry a kritéria, která jednoznačně stanoví diagnózu (7). Na řadě pracovišť se tedy fenotypizace PC omezuje pouze na analýzu znaků CD38, CD138 a CD45 a stanovení zastoupení PC v PK i KD, přičemž nejsou prováděna přídatná vyšetření pro upřesnění fenotypu či klonality PC a jejich vztahu k prognóze pacientů.

Při studiu cirkulujících PC v PK bylo zjištěno, že jejich množství je u nových pacientů s MM nezávislý prognostický faktor, kdy byla nalezena inverzní korelace mezi počtem cirkulujících PC a celkovým přežitím (23). Počty cirkulujících PC také reagují na léčbu (31), což umožňuje studovat souvislost mezi jejich množstvím a minimální reziduální chorobou (1; 13). Předpokládáme, že cirkulující PC pacientů s MM, převážně fenotypu CD38<sup>+++</sup>CD138<sup>+++</sup>CD45<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, jsou známkou pokročilého stádia onemocnění a prognostický význam jejich počtu, případně i fenotypu, by měl být dále ověřen (14).

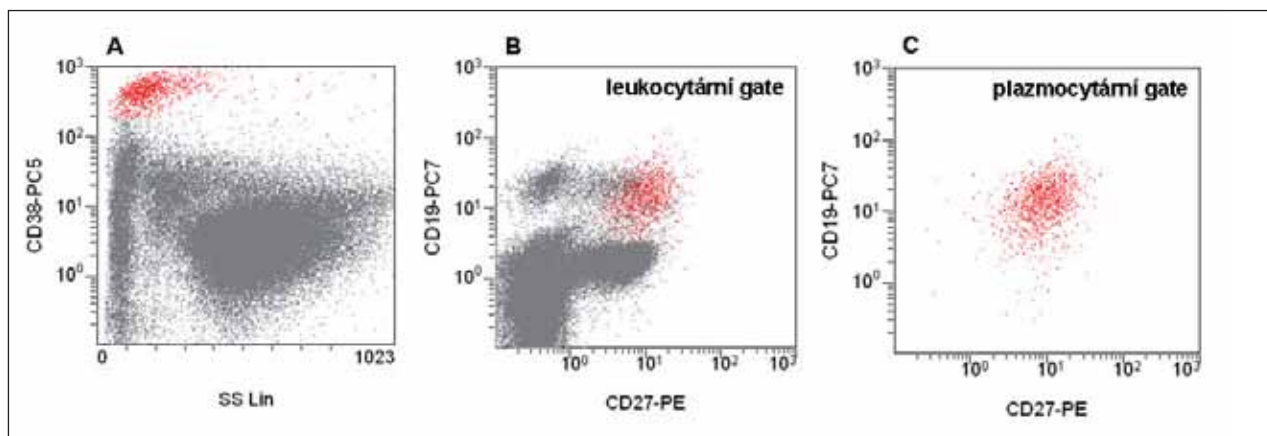
Jak morfologické, tak flowcytometrické stanovení infiltrace KD plazmocytů může vést k odlišení MGUS od MM, ale předpokládá se, že % PC stanovené pomocí flowcytometrie má větší prognostický význam nežli morfologicky stanovená infiltrace (19). Při využití kombinace markerů CD38, CD138 a CD45 je sice možno stanovit infiltraci PC v KD, avšak nemůže tak být získána informace o charakteru PC, což je důležité zejména z hlediska hodnocení reziduálních normálních PC u MGUS či případně u studia MRN léčených pacientů s MM. Jsou známy markery, které jsou s vysokou pravděpodobností exprimovány na normálních PC (CD19, CD27, CD81) a dále markery, jejichž exprese je naopak omezena především na maligní PC (CD56, CD117, CD20, CD28, CD200). Některé z těchto znaků zatím nejsou detailně prostudovány (např. CD81, CD200) a lze očekávat, že do budoucna se mohou objevit další markery hrající úlohu patofyziologii maligních PC (30, 4).

Pro potvrzení klonality PC je nutno analyzovat cytoplazmatickou expresi lehkých řetězců kappa a lambda, přičemž zde se uplatňuje 5-barevná analýza (CD38, CD138, CD45, κ, λ), obdobně jako u studia „normality“ PC (CD38, CD138, CD45, CD19, CD56).

V případě DNA analýzy, využívané ke stanovení % proliferujících PC a jejich ploidiie, se při využívání silné exprese CD38 na PC, jelikož intenzita exprese znaku CD138 není ve většině případů dostatečná pro odlišení plazmocytů od ostatních leukocytů (37). DNA aneuploidie je u MM považována za genetický marker malignity, aneuploidní PC i klonální B lymfocyty lze nalézt v PK, KD a též v separátu krevních kmenových buněk (peripheral blood stem cells, PBSC) (35). Bylo taktéž prokázáno, že ke změnám v obsahu DNA dochází v čase od stanovení diagnózy do progresu onemocnění velmi zřídka (5).

Rozšířená imunofenotypizace PC je nejčastěji prováděna na výzkumných pracovištích či v případě nejasné diagnózy, nicméně sjednocení postupů, kombinací použitých znaků a také nastavení přístrojů v rámci různých pracovních skupin je nezbytné a v současnosti se jím zabývá EMN (30). Standardizace vyšetření plazmocytů u monoklonál-

## flowcytometrie - přehled



**Obrázek č. 1: Fenotyp fyziologických paměťových PC.** Na dotplorech jsou červeně zvýrazněny CD38<sup>+</sup> PC. (A) Fyziologické PC jsou silně pozitivní na znak CD38. (B) Expres znaků CD19 a CD27 v rámci leukocytů. (C) Expres znaků CD19 a CD27 na CD38<sup>+</sup> PC.

ních gamapatií a nalezení významu stavajících i nově identifikovaných znaků exprimovaných na PC patří tak mezi hlavní cíle EMN.

### Specifické problémy u MM

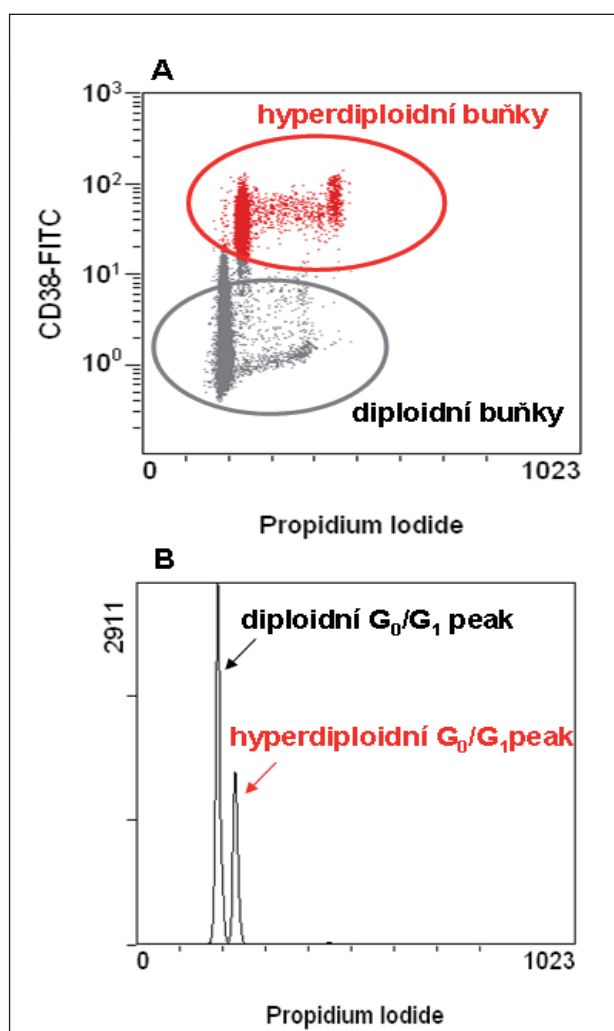
1. Morfologicky zjištěné množství PC v kostní dřeni neodpovídá zcela flowcytometrickému nálezu, avšak je známo, že první aspirát kostní dřene - určený pro morfologické hodnocení - je vždy bohatší na plazmocyty, jelikož se zvyšujícím se objemem odběru KD dochází k jejímu postupnému ředění periferní krví a ztrátě obsahu PC. Důvodem mohou být také chyby v počítání buněk a exprese některých adhezivních molekul (30). Snaha získat pokud možno první mililitry KD může kolidovat s požadavky na jiná vyšetření (genetika, angiogeneze, genomika aj.). Výhodou flowcytometrie je relativní nezávislost exprese markerů na infiltraci KD, což je zaručeno vymezením a hodnocením pouze populace PC. DNA analýza je však při nízké infiltraci KD nevypovídající.

2. Jelikož infiltrace KD může být v rámci pacientů s MGUS i MM nízká, je pro dosažení dostatečné citlivosti flowcytometrie potřebné analyzovat vyšší počty leukocytů tak, aby bylo pro danou zkumavku získáno alespoň 100 plazmocytů (30). Při infiltraci 0,05% PC to může znamenat sběr min. 0,2 miliónu buněk a získání objemného datového souboru. Proto lze využít i tzv. 2-krokového systému získávání buněk, kdy je nejprve analyzováno několik tisíc buněk plné KD a poté je pomocí elektronického gate vymezena požadovaná populace PC (např. CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> bb), na které je dále prováděna samotná analýza (34, 28).

3. Ve vybraných případech může být odběr KD neinformativní, a to jednak z důvodu problematického odběru (např. suchá punkce, vznik koagula v odebraném vzorku), s následným zkresleným % infiltrace PC. Zřejmě též může nastat situace, kdy při odběru nemusí být zaměřeno ložisko PC, a je tak získána informace o nízké infiltraci v KD s normálním fenotypem PC, která neodpovídá stavu pacienta (14).

### Ukázka reprezentativního výsledku

Získaná data, matice zaznamenaných parametrů (velikost, granularita, fluorescence) ve formě tzv. listmode, můžeme



**Obrázek č. 2: DNA analýza u pacienta s MM.** Znárodněny jsou dvě populace buněk s rozdílným obsahem DNA. (A) Na dotplotu jsou červeně zvýrazněny CD38<sup>+</sup> PC, které tvoří oddělenou populaci s vyšším obsahem DNA (hyperdiploidní buňky) než má populace zbylých leukocytů (diploidní buňky). (B) Normálním diploidním buňkám na histogramu odpovídá peak G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu umístěný vlevo, zatímco populace hyperdiploidních PC s vyšším obsahem DNA, tvoří peak G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> umístěný vpravo.



zobrazit ve formě 1-parametrového histogramu či případně 2-parametrového dotplotu. Nejprve však musíme vymezit populaci buněk, kterou máme v úmyslu analyzovat, a to tvorbou tzv. gate, kterým ohraničíme požadovanou populaci buněk (např. plazmocytární gate nám ze všech analyzovaných buněk vymezí pouze populaci plazmocytů). Výstupem z analýz je pak informace o relativním (%) či absolutním (počet bb/ul) počtu buněk, které vykazují pozitivitu/negativitu pro zvolený znak (viz Obrázek č.1 a č.2).

### Význam metody u MM stávající

Flowcytometrické vyšetření PC, zejména stanovení normálního/aberrantního fenotypu a průkaz restrikce lehkého řetězce  $\kappa$  či  $\lambda$ , je doporučováno pro odlišení reaktivní a neoplastické plazmocytózy (30). Také v diagnostice monoklonálních gamapatií mohou existovat hraniční případy, např. doutnající mnohočetný myelom (smouldering multiple myeloma, SMM) či monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), kdy průtoková cytometrie může identifikaci zastoupení a fenotypu PC napomoci diferenciální diagnostice či případně stanovit pravděpodobnost progresse onemocnění (28). Flowcytometrie se také uplatňuje v hodnocení minimální reziduální nemoci s obdobnou senzitivitou jako PCR a navíc s menší finanční i časovou náročností. Značnou výhodou při studiu minimální reziduální nemoci je také univerzálnost použitých markerů pro stanovení zastoupení normálních CD19<sup>+</sup> a abnormálních CD56<sup>+</sup> PC, přičemž, až na výjimky, není nutno znát původní fenotyp PC pacienta před léčbou (34, 29, 30). S rozvojem molekulárně-genetických technik se částečně ztratil význam DNA analýzy PC, přesto však je % proliferujících PC stále považováno za významný prognostický faktor a byl prokázán vztah mezi ploidií PC a specifickými chromozomálními změnami (18).

### Význam metody u MM očekávaný

Flowcytometrické odlišení klonálních plazmocytů na základě stanovení povrchových znaků je významným přínosem pro rutinní laboratoře. Odpadlo by tak náročné stanovení cytoplazmatických lehkých řetězců, které navíc není vhodné pro vzorky s nízkou infiltrací. Mnohá pracoviště již publikovala získané výsledky týkající se studia vybraných parametrů souvisejících s progresí MGUS či SMM do pokročilejších stadií onemocnění (28). Také byl ověřován význam flowcytometrické analýzy při studiu minimální reziduální nemoci u léčených pacientů s MM (29, 34, 26). Potvrzení vztahu dalších povrchových znaků k normálním/maligním plazmocytům může dále ujasnit procesy zodpovídající za maligní transformaci plazmocytů.

### Závěr

Flowcytometrie je účinný nástroj k analýze heterogenní populace plazmocytů a je zřejmé, že podrobnější analýza fenotypu je uplatnitelná na úrovni klinické i výzkumné. Je známa část markerů majících vztah k patofyziologii plazmocytů a jejich chování, nicméně stále jsou hledány další parametry s prediktivní i prognostickou hodnotou.

Lze předpokládat, že přidavným stanovením klonality plazmocytů prostřednictvím lehkých řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$  bude jednoznačně ověřen přínos exprese znaků CD19 a CD56 pro určení normality/abnormality plazmocytů. Taktéž analýza vybraných znaků (CD20, CD27, CD28, CD81, CD117), s možnou aberrantní expresí na plazmocytech, by měla vést k získání informací o jejich charakteru a vztahu k typu onemocnění.

### Poděkování

Podpořeno projekty: MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

- Adam Z, Klabusay M, Vorlíček J, Hájek R. Detection of myeloma cells in the peripheral blood using flow cytometry. *Vnitřní lékařství*. 1997 Sep;43(9):592-598
- Anderson KC, Park EK, Bates MP et al. Antigens on human plasma cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983 Mar;130(3):1132-1133
- Barlogie B, Alexanian R, Gehan EA et al. Marrow cytometry and prognosis in myeloma. *J Clin Invest*. 1983 Sep;72(3):853-861
- Bataille R, Jégou G, Robillard N et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of „many and multiple myelomas“ and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234-1240
- Chng WJ, Winkler JM, Greipp PR et al. Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression. *Leuk Res*. 2006 Mar;30(3):266-271
- Dhodapkar MV, Abe E, Theus A et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2679-2688
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-3420
- Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E et al. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(1):36-43
- Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2658-2663
- Jackson N, Ling NR, Ball J et al. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Clin Exp Immunol*. 1988 Jun;72(3):351-356
- Jego G, Robillard N, Puthier D et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*. 1999 Jul 15;94(2):701-712
- King MA, Nelson DS. Tumor cell heterogeneity in multiple myeloma: antigenic, morphologic, and functional studies of cells from blood and bone marrow. *Blood*. 1989 May 15;73(7):1925-1935
- Klabusay M, Doubek M, Adam Z et al. Detection of myeloma cells in peripheral blood using multi-parameter flow cytometry: monitoring residual disease. *Cas Lek Cesk*. 2000 Jul 19;139(14):432-436
- Kovarova L, Buchler T, Buresova I et al. Phenotype of Plasma Cells in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma Subjects. *Hematologica* 2008, připraveno k tisku
- Latreille J, Barlogie B, Dosik G et al. Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. *Blood*. 1980 Mar;55(3):403-408
- Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S et al. Immunophenotypic aber-



- rations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis.* 2000 Dec;26(6):634-645
17. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med.* 2007 Sep;27(3):469-485
  18. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3661-3667
  19. Mateo G, Gutierrez NC, Lopez-Berges C et al. Current role of immunophenotyping in multiple myeloma. *Multiple Myeloma. Torino, 22-24 April: Meeting Proceedings;* 2004:31-33
  20. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A et al. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2154-2161
  21. Moreau P, Robillard N, Jégo G et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(2):168-170
  22. Morgan TK, Zhao S, Chang KL et al. Low CD27 expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: an immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006 Oct;126(4):545-551
  23. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2276-2279
  24. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1655-1665
  25. Ocqueteau M, Orfao A, García-Sanz R et al. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol.* 1996 Dec;95(3):489-493
  26. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br J Haematol.* 2005 Mar;128(5):732-3; author reply 733-734
  27. Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Mar-Apr;32(2):293-301
  28. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2586-2592
  29. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood.* 2002 Nov 1;100(9):3095-3100
  30. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008 Mar;93(3):431-438
  31. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):46-55
  32. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood.* 2005 Jun 15;105(12):4845-4848
  33. Ruiz-Argüelles GJ, Katzmán JA, Greipp PR et al. Multiple myeloma: circulating lymphocytes that express plasma cell antigens. *Blood.* 1984 Aug;64(2):352-356
  34. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood.* 2002 Mar 1;99(5):1853-1856
  35. Santonocito AM, Consoli U, Bagnato S et al. Flow cytometric detection of aneuploid CD38(++) plasmacells and CD19(+) B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients. *Leuk Res.* 2004 May;28(5):469-477
  36. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood.* 1990 Nov 1;76(9):1739-1747
  37. Toušková M., Maisnar V., Kratěnová J. et al. DNA analýza vyhodnocená průtokovou cytometrií v diagnostice monoklonálních gamapatií. *Alergie.* 2001;3(1)
  38. Van Camp B, Durie BG, Spier C et al. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated Antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood.* 1990 Jul 15;76(2):377-382
  39. Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996 Aug;94(2):318-323
  40. Zola H, Swart B, Banham A et al. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods.* 2007 Jan 30;319(1-2):1-5

### ROZLIŠENÍ NÁDOROVÝCH KLONÁLNÍCH A FYZIOLOGICKÝCH POLYKLONÁLNÍCH PLAZMATICKÝCH BUNĚK POMOCÍ FLOWCYTOMETRIE

### FLOW CYTOMETRIC DISCRIMINATION BETWEEN NEOPLASTIC CLONAL AND PHYSIOLOGICAL POLYCLONAL PLASMA CELLS

KOVÁŘOVÁ L.<sup>1,2,5</sup>, BUREŠOVÁ I.<sup>1,2</sup>, SUSKÁ R.<sup>1,2</sup>, PERUTKA T.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>4</sup>, MICHÁLEK J.<sup>2,5,6</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3,5</sup>

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

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>4</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (UCBI), LF MU BRNO

<sup>6</sup> I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

#### Souhrn

Východiska: Vícebarevná průtoková cytometrie je užitečným nástrojem k analýze plazmatických buněk, jelikož s dostatečnou senzitivitou dovoluje stanovení jejich počtu a zejména rozlišení na fyziologické a patologické. Typ studie a soubor: V této studii jsme sledovali zastoupení plazmocytů na souboru 25 pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu a 78 osob s mnohočetným myelomem, s cílem nalézt rozdíly v počtu a fenotypu jejich plazmocytů a případně také definovat potenciální parametr, který by obě nemoci od sebe odlišil. Metody a výsledky: Flowcytometrická analýza plazmocytů byla prováděna ve vzorcích kostních dřeni s využitím povrchových markerů CD38, CD138, CD45, CD56 a CD19. Při srovnání s mnohočetným myelomem je pro monoklonální gamapatii nejasného významu příznačné vyšší zastoupení reziduálních CD19<sup>+</sup> plazmocytů ( $p < 0,001$ ) a nižší zastoupení patologických CD56<sup>+</sup> plazmocytů ( $p = 0,004$ ) v kostní dřeni. Závěry: Relativní počet CD19<sup>+</sup> plazmocytů se jeví jako jednoznačný parametr pro odlišení monoklonální gamapatie nejasného významu od všech klinických stádií mnohočetného myelomu. Analýzou plazmocytů a jejich fenotypového profilu můžeme napomoci při diferenciální diagnostice onemocnění. Do budoucna předpokládáme také možný význam analýzy plazmocytů v kostní dřeni pro prognózu hodnocených osob a pro studium minimální reziduální choroby.

**Klíčová slova:** plazmatické buňky, mnohočetný myelom, monoklonální gamapatie nejasného významu, flowcytometrie.

#### Summary

Backgrounds: Multicolor flow cytometry is a sensitive tool for the analysis of plasma cell population. It can differentiate between normal and malignant plasma cells and enables their quantification. Design and Subjects: We have used flow cytometry for quantification and immunophenotyping of plasma cells from 25 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 78 those with multiple myeloma aiming to identify and characterize markers that distinguish between the two conditions. Methods and Results: The expression of surface antigens CD38, CD138, CD45, CD56 and CD19 was analysed on bone marrow plasma cells. As compared to MM patients, MGUS patients had higher proportion of residual CD19<sup>+</sup> plasma cells ( $p < 0,001$ ) and lower counts of pathologic CD56<sup>+</sup> plasma cells ( $p = 0,004$ ) in the bone marrow. Conclusions: The number of CD19<sup>+</sup> plasma cells appeared to be an unequivocal marker that distinguishes monoclonal gammopathy of unknown significance from all stages of multiple myeloma. Immunophenotyping of plasma cell can thus contribute to the differential diagnosis of both diseases. It has also been suggested that flow cytometric analysis should be useful for prognostic evaluation and for the study of minimal residual disease.

**Key words:** plasma cells, multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, flow cytometry.

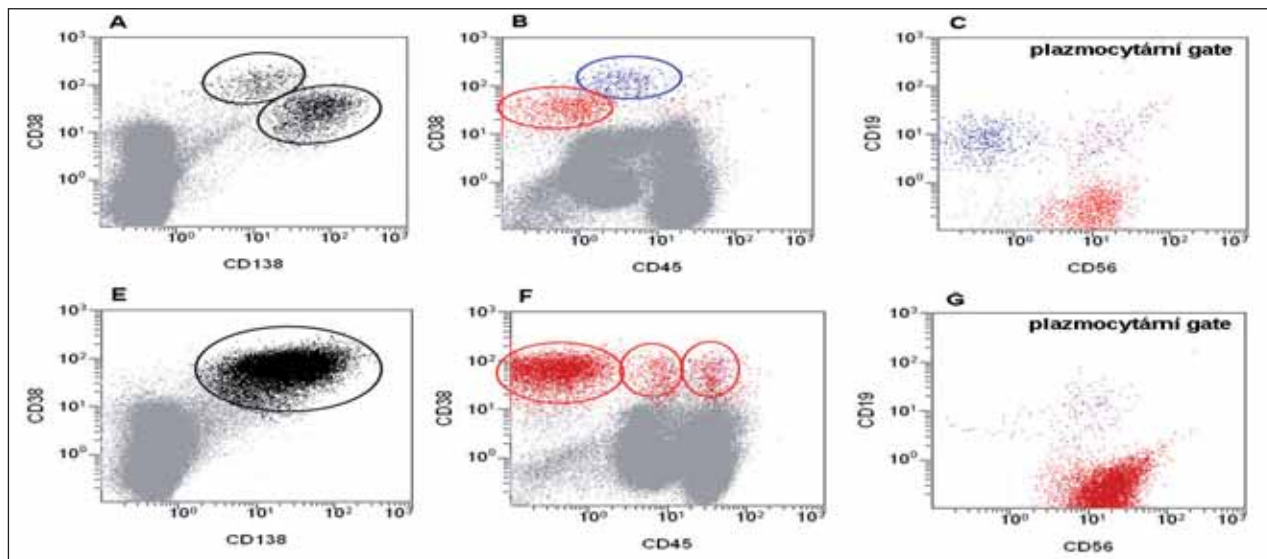
#### Úvod

V průběhu studia plazmocytů (PC) bylo zjištěno, že fyziologické PC vykazují častěji pozitivitu na znak CD19 a u naopak maligních PC je nalézán znak CD56 (11, 10, 7). V literatuře je uváděno, že kostní dřev pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) obsahuje většinu normálních polyklonálních PC (CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), ale také část klonálních PC s aberantním fenotypem (CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>), zatímco u mnohočetného myelomu (MM) je nalézána naprostá převaha CD56<sup>+</sup> aberantních PC (5, 14, 13). U pacientů s MM se však mohou též vyskytovat PC, které

neexprimují znak CD56 (20-30%), jejich přítomnost se pojí s horší prognózou při léčbě konvenční chemoterapií, avšak při podstoupení autologní transplantace nebyl nalezen rozdíl v celkovém přežití mezi CD56 pozitivními či CD56 negativními myelomy (1).

Jelikož populace plazmatických buněk v periferní krvi (PK) i kostní dřeni (KD) je poměrně heterogenní a může obsahovat i méně zralé formy B lymfocytů, předpokládá se, že sledování její proměnlivosti může přinést další informace o charakteru PC jednotlivých osob (13). Analýzou znaků CD38 a CD138, spolu s dalšími znaky, tak můžeme identifikovat množství a typ PC v PK i KD a na-

## příklady využití



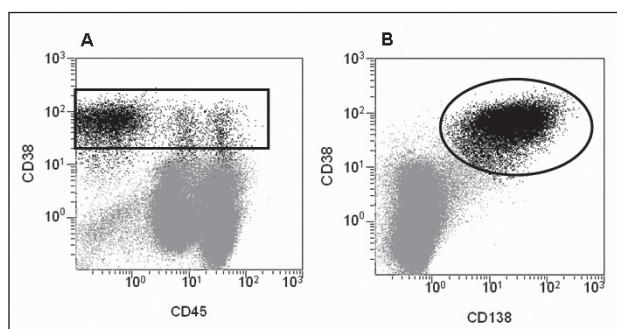
**Obrázek č. 2: Srovnání fenotypu vzorků KD.** (A, B, C) Osoba s MGUS s patrnými 2 populacemi plasmocytů, které se liší intenzitou exprese znaků CD38, CD45 a CD138. Modře jsou vyznačeny CD19<sup>+</sup> PC, které můžeme považovat za potenciálně fyziologické polyklonální PC, naopak červeně vyznačené CD56<sup>+</sup> PC jsou patologické klonální PC. (D, E, F) Osoba s MM, u které jsou patrné subpopulace PC lišící se expresí znaku CD45, celkově naprosto převažují aberantní CD38<sup>+++</sup>CD45<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> PC.

pomocí určení diagnózy hodnocené osoby, navíc ze získaných hodnot usuzovat na její prognózu či vývoj onemocnění a případně též sledovat minimální reziduální nemoc pro léčbu (9).

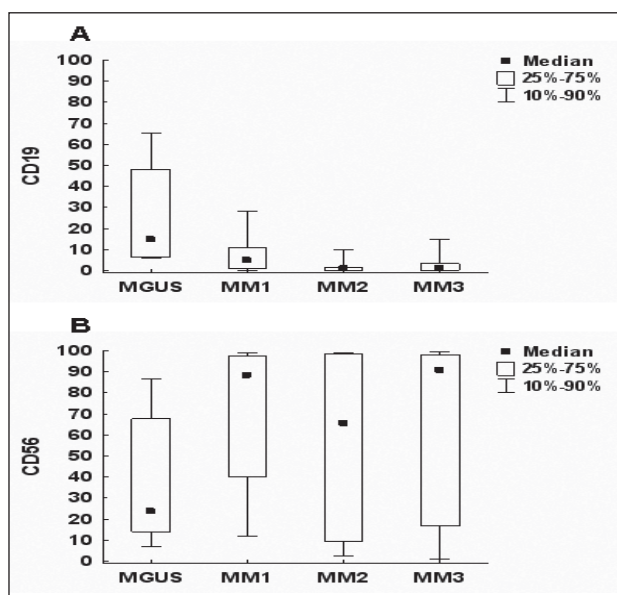
### Soubor nemocných a metody

**Soubor vzorků:** Celkem bylo v období leden 2006 - říjen 2007, v rámci pravidelných kontrol, zhodnoceno 25 pacientů s MGUS a 78 nově diagnostikovaných neléčebných pacientů s MM. Všechny hodnocené osoby pocházely z ambulance či z oddělení Interní hematologické kliniky FN Brno a jejich onemocnění bylo klasifikováno dle kritérií Durie-Salmon. Skupina pacientů s MM dále zahrnovala 19 pacientů v I. klinickém stádiu onemocnění (MM I), 14 pacientů v II. klinickém stádiu onemocnění (MM II) a 45 pacientů v III. klinickém stádiu onemocnění (MM III). Kostní dřev byla, s informovaným souhlasem pacientů, odebrána do EDTA a tentýž den zpracována pro analýzu na průtokovém cytometru.

**Metodika:** KD byla inkubována s následujícími monoklonálními protilátkami (MoAb): CD38-FITC, CD138-PE, CD45-ECD, CD56-PC5, CD19-PC7 a lyzována pomocí Verzalysy (vše Immunotech, Marseille, France) či chloridu amonného. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Počet analyzovaných buněk KD se pohyboval mezi 250-500 tisíci, přičemž minimální počet analyzovaných plasmocytů překračoval 100 událostí. Hodnoceno bylo procentuální zastoupení CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> a CD38<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> PC a navíc byla na populaci CD38<sup>+++</sup>CD45<sup>-</sup> nebo CD38<sup>+++</sup>CD138<sup>+</sup> dále sledována exprese znaků CD19 a CD56. Výsledek zastoupení PC v KD je, v souladu s doporučením European Myeloma Network (EMN), udáván jako poměr normálních či abnormálních plasmatických buněk ku všem plasmatickým buňkám, a tedy jako procentuální zastoupení CD19<sup>+</sup> (N-PC) a CD56<sup>+</sup> (A-PC) buněk v rámci všech PC. Pro hodnocení jsme také použili a sle-



**Obrázek č. 1: Stanovení plazmatických buněk.** (A) Identifikace PC jako CD38<sup>+++</sup>CD45<sup>+/-</sup> buněk. (B) Identifikace PC jako CD38<sup>+++</sup>CD138<sup>+/-</sup> buněk.



**Obrázek č. 3: Grafické znázornění rozdílu v expresi znaků CD19 a CD56 na PC u jednotlivých diagnóz a jejich klinických stádií.** Znázorněny jsou mediány exprese s vybranými decily a kvartily: (A) pro znak CD19, (B) pro znak CD56.



## příklady využití

dovali bezrozměrný parametr n/a, který představuje poměr normálních a abnormálních PC (N-PC/A-PC).

Statistika: Při analýze rozdílů mezi jednotlivými diagnózami byl využit neparametrický Mann-Whitney test pro testování hypotézy, že mezi 2 skupinami není rozdíl v hodnotách sledovaných parametrů. Hypotézu je možné zamítnout na hladině významnosti 0,05 pro p-hodnoty nižší než 0,05. Kruskal-Wallis ANOVA byla použita pouze pro otestování hypotézy nerozdílnosti parametrů mezi 3 skupinami.

### Výsledky:

#### Množství plazmocytů v kostní dřeni

V případě MGUS bylo flowcytometricky stanovené zastoupení populace PC (medián 0,4%; rozsah 0,0-4,2) významně nižší ( $p < 0,001$ ) než u osob s MM (3%; 0,0-47,7), a to včetně jednotlivých klinických stádií, což odpovídá diagnostickým kritériím těchto onemocnění (viz Tabulka č.1, č.2 a č.3). Srovnáním jednotlivých stádií MM mezi sebou byl nalezen významný rozdíl v počtu CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PC pouze mezi MM I a MM III ( $p = 0,014$ ). Sledováním populace CD38<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> je také možno odhalit přítomné zralé plazmocyty, přičemž tyto jsou nalézány ve významně vyšší četnosti ( $p < 0,001$ ) u všech osob s MM (2,2%; 0,0-47,1) nežli u osob s MGUS (0,2%; 0,0-3,8).

#### Analýza plazmocytů dle exprese CD19 a CD56

Pro odhalení „normálních a klonálních“ PC byly zvoleny znaky CD19 a CD56. Studium jejich exprese na populaci CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PC bylo zjištěno, že reziduální CD19<sup>+</sup> PC v KD jsou statisticky významně častěji ( $p < 0,001$ ) nalézány u osob s MGUS (15%; 1,9-75,6) nežli u celé skupiny osob s MM (1,2%; 0,0-79,4), což platí i pro srovnání MGUS s jednotlivými klinickými stádií MM. Přestože u 9 osob s MGUS měly CD19<sup>+</sup> PC jednoznačnou převahu nad populací CD56<sup>+</sup> PC, celkově u námi hodnocených osob s MGUS převažovaly CD56<sup>+</sup> PC (23,6% ; 6,3-91,8). U celé skupiny osob s MM byly většinou nalézány CD56<sup>+</sup> PC (88,3%; 0,1-99,8), a to ve významně vyšším množství ( $p = 0,04$ ) než u osob s MGUS, což je v souladu s literaturou (Greipp et al., 2005). Při statistické analýze bylo dále zjištěno, že množství CD56<sup>+</sup> PC není významně rozdílné při srovnání jednotlivých klinických stádií MM a také při porovnání MGUS s MM II. Při analýze n/a poměru je statisticky významný rozdíl mezi MGUS (0,5%; 0,0-9,4) a MM II (0,0%; 0,0-11,0) nalezen ( $p = 0,003$ ). Zastoupení reziduálních CD19<sup>+</sup> PC je u MM nízké a dle předpokladu je nejvyšší u MM I (4,7%; 0,2-54,8) ( $p = 0,048$ ), avšak mezi klinickými stádií MM II a MM III se významně neliší. V případě nálezu CD19<sup>+</sup> PC u 2 pacientů s MM, byly tyto PC také CD45<sup>+</sup>, a tedy se zřejmě jednalo o nezralé aberantní PC, které dosud neztratily povrchový marker B lymfocytů.

Parametr (%)	MGUS (n=25)	MM (n=78)	MM I (n=19)	MM II (n=14)	MM III (n=45)
138 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> KD	0,4 (0,0-4,2)	3,0 (0,0-47,7)	1,0 (0,0-14,6)	3,7 (0,2-16,7)	4,7 (0,0-47,7)
38 <sup>+</sup> 45 <sup>-</sup> KD	0,2 (0,0-3,8)	2,2 (0,0-47,1)	0,5 (0,0-14,1)	2,9 (0,2-16,7)	2,6 (0,0-47,1)
CD19 <sup>+</sup> PC	15,0 (1,9-75,6)	1,2 (0,0-79,4)	4,7 (0,2-54,8)	0,8 (0,0-79,4)	0,9 (0,0-73,6)
CD56 <sup>+</sup> PC	23,6 (6,3-91,8)	88,6 (0,1-99,8)	88,3 (0,5-99,4)	65,5 (0,5-99,7)	90,6 (0,1-99,8)
n/a	0,5 (0,0-9,4)	0,0 (0,0-11,0)	0,1 (0,0-3,0)	0,0 (0,0-11,0)	0,0 (0,0-5,9)

Tabulka č. 1: Flowcytometrické hodnocení počtu plazmocytů v kostní dřeni, uvedeny jsou mediány a rozsahy získaných hodnot. Pacienti s MM jsou zhodnoceni jednak jako celek, ale také dle klinických stádií MM I-III.

Parametr	MGUS vs. MM	MGUS vs. MM I	MGUS vs. MM II	MGUS vs. MM III
138 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> KD	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
38 <sup>+</sup> 45 <sup>-</sup> KD	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CD19 <sup>+</sup> PC	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CD56 <sup>+</sup> PC	$p < 0,01$	$p = 0,001$	n.s.	$p < 0,05$
n/a	$p < 0,001$	$p = 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$

Tabulka č. 2: Statistická analýza vybraných markerů při srovnání MGUS s klinickými stádií MM (tučně jsou znázorněny statisticky významné rozdíly, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl).

Parametr	MM I vs. MM II vs. MM III	MM I vs. MM II	MM I vs. MM III	MM II vs. MM III
138 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> KD	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
38 <sup>+</sup> 45 <sup>-</sup> KD	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
CD19	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.
CD56	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
n/a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabulka č. 3: Statistická analýza vybraných markerů při srovnání klinických stádií MM (tučně jsou znázorněny statisticky významné rozdíly, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl).

U osob s MGUS vždy alespoň část PC vykazovala pozitivitu na znak CD19 nebo CD56, avšak u 12 osob s MM byly nalezeny též CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> PC, přičemž počet osob s CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> PC rostl se stoupajícím klinickým stádiem onemocnění (1x MM I, 2x MM II, 9x MM III). U těchto osob byly také v 11 případech nalezeny cirkulující PC.

### Diskuze

V této studii jsme se pokusili zhodnotit množství a fenotyp plazmocytů u osob s MGUS a MM. Zefektivnili jsme flowcytometrickou analýzu pro získání maximálního množství informací z jediné zkumavky a ověřili jsme senzitivitu vybraného přístupu při analýze PC u osob s nízkou infiltrací KD. Povedlo se nám také identifikovat možné parametry využitelné v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

Dle našeho očekávání bylo zastoupení PC nižší u pacientů s MGUS ve srovnání se zastoupením PC pacientů s MM. U vyšších klinických stádií MM (II, III) bylo zjištěno nejvyšší zastoupení počtu CD38<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> PC, což svědčí o tom, že značná část jejich PC je již v terminálním stupni zralosti. Intenzita exprese znaku CD38 je na CD45<sup>-</sup> PC různá (CD38<sup>+</sup>-CD38<sup>++</sup>). Nezralé plazmocyty CD45<sup>+</sup>-CD45<sup>++</sup> jsou zároveň CD38<sup>++</sup>, avšak bez analýzy dalších markerů nelze zjistit, zda-li se jedná o normální či patologické plazmocyty.

V kostní dřeni osob s MGUS jsme našli 2 populace PC lišící se jednak intenzitou exprese znaků CD38, CD45 a CD138, ale zejména rozdílnou expresí znaků CD19 a CD56. Normální PC si zachovávají expresi CD19, což je B lymfocytární marker exprimovaný již ve stádiu raných pre-B lymfocytů a mizející ve stádiu terminálně diferencovaných PC (15). Přestože fyziologický význam chybění CD19 na myelomových buňkách nebyl dosud objasněn, existuje předpoklad, že jeho ztráta se může podílet na vzniku proliferativní výhody klonu maligních PC (3). Jak bylo prokázáno, je právě poměr imunofenotypicky normálních CD19<sup>+</sup> PC ku všem PC jedinečným parametrem umožňujícím rozlišení MGUS od MM, což na základě získaných výsledků můžeme potvrdit (5; 14). Tento parametr má uplatnění též při hodnocení populace PC po prodělané léčbě (13). Další kolektiv autorů se



## příklady využití

zabýval analýzou aberantních CD56<sup>+</sup> PC, kdy stanovení cut-off hodnoty 95% dovoluje u osob s MGUS a doutnající myelomem jejich rozdělení na 2 skupiny s různým rizikem progresu do MM (6). V našem případě parametr CD56<sup>+</sup> PC dovoluje jednoznačné rozlišení mezi MGUS a I. klinickým stádiem MM, zatímco II. klinické stádium MM od MGUS již pomocí tohoto parametru nelze odlišit. Síla parametru n/a se projevila pouze při porovnávání MGUS s jednotlivými stádii MM, v rámci mnohočetného myelomu samotného neposkytuje možnost rozlišení klinických stádií, obdobně jako parametr CD56<sup>+</sup> PC. Děje se tak zřejmě z důvodu možné absence CD56 na části PC. Význam chybění znaku CD56 na PC může být objasněn až po delším sledování souboru pacientů, přestože v literatuře můžeme nalézt údaje o agresivnější formě onemocnění spojeného s absencí znaku CD56 (12). Prozatím lze jen předběžně usuzovat, že vysoká exprese CD56 u osob s MGUS může znamenat riziko přechodu do MM, případnou cut off hodnotu pro stanovení možnosti přechodu do vyšších klinických stádií MM budeme schopni získat až po delším sledování souboru.

Získaná data a metodické postupy při analýze plazmocytů hodláme uplatnit pro stanovení prognózy pacientů a také při studiu minimální reziduální choroby u pacientů po

konvenční léčbě či po prodělané autologní transplantaci kmenových buněk. Bylo totiž prokázáno, že přítomnost aberantních PC je spojena s horším přežíváním pacientů, a po jejich nalezení tedy může být včas zahájena buď primární či následná léčba (13, 8, 4, 6).

### Závěr

V naší studii jsme potvrdili, že patologické plazmocyty jsou ve zvýšené míře nalézány již u pacientů s MGUS, avšak v případě MM tvoří naprostou většinu plazmocytů infiltrujících kostní dřeň. Prostřednictvím exprese CD19 a CD56 na PC je možno odlišit MGUS od MM. Je zřejmé, že studium všech tří parametrů: CD19<sup>+</sup> PC, CD56<sup>+</sup> PC a n/a je nezbytné v diferenciální diagnostice myelomatóz-ních onemocnění.

### Poděkování

Poděkování patří jednak personálu Laboratoře flowcytometrie při OKH-LEHABI, dále manažerce myelomových vzorků a také sestřám a lékařům České myelomové skupiny při IHOK.

Podpořeno projekty: MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Chang H, Samiee S, Yi QL. Prognostic relevance of CD56 expression in multiple myeloma: a study including 107 cases treated with high-dose melphalan-based chemotherapy and autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jan;47(1):43-47
2. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-3420
3. Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS et al. CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2002 Mar;43(3):613-616
4. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2276-2279
5. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998 Jun;152(6):1655-1665
6. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2586-2592
7. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3661-3667
8. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3095-3100
9. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431-438
10. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):46-55
11. Van Camp B, Durie BG, Spier C et al. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated Antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990 Jul 15;76(2):377-382
12. Sahara N, Takeshita A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jan;45(1):61-65
13. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1853-1856
14. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001 Aug;86(8):837-843
15. Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ et al. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun;14(6):3884-3894

## STANOVENÍ DIAGNÓZY PLAZMOCELULÁRNÍ LEUKÉMIE V PRAXI

### DIAGNOSTICS OF PLASMA CELL LEUKEMIA

KOVÁŘOVÁ L.<sup>1,3</sup>, ZAHRAĐOVÁ L.<sup>2</sup>, KISSOVÁ J.<sup>4</sup>, POUR L.<sup>2,3</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>2</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>3</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>4</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

#### Souhrn

Plazmocelulární leukémie je vzácnou chorobou definovanou počtem plazmatických buněk v periferní krvi. Na Interní hematologické klinice FN Brno byli během posledních dvou let diagnostikováni tři pacienti s plazmocelulární leukémií. Na případech 2 pacientů ukazujeme zásadní roli průtokové cytometrie v diagnostice tohoto onemocnění.

**Klíčová slova:** plazmatické buňky, leukémie, průtoková cytometrie.

#### Summary

Plasma cell leukemia is a rare disease defined by the presence of circulating malignant plasma cells in the peripheral blood. Three patients were diagnosed with plasma cell leukemia in our center from 2005 to 2007. Here we report two cases of plasma cell leukemia to demonstrate the use of flow cytometry as an important tool in the diagnostic assessment of the disease.

**Keywords:** plasma cells, leukemia, flow cytometry.

#### Úvod

Plazmocelulární leukémie (plasma cell leukemia, PCL) je vzácné krevní nádorové onemocnění vycházející z plazmatických buněk (11). Incidence PCL je 2-4% ze všech mnohočetných myelomů (MM). Jsou rozlišovány 2 formy tohoto onemocnění, jednak primární „de novo“ PCL s akutní a rychle progredující leukemickou fází (60% ze všech PCL) a dále sekundární PCL, která se vyvíjí leukemickou transformací z mnohočetného myelomu (MM) a zpravidla jde o fatální konečnou fázi u pacientů s refrakterním MM (16). Diagnostickým kritériem PCL je absolutní (více než  $2 \times 10^9/l$ ) nebo relativní (více než 20%) počet maligních plazmocytů v periferní krvi (11).

Literární údaje o charakteru leukemizovaných plazmocytů nejsou četné, spíše se jedná o jednotlivé kazuistiky (2, 12, 4, 7). Zatím není zcela jasné jakým mechanismem je PCL spouštěna, přestože je známo, že nalézané plazmatické buňky vycházejí z kostní dřeně, přičemž jejich morfologie je různá - od zralých forem plazmocytů až po formy blastické (9).

U pacientů s PCL je většinou nalézána vyšší nádorová nálož s přítomnou anémií, trombocytopenií, vysokými hodnotami laktátdehydrogenázy (LDH), sérového vápníku (Ca) a  $\beta 2$ -mikroglobulinu (3). Symptomaticky se PCL projevuje obdobně jako vyšší stádia MM (11). Odpověď na léčbu je obecně u primární PCL lepší než u sekundární PCL, kde většinou pacienti nereagují na léčbu a medián přežití je nižší než 2 měsíce. Předpokládá se, že pPCL i sPCL tvoří rozdílné typy onemocnění, s možným odliš-

ným fenotypovým profilem, vyžadující cílenou léčbu na bázi transplantace a použití nových léčiv (8, 1, 10, 21).

Při diagnostice PCL se s úspěchem využívá flowcytometrie, pomocí které lze velmi rychle stanovit množství i typ plazmocytů. Z hlediska fenotypizace jsou jedinečnými markery plazmatických buněk, podobně jako u MM, znaky CD38 a CD138. Není známa informace, že by fenotyp plazmablastů či plazmocytů u PCL souvisel s dobou přežití pacientů. Flowcytometrie slouží prozatím pouze k rychlému stanovení jejich počtu v periferní krvi.

#### Kazuistika č. 1

Žena, 66 let, s mnohočetným myelomem IgG lambda, dg. stanovena v srpnu 2004, vstupně klinické stádium podle Durieho-Salmona III.A. Pacientka byla léčena chemoterapií VID (vinkristin, idarubicin, dexametazon) a vysokodávkovanou chemoterapií s podporou autologního štěpu periferních kmenových buněk s komplikovaným průběhem. Léčebná odpověď po autologní transplantaci byla parciální remise. Byly podány 2 cykly konsolidační léčby CED (cyklofosfamid, etoposid, dexametazon) dle protokolu klinické studie CMG 2002. Před třetím cyklem CED, 11 měsíců po autologní transplantaci, byl zjištěn agresivní relaps onemocnění s nárůstem paraproteinu z 3g/l na 47 g/l během jednoho měsíce. Z laboratorních výsledků (02/2006): celková bílkovina 124,9 g/l; kreatinin 66  $\mu\text{mol/l}$ ; LDH 21,93  $\text{ukat/l}$ ; Ca 2,2  $\text{mmol/l}$  a  $\beta 2$ -mikroglobulin 8,3  $\mu\text{g/l}$ ; hemoglobin (Hb) 110g/l; leukocyty (WBC)  $15,1 \times 10^9/l$ ; trombocyty (PLT)  $18,8 \times 10^9/l$ . Mikroskopická

## příklady využití

analýza nátěru periferní krve potvrdila přítomnost 23% plasmacytoidních elementů, některé byly mladšího vzhledu. Dle flowcytometrie v periferní krvi nález 55% plasmocytů fenotypu CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> se střední intenzitou exprese znaku CD38 (CD38<sup>dim+</sup>), což může odpovídat mladším formám plasmocytů. Kostní dřeň dle morfologického vyšetření se sekundární redukcí ostatních krvetvorných řad, s přítomností 90% plazmatických buněk charakteru proplasmocytů, částečně i plazmablastů. Dle flowcytometrického vyšetření kostní dřeň obsahovala 45% plasmocytů CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD20<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> opět s CD38<sup>dim+</sup> expresí. Při analýze proliferativního indexu zjištěno v periferní krvi 3,1% a v kostní dřeni 7,6% proliferujících plasmocytů diploidního charakteru, přičemž experimentálně určená norma proliferace plasmocytů v kostní dřeni je do 3% (20; 13). Nález byl uzavřen jako sekundární PCL.

Vzhledem k hematologickým parametrům, které neumožňovaly podání standardní léčby, a agresivně relapsu byl podán vysokodávkovaný melfalan v redukované dávce (100mg/m<sup>2</sup>) s podporou autologního štěpu, následovala konsolidace režimem CTD (cyklofosamid, thalidomid, dexametazon) s efektem velmi dobré parciální remise (M-Ig 0 g/l, pozitivní imunofixace). Poté byla po podávání udržovací léčba thalidomidem v monoterapii, která musela být přerušena po 2 měsících pro nežádoucí účinky ve smyslu kožní reakce a polyneuropatie.

Po 3 měsících od ukončení udržovací léčby a 15 měsících po 2. autologní transplantaci byl zjištěn 2. relaps onemocnění (7/2007) na základě nárůstu hodnoty paraproteinu na 22 g/l a nález extramedulárního ložiska v oblasti bederní páteře. Byla provedena 3. autologní transplantace, přípravný režim melfalan v redukované dávce 100mg/m<sup>2</sup> a bortezomib (Velcade) s efektem velmi dobré parciální remise (M-Ig 0 g/l, pozitivní imunofixace). Po uchycení štěpu byla zahájena chemoterapie Velcadem v režimu CVD (cyklofosamid, Velcade, dexametazon), která musela být v průběhu 5. cyklu přerušena pro bolestivou polyneuropatii.

Za 8 měsíců po 3. autologní transplantaci pacientka přichází z důvodu zhoršení bolestí zad. Zobrazovacími vyšetřeními bylo zjištěno extramedulární ložisko v obratli S3, tedy 4. extramedulární relaps onemocnění, který byl řešen radioterapií na uvedenou oblast.

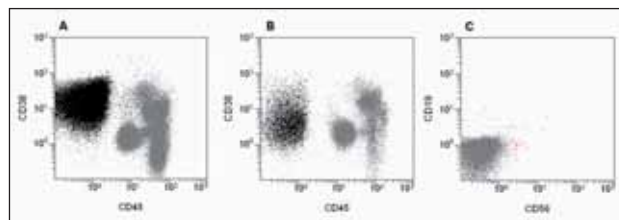
V současné době (03/2008) flowcytometricky stanovená nízká zastoupení (0,1%) cirkulujících CD45<sup>+</sup> plasmocytů v periferní krvi. Morfologicky kostní dřeň bez přesvědčivých známek základního onemocnění, flowcytometricky nález nízkého zastoupení převážně CD19<sup>+</sup> PC (0,1%), a tedy pravděpodobně fyziologických PC.

### Kazuistika č. 2

Jedná se o ženu ve věku 54 let, diagnóza mnohočetného myelomu IgA kappa byla stanovena v listopadu 2006, vstupně klinické stádium podle Durieho-Salmona III.A. Pacientka absolvovala indukční léčbu VAD (vinkristin, doxorubicin, dexametazon) a vysokodávkovanou chemoterapii s podporou autologního štěpu periferních kmenových buněk s komplikovaným průběhem. Léčebná odpověď po autologní transplantaci byla parciální remise. Šest měsíců po transplantaci (10/2007) byl konstatován relaps onemocnění na podkladě nález extramedulárního ložiska

ka v pánvi a morfologického vyšetření kostní dřeni. Ve dřeni zjištěna redukce ostatních krvetvorných řad a výrazné zmnožení plazmatických buněk s nálezem také jejich mladších forem (celkem 35% plasmocytů). Flowcytometricky v kostní dřeni nalezeno 8,1% CD56<sup>+</sup> PC; v periferní krvi 1,3% cirkulujících plasmocytů. Hodnota paraproteinu v séru 0g/l; v moči nárůst na 1,3 g/l; celková bílkovina 63,4 g/l; kreatinin 122 umol/l; LDH 12,86 ukat/l; Ca 2,11 mmol/l a β2-mikroglobulin 5,58 ug/l. V krevním obraze: Hb 89g/l; WBC 4,8x10<sup>9</sup>/l; PLT 221,0x10<sup>9</sup>/l. Byla zahájena kombinovaná léčba s Velcade v režimu CVD (cyklofosamid, Velcade, dexametazon), zároveň radioterapie na extramedulární ložisko. Léčba byla ztížena infekčními komplikacemi s nutností redukce dávek.

V průběhu druhého cyklu léčby (11/2007) dochází k dalšímu klinickému zhoršení stavu, laboratorně zhoršení renálních funkcí: (kreatinin 281 umol/l); LDH 13,81 ukat/l; Ca 2,6 mmol/l; celková bílkovina 80,1 g/l; β2-mikroglobulin 4,43 ug/l. V krevním obraze: Hb 81,4g/l; WBC 8,97x10<sup>9</sup>/l; PLT 56,8x10<sup>9</sup>/l a dle analyzátoru nález blastů. Flowcytometricky došlo v periferní krvi ke zvýšení počtu cirkulujících plasmocytů z 8,1% na 21% s fenotypem CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>kappa<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> s velmi nízkou expresí CD38, pravděpodobně se tedy jednalo mladší formy plasmocytů. Stav byl na základě flowcytometrického nález hodnocen jako sPCL. Byla podána kombinovaná léčba s Velcade, kortikosteriody a níže dávkovaným melfalanem s podporou autologního štěpu, opět s komplikovaným průběhem. Krátce po propuštění z hospitalizace se však pacientka vrací pro opětovné zhoršení klinického stavu s dominujícími bolestmi, laboratorně dominuje zhoršení renálních parametrů (kreatinin 481 umol/l) a po několika dnech pacientka umírá a to měsíc od stanovení diagnózy sekundární PCL.



**Obrázek č.1: Fenotypizace plasmocytů v periferní krvi.** Zvýrazněny jsou CD138<sup>+</sup> plasmocyty, intenzita exprese znaku CD38 je u PCL snižena ve srovnání se zdravými osobami, které vykazují vysokou intenzitu exprese CD38 (CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>high</sup>). (A) Střední exprese CD38 (CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>dim+</sup>). (B) Nízká exprese CD38 (CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>low</sup>). (C) Plazmatické buňky CD138<sup>+</sup> neexprimují znaky CD19 ani CD56.

### Diskuze

Vzácnost výskytu plazmocelulární leukémie znemožňuje její detailnější studium, a není proto zcela zřejmé, které mechanismy stojí za jejím vznikem. Morfologicky jsou nalézány plasmocyty spíše mladšího charakteru, ale nelze takto odlišit plasmocytů odpovídající pPCL od sPCL či MM. Nález CD138<sup>+</sup> plazmablastů jsme u našich pacientů flowcytometricky nepotvrdili, avšak snížená exprese CD38 pravděpodobně odpovídá mladším formám plasmocytů. Přestože určité množství cirkulujících plasmocytů je možno nalézt také u MM, teprve překročení uvedené hranice pro jejich absolutní (více než 2x10<sup>9</sup>/l)



## příklady využití

i relativní počty (více než 20%) je spojováno s termínem PCL. Je pravděpodobné, že klonálním plazmocytům je umožněno vycestovat z kostní dřevě v důsledku ztráty exprese adhezivní molekuly CD56, která ve většině případů exprimována na maligních plazmocyttech (19, 17). Tuto skutečnost potvrzujeme i našimi nálezy. Je proto tím nezodpovězenou otázkou, zda-li ztráta exprese CD56 v kostní dřevě může předpovídat vznik PCL, zejména tedy vznik sPCL u pacientů s MM. Kromě znaku CD56, zodpovídajícího za interakce plazmocytů s mikroprostředím KD, byly v případě PCL studovány také další znaky (CD86, CD126, CD40, solubilní CD95) s nálezem změněné exprese na klonálních plazmocyttech ve srovnání s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) a MM (18). Co se týče analýz fenotypu plazmocytů, lze narazit na rozporuplné informace, kdy bylo zjištěno, že znak CD27 je u pPCL exprimován více než u MM, přičemž signalizace pomocí jeho ligandu CD70 inhibovala apoptózu takovýchto CD27<sup>+</sup> plazmocytů (6). Opačná informace pak byla získána v případě imunohistochemického hodnocení znaku CD27, kdy tento u pPCL téměř nebyl exprimován a v případě sPCL byla jeho exprese nižší než u MM (15). Nicméně je známo, že ztráta genu pro CD27 je nalézána u progresu MM, tudíž lze předpokládat, že znak CD27 by neměl být u sPCL exprimován

(14). Skupina ze Salamancy našla v případě pPCL - ve srovnání s MM - častější expresi znaku CD20 (50% pacientů s pPCL a 17% MM) a nižší expresi znaku CD56 (70% u MM a 45% u pPCL). U pacientů s pPCL byly také, ve srovnání s plazmocytů u MM, nalezeny většinou diploidní plazmocytů s vyšším stupněm proliferace (5). Nedávno byl též prokázán rozdíl v expresi HLA-DR a CD117 v rámci MM, pPCL a sPCL (1).

Z uvedených dat je zřejmé, že prověření fenotypového profilu u pacientů s PCL může přispět k poznání charakteru plazmocytů a případně i ke stanovení míry agresivity onemocnění.

### Závěr

Flowcytometrické vyšetření umožňuje jednoznačné stanovení cirkulujících plazmocytů v periferní krvi a stanovení diagnózy plazmocelulární leukémie. Lze předpokládat, že studium exprese dalších znaků plazmocytů (CD20, CD27, CD28, CD117 aj.) by, obdobně jako u MM, mohlo přinést nové poznatky v charakterizaci plazmocelulárních leukémií.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Cha CH, Park CJ, Huh JR et al. Significantly better prognosis for patients with primary plasma cell leukemia than for patients with secondary plasma cell leukemia. *Acta Haematol.* 2007;118(3):178-182
2. Demirkan F, Özsan GH, Özcan MA et al. *Turk J Haematol* 2001;18(4):275-279
3. Dimopoulos MA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R. Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):754-759
4. Finnegan K. Circulating plasma cell leukemia. *Lab Med.* 2004 Mar;35(3):166-169
5. García-Sanz R, Orfão A, González M et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999 Feb 1;93(3):1032-1037
6. Guikema JE, Vellenga E, Abdulahad WH et al. CD27-triggering on primary plasma cell leukaemia cells has anti-apoptotic effects involving mitogen activated protein kinases. *Br J Haematol.* 2004 Feb;124(3):299-308
7. Jameel A. Plasma cell leukemia: case report of a rare and aggressive variant of multiple myeloma. *J Pak Med Assoc.* 2005 Oct;55(10):452-453
8. Jiménez-Zepeda VH, Domínguez VJ. Plasma cell leukemia: a rare condition. *Ann Hematol.* 2006;85: 263-267
9. Johnson MR, Del Carpio-Jayo D, Lin P et al. Primary plasma cell leukemia: morphologic, immunophenotypic, and cytogenetic features of 4 cases treated with chemotherapy and stem cell transplantation. *Ann Diagn Pathol.* 2006 Oct;10(5):263-268
10. Katodritou E, Verrou E, Gastari V et al. Response of primary plasma cell leukemia to the combination of bortezomib and dexamethasone: Do specific cytogenetic and immunophenotypic characteristics influence treatment outcome? *Leuk Res.* 2007 Dec 14 [Epub ahead of print]
11. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 133:813, 1974
12. Lee CK, Ma ES, Shek TW et al. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol.* 2003 Jul;34(7):710-714
13. Minarik J, Scudla V, Ordeltová M et al. Evaluation of plasma cell propidium-iodide and annexin-V indices: their relation to prognosis in multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):271-274
14. Moreau P, Robillard N, Jégo G et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(2):168-170
15. Morgan TK, Zhao S, Chang KL et al. Low CD27 expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: an immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006 Oct;126(4):545-551
16. Noel P, Kyle RA. Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy. *Am J Med.* 1987 Dec;83(6):1062-1068
17. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1655-1665
18. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia.* 2005 Mar;19(3):449-455
19. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):46-55
20. San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Orfão A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1996 Sep;23(1-2):33-41
21. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia.* 2008 Jan 24; [Epub ahead of print]



## 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.<sup>1,4</sup>, OČADLÍKOVÁ O.<sup>1,6</sup>, MATĚJKOVÁ E.<sup>1,4</sup>, BARTOŠ M.<sup>2</sup>, DENDIS M.<sup>2</sup>, HORVÁTH R.<sup>2</sup>, MICHÁLEK J.<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (UCBI), LF MU, BRNO

<sup>2</sup> GENEX CZ, S.R.O., BNRO

<sup>3</sup> I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

<sup>4</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>5</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, FN BRNO PMDV

<sup>6</sup> 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

tělisky 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- $\gamma$ . Kvantita a čistota pozitivní a negativní frakce T lymfocytů byla hodnocena na průtokovém cytometru. IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  pozitivních myelom-reaktivních T lymfocytů byla izolována poly(A) mRNA (QIAGEN Oligotex<sup>®</sup> Direct mRNA Kit; QIAGEN, Hilden, Německo), která byla technologií 5'-RACE (SMART<sup>™</sup> 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).

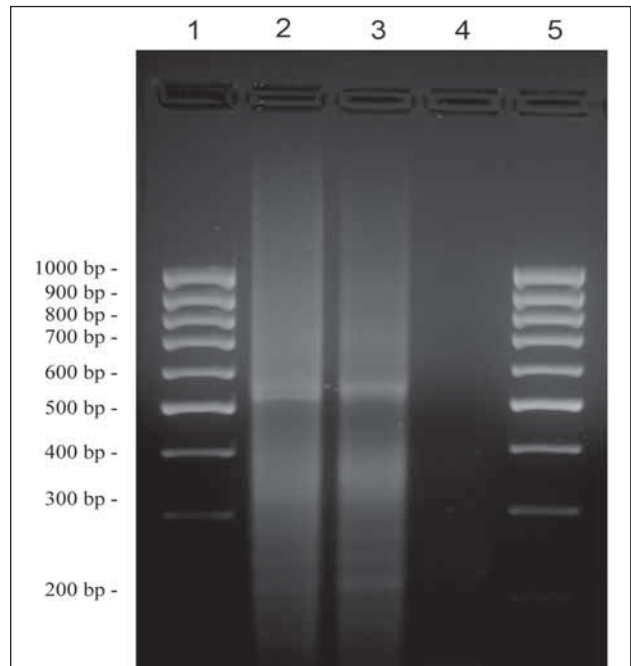
### 1.2.3. Klonování, sekvenování

Ke klonování PCR produktu do bakterií *E.coli* byl použit TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Kolonie byly vysety na selekční LB agarové médium obsahující IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid), Ampicilin a X-gal. Přítomnost inzertu v bakteriálním plazmidu byla ověřena PCR. Z pozitivních kolonií byl izolován plazmid pomocí QIAprep<sup>®</sup> 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 klony 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	EQFFGPGTRLTVL	Oligoklonální
	1-2	3/55	QRDSAMYRCASS	TRDRGVD	EQFFGPGTRLTVL	
	1-3	3/55	QGDSAMYLCASS	SFL	EAFFGQGTRLTVV	
2	2-1	15/54	PRDSAVYFCAS	RER	GYTFGSGTRLTVV	Oligoklonální
	2-2	13/54	LGDSALYLCASSL	ASD	TGELFFGEGSRLTVL	
	2-3	7/54	PEDSALYLCASSQ	DWASGGN	NEQFFGPGTRLTVL	
	2-4	3/54	RGDSAVYLCASS	TGTGG	STDTQYFGPGTRLTVL	

**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 subgeny 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 nejfrekventovaněji 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<sup>+</sup> T cell clones by virtue of their T cell receptor  $\beta$  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

## VYUŽITÍ DETEKCE CYTOKINŮ PŘI PŘÍPRAVĚ VAKCÍN PROTI MNOHOČETNÉMU MYELOMU

### ROLE OF CYTOKINE QUANTIFICATION IN PREPARATION OF CELLULAR VACCINE AGAINST MULTIPLE MYELOMA

JELÍNEK J.<sup>1</sup>, OČADLÍKOVÁ D.<sup>1,2</sup>, HROTEKOVÁ Z.<sup>1,2,5</sup>, HÁJEK R.<sup>2,4,6</sup>, MICHÁLEK J.<sup>1,3,4,7</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, (UCBI), LF MU, BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

<sup>4</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU

<sup>5</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>6</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>7</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

#### Souhrn

Cytokiny zprostředkují buněčné interakce a jejich kvantifikace představuje důležitý nástroj moderní imunologie a buněčné biologie při sledování mezibuněčné komunikace včetně imunitní odpovědi. Na příkladu přípravy protinádorové vakcíny pro pacienty s mnohočetným myelomem na bázi dendritických buněk ukazujeme dva přístupy měření heterodimerické podjednotky p70 interleukinu 12 (IL-12p70) a IL-10 pomocí klasické metody ELISA a nové citlivější metody Cytometric Bead Array.

**Klíčová slova:** dendritické buňky, mnohočetný myelom, interleukin 12, interleukin 10, ELISA, Cytometric Bead Array.

#### Summary

Cytokines mediate intercellular interactions and their quantification represents an important instrument of modern immunology and cell biology used for studies of cell-to-cell communication, including an immune response. This study demonstrates two ways of heterodimeric p70 interleukin 12 (IL-12p70) and IL-10 measurement using conventional ELISA and the novel and highly sensitive Cytometric Bead Array method during the preparation of clinical grade dendritic cell-based vaccine for patients with multiple myeloma.

**Keywords:** dendritic cells, multiple myeloma, interleukine 12, interleukine 10, ELISA, Cytometric Bead Array.

#### Úvod

Jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu (MM) je vakcinace pomocí dendritických buněk (DB) pacienta, které jsou naloženy nádorovými antigeny (5, 8, 4, 7, 3). DB jsou zpravidla připravovány z monocytů z periferní krve v průběhu krátkodobé kultivace *in vitro* v přítomnosti růstových faktorů (interleukin 4 a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]). Vznikají tak nezralé DB se schopností pohltnout a zpracovat antigen. Účinkem maturačních stimulů (tumory nekrotizující faktor alfa, prostaglandin E2, lipopolysacharid, ligand receptoru CD40, interleukin 1 beta, interferon gama, toll like receptor) se nezralé DB diferencují ve zralé DB s vysokou schopností prezentovat antigen klidovým T lymfocytům, které by měly navodit intenzivní protinádorovou imunitní odpověď proti myelomovým buňkám (1). DB přitom produkují cytokiny, přičemž klíčovou roli hraje heterodimerická podjednotka p70 interleukinu 12 (IL-12p70). Jejím působením dochází k polarizaci imunitní odpovědi ve prospěch Th1 s produkcí interferonu gama (IFN-g) a dalších aktivačních cytokinů. DB však produkují rovněž určité množství interleukinu 10 (IL-10), který působí imu-

nosupresivně. Poměr mezi IL-12p70 a IL-10 tak hraje klíčovou roli při konečném efektu DB naložených antigenem a je rozhodující pro aktivaci či supresi T lymfocytů (2). Produkci cytokinů lze kvantifikovat metodou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). V poslední době je používána také vysoce citlivá metoda Cytometric Bead Array (CBA) založená na fluorescenci a měření pomocí průtokového cytometru. Následující příklad ukazuje srovnání obou metod při měření produkce IL-12p70 a IL-10, které jsou produkovány zralými DB používanými klinicky při vakcinaci pacientů s MM.

#### Materiál a metody

##### Schéma vlastní studie

Pro porovnání citlivosti metody ELISA a CBA byla měřena produkce IL-12p70 a IL-10 v supernatantu odebraném v den D0 a v den D9 v průběhu *in vitro* kultivace DB (6). Ve stručnosti, prekurzory DB byly nasazeny do kompletního kultivačního média v D0, po 5 dnech byl přidán nádorový antigen (Id protein) a v D6 maturační koktejl cytokinů. Pro detekci IL-10 byl použit ELISA kit Bender MedSystem human IL-10 BMS215INSTCE a pro detekci



## imunologické metody

IL-12p70 byl použit ELISA kit Bender MedSystem human IL-12 BMS238CE. Pro analýzu IL-10 a IL-12p70 pomocí CBA byl použit BD™ (Becton Dickinson) CBA Human IL-12p70 Flex Set a BD™ CBA Human IL-10 Flex Set. Princip této metody je založen na vzniku komplexů primární protilátka - cytokin - sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem na fluorescenčně značených mikroparticulích v analyzovaném roztoku. Mikroparticule se stejnou „capture“ protilátkou mají shodnou intenzitu fluorescence odlišnou od ostatních mikroparticulí, což umožňuje analýzu více cytokinů najednou v jednom vzorku.

Dny	Vakcína 1		Vakcína 2		Vakcína 3		Vakcína 4		Vakcína 5	
	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array
0	< st.	15,22	< st.	14,06	< st.	9,84	< st.	11,17	< st.	10,06
9	< st.	10,9	< st.	7,78	< st.	7,55	< st.	10,13	< st.	9,03

**Tabulka č. 1:** Koncentrace IL-10 (pg/ml) v jednotlivých vzorcích. < st. = pod detekční hranicí metody

Dny	Vakcína 1		Vakcína 2		Vakcína 3		Vakcína 4		Vakcína 5	
	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array	ELISA	FACS Array
0	< st.	2,33	< st.	3,71	< st.	4,28	5,16	3,78	< st.	6,79
9	< st.	2,78	4,2	1,76	3,95	3,15	5,62	2,58	6,06	3,04

**Tabulka č. 2:** Koncentrace IL-12p70 (pg/ml) v jednotlivých vzorcích. < st. = pod detekční hranicí metody

### Výsledky

#### *Produkce IL-12 a IL-10 u dendritických buněk v průběhu přípravy vakcín proti MM*

Produkce IL-12 a IL-10 byla měřena v kultivačním mediu v den nasazení DB (D0) a 3 dny po přidání nádorového antigenu Id proteinu (D9). Tabulka č.1 znázorňuje koncentraci IL-10 u všech pěti vakcín pacienta v den D0 a D9 měřené metodou ELISA a CBA. U všech vzorků měřených metodou ELISA zůstala hladina IL-10 pod detekční hranicí této metody. Na rozdíl od metody ELISA byly

všechny vzorky měřené metodou CBA v detekčních mezích. V žádném ze vzorků nebylo zjištěno zvýšení hladiny IL-10 ve dni D9 oproti D0. Podobně pak Tabulka č.2. ukazuje koncentraci IL-12p70 naměřenou ve stejných vzorcích. Získané hodnoty ukazují, že u obou metod nebyla ani u jednoho vzorku detekována prokazatelně vyšší hladina IL-12p70 v den 9 oproti dnu 0. I zde pomocí metody CBA byla ve všech vzorcích detekována měřitelná koncentrace IL-12p70, zatímco u metody ELISA bylo 5 vzorků pod detekční hladinou.

### Závěr

Pro přípravu protinádorových vakcín založených na DB naložených specifickým nádorovým antigenem se v poslední době zdá být velice důležitý poměr produkce IL-12p70 a IL-10 u použitých DB (2). Tato práce se pokusila zmapovat produkci těchto dvou cytokinů u DB při přípravě vakcín proti MM pomocí metody ELISA a CBA. Z výsledků je patrné, že sice ani u jednoho ze vzorků nebyl zaznamenán prokazatelný nárůst produkce IL-10, ale zároveň také ani u jednoho z vzorků nebyl zaznamenán žádoucí vzestup produkce IL-12p70. Tyto výsledky naznačují nutnost optimalizace postupu přípravy a maturace DB užívaných k přípravě vakcín proti MM, aby bylo dosaženo zvýšené produkce IL-12p70 u DB v průběhu kultivace. Zároveň tato studie potvrzuje nesporné výhody metody CBA v citlivosti měření při nízkých koncentracích stanovovaných cytokinů oproti standardně užívané metodě ELISA.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT NPVII 2B06058, MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura:

- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767-811.
- Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001; 29:1247-1255.
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000; 96: 3102-3108.
- Büchler T, Hanak L, Smejkalova J. et al. Využití monoklonálního imunoglobulinu k přípravě protinádorové vakcíny u nemocných s mnohočetným myelomem – první zkušenosti z klinické studie. *Klinická onkologie.* 2004; 17: 64-67.
- Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC, et al. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Blood.* 2003; 4: 1435-1442.
- Očadlíková D, Kovářová L, Michálek J. et al. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty 26.-28.května 2004. 2004; 53: 113-116.
- Vonderheide RH, Domchek SM, Chen D-Y, et al. Vaccination of Cancer Patients Against Telomerase Induces Functional Anti-tumor CD8+ T lymphocytes. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10: 828-839.
- Wen YJ, Min R, Tricot G, et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood.* 2002; 99: 3280-3285.

## METODY POUŽÍVANÉ V HODNOCENÍ ANGIOGENEZE A JEJICH VÝZNAM U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

### METHODS USED FOR EVALUATION OF ANGIOGENESIS AND THEIR SIGNIFICANCY FOR MULTIPLE MYELOMA

POUR L.<sup>1,2</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>2,3</sup>, SLANÝ M.<sup>2,3</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>2</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PRF MU BRNO

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

#### Souhrn

Je již jednoznačně prokázáno, že míra angiogeneze (novotvorba cév) je zvýšena i u krevních nádorových onemocnění. Jedná se o velmi složitý proces, ve kterém je zapojeno obrovské množství genů a produktů těchto genů z nádorových i normálních tkání. Angiogeneze zřejmě v patogenezi a progresi myelomu hraje dvě role: 1) zajišťuje adekvátní zásobení myelomových buněk kyslíkem a živinami, 2) angiogenní cytokiny, stimulují migraci a proliferaci myelomových buněk. Mnohočetný myelom je prvním krevním nádorovým onemocněním, u kterého byl prokázán prognostický význam angiogeneze v kostní dřeni, a to dvěma metodami: 1) měřením mikrovaskulární denzity v kostní dřeni 2) stanovením koncentrací proangiogenních cytokinů.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, angiogeneze, MVD, ELISA, cytokiny, HGF.

#### Summary

It is confirmed that angiogenesis is increased not only in solid tumor but in hemtological malignancies too. Angiogenesis is complicated procedure, where lot of factor s are influenced. Probably, angiogenesis plays two roles in myeloma development new born vessels 1st. provide adequate nutrition of tumor cells, 2nd. Angiogenic cytokines stimulance migration and growth of myeloma cells. Measurement of angiogenesis degree is possible according to MVD and by measurement of cytokine levels developed in angiogenesis.

**Keywords:** multiple myeloma, angiogenesis, MVD, ELISA, cytokines, HGF.

#### Úvod

Angiogeneze je novotvorba cév fyziologicky se vyskytující při embryogenezi, v ovariích a endometriu v průběhu menstruačního cyklu a při reparačních procesech v organismu. Souvislost nádorového bujení a angiogeneze byla popsána Folkmanem et al. v roce 1971. Za další čtvrtstoletí byla hodnocena angiogeneze u krevních nádorových onemocnění a u většiny z nich byla potvrzena zvýšená angiogenní aktivita (4). Mnohočetný myelom je prvním krevním nádorovým onemocněním, u kterého byl prokázán prognostický význam angiogeneze v kostní dřeni, a to dvěma metodami: 1) stanovením koncentrací proangiogenních cytokinů 2) měřením mikrovaskulární denzity (MVD) v kostní dřeni (30).

Angiogeneze u MM je složitý děj, ve kterém je zapojeno značné množství buněk i humorálních faktorů, které se uplatňují jak angiogenním, tak i antiangiogenním působením. Porozumění mechanismům angiogeneze a jejich ovlivnění bude pravděpodobně jedním z pilířů tzv. „targeted therapy“ (cílené léčby). K účelnému zapojení antiangiogenní léčby do terapeutických algoritmů v onkologii je klíčové změřit míru angiogeneze a její ovlivnění léčbou.

#### MVD-historie

Jako první použil tuto imunocytochemickou metodu Srivastava et al. pro hodnocení vaskularity u primárních melanomů (25). V roce 1991, Weidner et al. použil pro značení endoteliálních buněk nádoru prsu fVIII-RA/vWF (factor VIII-related antigen/von Willebrand factor) s využitím standardní imunoperoxidázové techniky. Potvrdil téměř lineární vztah mezi počtem cév a oblastí nejrozsáhlejší vaskularizace – „hot spots“ – a tím i metastatický potenciál každého nádoru. Později bylo zjištěno, že faktor VIII-RA není univerzálním angiogenním markerem, protože je exprimován převážně na velkých krevních cévách a také cévách lymfatických. Nezávislé patologické studie prokázaly, že monoklonální protilátka CD-31 je schopna značit mnohem větší počet cév než faktor VIII-RA (16, 32, 6). Další studie u difúzního velkobuněčného lymfomu a myelodysplastického syndromu zjistily, že značení pomocí monoklonální protilátky CD-34 vykazuje mnohem větší citlivost ve srovnání s VIII-RA a CD-31 (23). V souladu s těmito výsledky byla i další práce, která hodnotila angiogenezi u pacientů s MM. Výsledky potvrdily vysokou citlivost markeru CD-34 pro endoteliální buňky a schopnost morfologického rozlišení malých cév (23).

Standardní imunohistochemické metody pro hodnocení MVD u MM využívají v současnosti převážně monoklonální protilátku CD-34 a vWF (12).

První prací, která potvrdila významné zvýšení MVD u MM vzhledem k MGUS, byla publikována v roce 1994 (31). Autoři předložili hypotézu, že progresse z MGUS do MM je spojena se zvýšením MVD. Rajkumar et al. dále potvrdil, že progresivní zvýšení MVD se vyskytuje v celém spektru onemocnění postihujících plazmatické buňky (primární amyloidóza, MGUS, doutnající i aktivní MM) (21)

### Princip hodnocení MVD

Nejčastěji se používá hodnocení pomocí protilátky anti CD34 (29) Hodnocení probíhá z válečku spongiosní kosti získaného trepanobiopsií. Získané bioptické vzorky kostní dřevě v délce 5-20 mm jsou fixovány v Löwyho fixačním a dekalciфикаčním roztoku na 20-24 hodin. Po odvápnění a promytí v 70% alkoholu následuje odvodnění a zalití do parafínu. Posléze je zhotovena sada sériových preparátů zahrnující barvení: hematoxylin-eozin, May-Grünwald-Giemsa (MGG), PAS, průkaz chloracetátsterázy, Perlsovo barvení na průkaz trojmočného železa a impregnace retikulinových vláken dle Gömöriho. Následuje deparafinace řezů a tepelné demaskování antigenů. Následně aplikace primární protilátky antiCD34

Při vyšetřování mikrovaskulární denzity používáme optické hodnocení ve světelném mikroskopu. Preparáty s imunohistochemickým průkazem anti CD34 jsou nejprve celkově zhodnoceny při přehledném zvětšení 100x nebo 200x a pokud možno, jsou vybrány tři oblasti s nejvyšším počtem patrných cév, tzv. „hot spots“. Celkově je tedy v každém vzorku hustota cév zjišťována v 9 zorných polích. Jsou hodnoceny vždy jen cévy, jejichž stěna je tvořena pouze jednou vrstvou endotelií a neobsahovaly ve stěně hladkou svalovinu.

### ELISA - historie

Jednoduchou metodou pro hodnocení koncentrace cirkulujících angiogenních faktorů v kostní dřevě a v periferní krvi se stala ELISA (enzym-linked immunosorbent essay). ELISA je jednou z nejpoužívanějších biochemických metod sloužící k detekci protilátek nebo antigenů ve vzorku. Metoda je vysoce citlivá a díky její jednoduchosti a rychlosti se stala celosvětově používaným rutinním nástrojem ve zdravotnictví pro hodnocení celé řady analytů v tělních tekutinách. Princip ELISA metody spolu s EIA (enzyme-immunoassay) byly poprvé publikovány v roce 1971 dvěma nezávislými skupinami, skupina Petera Perlmanna a Evy Engvallové ze Stockholmské university ve Švédsku a skupina Antona Schurse a Baude van Weemena z Nizozemí. Tyto metody nahradily zdraví ohrožující radioassay (RIA) (10).

### Princip ELISA

ELISA test je založen na schopnosti proteinů (antigenů; Ag/protilátky; Ab) vázat se na pevný povrch (obvykle 96-jamková polystyrenová mikrodestička) buď nespecificky adsorpcí na povrch, nebo specificky uchycením pomocí další protilátky specifické k antigenu – sandwichová ELISA. Po navázání antigenů je přidán roztok (sérum,

supernatant) obsahující specifickou protilátku. Protilátka označená enzymem (alkalická fosfatáza, křenuvová peroxidáza) se váže k antigenu a v konečné kroku se přidává substrát, který přeměňuje enzym na určitý detekovatelný signál. Na základě intenzity signálu lze pak stanovit množství antigenů ve vzorku (13, 27).

Pro měření koncentrace antigenů existují dvě základní metody: sendvičová ELISA a kompetitivní ELISA. Sendvičová ELISA je rychlá a přesná metoda a za použití čistého standardního antigenů může test prokázat absolutní množství antigenů v neznámém vzorku. Toto hodnocení používá dvě protilátky, které se vážou na povrch antigenů. Jedna z protilátek se váže na povrch destičky a současně k Ag; druhá Ab se váže k Ag a k sekundární protilátce značené enzymem. Po přidání substrátu dojde k chromogenní reakci, která se projeví vznikem barevného produktu.

Kompetitivní ELISA je použita v případě, když nejsou dostupné dvě protilátky vázající se na cílový Ag. Další výhodou je, že metoda nevyžaduje purifikovanou primární protilátku. Metoda má různé modifikace, ale základní princip je založen na tom, že Ab se naváže na povrch destičky, přidá se směs Ag a Ab dochází ke kompetici (k soutěžení) mezi Ab volnou v roztoku a Ab vázanou na destičce o vazbu na Ag. Následuje promytí destičky a přidání sekundární protilátky značené enzymem. V případě kompetitivní metody platí nepřímá úměra, tzn. čím vyšší je koncentrace Ag v neznámém vzorku, tím slabší je chromogenní signál (13).

### Vstupní materiál MVD

Vstupním materiálem jsou válečky spongiosní kosti získané z trepanobiopsie lopaty kosti kyčelní. Bioptické vzorky jsou následně uzavřeny do parafinových bločků (viz. Princip metody).

### ELISA

Vstupní materiál pro hodnocení cirkulujících angiogenních a anti-angiogenních faktorů je sérum z periferní krve nebo plazma kostní dřevě. Sérum a EDTA plazma lze skladovat 24 hod při +2°C do +8°C a několik měsíců při -18°C do -20°C. Vzorky séra a plazmy by neměly být opakovaně zamrazeny a rozmrazeny. Vzorky by měly být chráněny před světlem.

### Specifická nastavení u MM MVD

Vzhledem k prokázané nižší citlivosti monoklonálních protilátek CD-31 a vWF, je doporučeno používat pro hodnocení MVD u MM anti-CD-34 (23). Dále se nedoporučujeme standardní provádění měření MVD po léčbě. Doporučení vyplývá ze závěrů rozsáhlé práce, která na velkém souboru pacientů neprokázala rozdíl v MVD před léčbou a po léčbě a to ani po agresivní léčbě vysokodávkovaným melfalanem a autologní transplantací (1, 9).

### ELISA

Je přesnější hodnotit koncentrace cytokinů v plazmě než v séru, neboť trombocyty obsahují poměrně značné množství těchto faktorů a při procesu srážení dochází k jejich uvolnění a zkrácení výsledků (7). V případě hodnocení angiogenních aktivátorů je nezbytné provádět měření vždy v prvním prvním mililitru odebrané kostní dřevě. Jak prokázaly naše výsledky, měření prováděné v různých



fázích odběru kostí dřeně se projevilo významným rozdílem v hladinách HGF a trombospondinu (17).

### Specifické problémy

#### MVD

Nevýhoda této metody spočívá v její malé objektivnosti, která je závislá na zkušenostech patologa hodnotícího daný histologický preparát. Omezující je také časová a technická náročnost přípravy preparátu, která snižuje její rutinní využití. Metoda nemůže být zatím použita ani k hodnocení účinnosti léčby. Předpokládá se, že MVD není odrazem závislosti nádoru na angiogenezi či odrazem angiogenní aktivity, ale spíše odrazem metabolické aktivity nádorových buněk a jejich vztahu k buňkám mikroprostředí kostní dřeně (6; 8).

#### ELISA

Nevýhodou této metody je její relativně vysoká cena, velká spotřeba substrátu a dalších složek. Potenciálním problémem může být dlouhý vyvíjecí čas a, především u malých molekul, nízký lineární dynamický rozsah. Navíc účinnost ELISA testu může být ovlivněna nízkou specifikou protilátek, což se projeví zvýšeným pozadím či falešnou pozitivitou. Vysoké koncentrace vzorku mohou vyvolávat „hook efekt“ a ovlivnit tak stanovené hodnoty. Nevýhodou sendvičové metody je omezené množství vhodných monoklonálních protilátek, které se vážou k vhodnému epitopu Ag, aniž by došlo ke sterickému efektu (13).

#### Ukázka reprezentativního výsledku (viz Obrázek MVD)

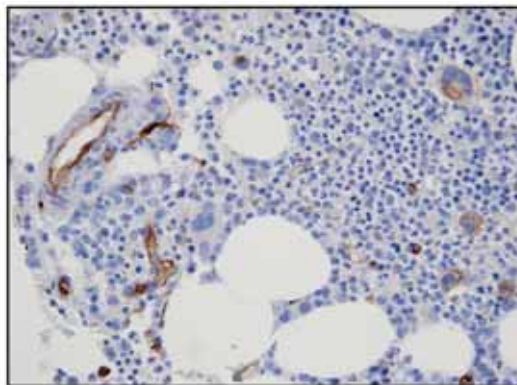
V naší studii jsme na základě semikvantitativního hodnocení MVD rozdělili pacienty s MM do tří skupin. MVD hodnocena jako nízká, když je nalezeno 10 kapilár v zorném poli, střední 10-20 kapilár v zorném poli a vysoká, kdy je přítomno více než 20 kapilár v zorném poli. Typický příklad histologického obrazu jednotlivých stupňů mikrovaskulární denzity je uveden na Obrázku č.1, č.2 a č.3. Bylo opakovaně prokázáno, že pacienti s vysokým stupněm mikrovaskulární denzity mají zásadně horší prognózu onemocnění než pacienti se střední a nízkou hustotou kapilární sítě v kostní dřeni (20).

#### Význam metody u MM stávající

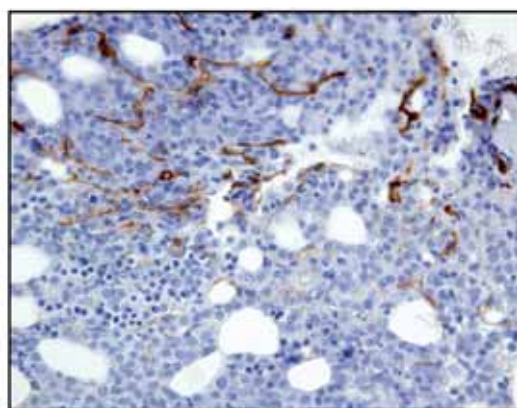
Hodnocení míry angiogeneze u pacientů s mnohočetným myelomem je v současné době pomocným faktorem v hodnocení agresivity onemocnění a jeho prognózy. Avšak zejména hodnocení mikrovaskulární denzity v spongiosní kosti získané z trepanobioptického vyšetření je vhodným doplněním histopatologického vyšetření. A umožní patologovi vyjádřit se o mnoho lépe k prognóze onemocnění, protože tak nepopíše jenom samotné plasmocyty, ale i vlastnosti mikroprostředí kostní dřeně, které je v patogeneze myelomu zcela klíčové.

Hodnocení hladin jednotlivých faktorů je zatím pouze experimentální metodou. Většina prací hodnotících koncentrace angiogenních faktorů pomocí ELISA se zabývá VEGF (vascular endothelial growth factor, růstový faktor pro cévy a endotelie), bFGF (basic fibroblast growth factor, zásaditý růstový faktor pro fibroblasty), HGF (hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor) a to jak v plasmě periferní krve tak plasmě kostní dřeně (15, 26). Vliv vyso-

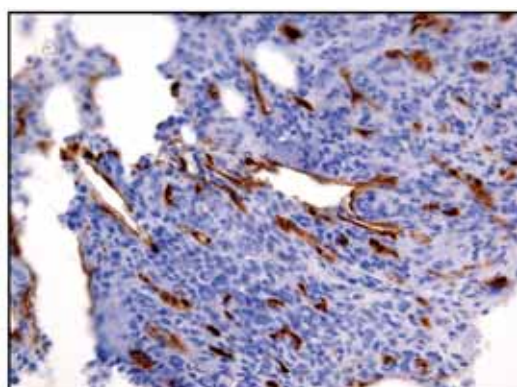
kých hladin všech těchto aktivátorů na agresivitu choroby byl opakovaně popsán (2, 7, 22). Naše výsledky v souladu s citovanou literaturou prokázaly, že klíčovým aktivátorem angiogeneze je u mnohočetného myelomu HGF, kde jsou výsledky nejednoznačnější (9, 20, 31).



Obrázek č. 1: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta s nízkou MVD.



Obrázek č. 2: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta se střední MVD.



Obrázek č. 3: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta s vysokou MVD.

#### Význam metody u MM očekávaný

##### MVD

Zvýšená mikrovaskulární denzita v kostní dřeni je u MM významným negativním prognostickým faktorem (9, 14, 20, 28). Na základě zmíněných prací lze konstatovat, že čím více se vytvoří nových cév, tím je onemocnění agresivnější. Hodnocení angiogeneze měřením mikrovaskulární denzity je významným prognostickým faktorem a se zaváděním nových antiangiogenních léků se může stát i významným faktorem prediktivním.



## ELISA

Potenciální význam ELISA metody spočívá v rychlém stanovení prognózy a odpovědi na anti-angiogenní léčbu na základě hodnocení angiogenních cytokinů v periferní krvi, resp. séru či plasmě. Metoda nevyžaduje biopsie kostní dřeně, separaci CD138+ buněk, ani řadu časově i finančně nákladných metod. Jako nejvhodnější faktor ze skupiny aktivátorů pro monitoring angiogeneze se jeví HGF, protože jeho hladiny jsou při stanovení diagnózy u pacientů, kteří dosáhli nejméně velmi dobré parciální remise, statisticky nižší než u pacientů s horší léčebnou odpovědí a to jak v plasmě periferní krve, tak v plasmě kostní dřeně. U ostatních faktorů výsledky nejsou zcela jednoznačné a není zcela zřejmé, který z uvedených faktorů má jednoznačně největší vliv na patogenezi a prognózu u mnohočetného myelomu (9, 18, 20, 31).

## Závěr

Angiogeneze je velmi složitý proces, ve kterém je zapojeno obrovské množství genů a produktů těchto genů z nádorových i normálních tkání. Podle výsledné převahy jednotlivých zapojených faktorů je angiogeneze tlumena nebo aktivována (3). Hlavním cílem je definovat diagnostický a prognostický potenciál jednotlivých faktorů v patogenezi MM a na základě jednoduchých laboratorních testů zvolit vhodnou léčbu. Pochopení mechanismu angiogeneze a jeho ovlivnění se tak v budoucnu stane základem cílené individualizované léčby.

## Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

## Literatura

1. Adam Z., Hájek R., Mayer J. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova univerzita, 1999
2. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, et al. Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma: correlation with markers of disease activity. *Am J Hematol (United States)*, Apr 2003, 72(4) p229-33
3. Brehm, S.: Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control*, 6, 1999, s. 436-458
4. Di Raimondo F. Angiogenesis in hematology: a field of active research. *Leuk Res.* 2003 Jul;27(7):571-3.
5. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.*, 18, 1971, s.1182-1186
6. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol.* 1995 Mar;13(3):765-82
7. Iwasaki T. Predicting treatment responses and disease progression in myeloma using serum vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels. *Leuk Lymphoma.* 2003 Aug;44(8):1347-51.
8. Jakob C, Sterz J, Zavrski I. Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006 Jul;42(11):1581-90. Epub 2006 Jun 23.
9. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *Br J Haematol (England)*, Dec 2002, 119(3) p665-71
10. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
11. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415-8
12. Martin SK, Dewar AL, Farrugia AN. Tumor angiogenesis is associated with plasma levels of stromal-derived factor-1alpha in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12(23):6973-7.
13. ([http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/elisa\\_kits](http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/elisa_kits))
14. Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol (United States)*, Dec 2001, 28(6) p565-9
15. Orpana A. :Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. *Leukemia and lymphoma*, 2002 Feb;43(2):219-24.
16. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, et al. JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43:752-757, 1990
17. Pour L, Hájek R, Mainsar V et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitr Lek.* 2004 Dec;50(12):930-8. Review.
18. Pour L., Kovarova L., Büchler T. Evaluation of hepatocyte growth factor and endostatin in the bone marrow of patients with multiple myeloma and the effect of peripheral blood admixture. 10<sup>th</sup> International Myeloma Workshop, Sydney, Australia, 10-14 April 2005, Abstract in: *Haematologica* 90, 2005, Suppl. 1, 170, PO 914
19. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol (England)*, Sep 2002, 118(3) p817-20
20. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res (United States)*, Aug 2000, 6(8) p3111-6
21. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul;8(7):2210-6.
22. Sezer O, Jakob C, Eucker J, et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol (Denmark)*, Feb 2001, 66(2) p83-8
23. Sezer O, Niemöller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol (Germany)*, Oct 2000, 79(10) p574-7
24. Sezer O, Niemöller K, Jakob C, Heider U. Angiogenesis in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2001 Aug;25(8):639-45.
25. Srivastava A, Laidler P, Davies R et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 133:419-423, 1988
26. Študla V. et al. Comparison of serum levels of selected biological parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Vnitr Lek.* 2006 Mar;52(3):232-40. Czech.
27. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier, Amsterdam, 1985.
28. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994 Jul;87(3):503-8.
29. Vacca, A., Ribatti, D., Roccaro, AM. et al. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin Oncol.*, 28, 2001, s. 543-550
30. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia.* 2006 Feb;20(2):193-9.
31. Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica (Italy)*, Feb 2003, 88(2) p176-85
32. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: Komparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86:386-388, 1994
33. Weidner N, Semple SP, Welch WR, et al: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8. 1991

### MOŽNOST PREDIKCE LÉČEBNÉ ODPOVĚDI NA AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI POMOCÍ STANOVENÍ VYBRANÝCH AKTIVÁTORŮ A INHIBITORŮ ANGIOGENEZE

#### DETECTION OF ANGIOGENESIS ACTIVATORS AND INHIBITORS AS A PREDICTOR OF RESPONSE TO THERAPY WITH AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION

POUR L.<sup>1,3</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>2,3</sup>, SLANÝ M.<sup>3</sup>, KŘEN L.<sup>5</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> ÚSTAV PATOLOGIE, FN A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Význam inhibitorů angiogeneze na rozdíl od aktivátorů není u mnohočetného myelomu doposud zcela jasně definován. Naší hypotézou, kterou jsme ověřovali v této práci, bylo zvýšení hladiny inhibitorů u pacientů s dobrou léčebnou odpovědí, tedy zvýšená inhibice angiogeneze u těchto pacientů. ELISA metodou byly měřeny hladiny aktivátorů a inhibitorů angiogeneze v periferní plazmě u celkem 88 pacientů a plazmě kostní dřeně u celkem 95 pacientů. Pacienti byli rozděleni na skupiny podle dosažené léčebné odpovědi na tři skupiny: 1. alespoň velmi dobrá parciální remise (VGPR), 2. parciální remise (PR), 3. nedostatečná léčebná odpověď. Bylo porovnáno, zda se liší hladiny jednotlivých faktorů měřených v době stanovení diagnózy mezi pacienty s rozdílnou léčebnou odpovědí. Výsledky u skupiny 41 pacientů s  $\geq$ VGPR, byly zaznamenány signifikantně nižší hodnoty HGF než u skupiny 33 pacientů s dosaženou PR a u 14 pacientů s nedostatečnou léčebnou odpovědí. Stejně tak v plazmě kostní dřeně byla hodnota HGF nižší u pacientů s dosaženou VGPR oproti ostatním. U parametru trombospodin byl v kostní dřeni prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami. U 14 pacientů s nedostatečnou odpovědí byla v porovnání s 36 pacienty s dosaženou, PR statisticky signifikantně nižší hodnota trombospodinu;  $p=0,036$ . Rovněž tak pacienti s dosaženou  $\geq$ VGPR vykazovali statisticky signifikantně vyšší hodnotu trombospodinu oproti pacientům s nedostatečnou léčebnou odpovědí ( $p=0,001$ ) a skupině pacientů s PR ( $p=0,049$ ). Hodnoty VEGF, FGF, angiostatinu a endostatinu se v jednotlivých skupinách nelišily v PP ani PKD. Závěr: Vysoká hladina trombospodinu u pacientů dobře reagujících na transplantační léčbu, je novým, dosud nepublikovaným prognostickým markerem. Společně s prokázanou nižší hladinou aktivátoru HGF u pacientů s dobrou léčebnou odpovědí je potvrzením snížení angiogeneze u pacientů reagujících na léčbu.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, angiogeneze, ELISA, inhibitory angiogeneze, HGF.

#### Summary

Angiogenesis is involved in the development and progression of multiple myeloma (MM.) Role of angiogenesis activators in myeloma seems to be confirmed but role of angiogenesis inhibitors in MM remains very unclear. The aim of this study was to evaluate the role of VEGF, HGF, bFGF, trombospodin, endostatin, and angiostatin peripheral plasma (PP) and bone marrow plasma (BM) levels in a group of patients with MM who underwent autologous stem cell transplant (ASCT) and their influence on treatment response.

Patients were divided into three groups according to treatment response: group A) 43 patients who achieved at least very good partial response (VGPR); group B) 35 patients who achieved partial response (PR); group C) 14 patients who did not achieved even PR. HGF concentration at the time of diagnosis in both PP and BM is significantly lower at group A (PP-median=472 pg/L; 95%IS 417-823pg/L. BM-median= 886 pg/L; 95%IS 928-2111pg/L) than at group B (PP-median=623 pg/L; 95%IS 493-990pg/L;  $p= 0,025$  / BM-median= 1165 pg/L; 95%IS 1140-2656pg/L;  $p= 0,001$  /) and group C (PP-median=1870 pg/L; 95%IS 522-4971pg/L;  $p= 0,001$  / BM-median= 2605 pg/L; 95%IS 1328-5355pg/L;  $p= 0,001$  /). Trombospodin concentration at the time of diagnosis only in BM not in PP is significantly lower at group C (BM-median= 188 pg/L; 95%IS 38-678pg/L) than at group B (BM-median= 303 pg/L; 95%IS 249-705pg/L;  $p= 0,036$ ) and group A (BM-median= 351pg/L; 95%IS 437-916pg/L;  $p= 0,001$  /). VEGF, bFGF, endostatin and angiostatin concentrations at diagnosis time did not differ significantly in PP and BM in patients with VGPR, PR and no response. Our results confirmed that key angiogenesis activators in MM is HGF. If the treatment is successful low levels of HGF occurs only. There is important finding that trombospodin in BM is higher in patients with successful treatment. It means, that angiogenesis is more inhibited in patients with VGPR than in other.

**Key words:** multiple myeloma, angiogenesis, ELISA, inhibitors of angiogenesis, HGF.

## příklady využití

### Úvod

Jedním z nových prognostických faktorů u pacientů s mnohočetným myelomem léčených autologní transplantací by mohlo být i hodnocení angiogeneze. Opakovaně bylo prokázáno, že vyšší vstupní hladiny aktivátorů angiogeneze, zejména HGF korelují s horší prognózou onemocnění (3, 6). Hladiny inhibitorů a jejich vliv na stanovení prognózy nebyl zatím publikován na rozsáhlém souboru pacientů. Naše výsledky jsou navíc podpořeny metodickou prací (4). Cílem naší práce bylo určení, zda se hladiny vybraných aktivátorů a inhibitorů liší v době stanovení diagnózy u pacientů, kteří dosáhli dobré léčebné odpovědi oproti pacientům, kteří ji nedosáhli.

### Soubor pacientů, metodika a výsledky

Hodnoceny byly inhibitory thrombospondin, angiostatin, endostatin a aktivátory, dále hepatocytární růstový faktor (HGF), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF). Hodnocení probíhalo ze vstupního vzorku plazmy kostní dřeně a plazmy periferní krve. Pacienti byli rozděleni na skupiny podle dosažené léčebné odpovědi (Durie2006). V našem souboru pacientů bylo prokázáno, že pacienti s dosaženou alespoň VGPR (velmi dobrá parciální remise) mají v úvodu diagnózy nižší hodnoty HGF v periferní plazmě i v plazmě kostní dřeně a zároveň pacienti s dosaženou VGPR mají vyšší vstupní hodnoty trombospondinu v plazmě kostní dřeně oproti ostatním pacientům. Viz tabulky č.1,2,3. V ostatních parametrech nebylo dosaženo statisticky signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami pacientů rozdělených podle léčebné odpovědi.

### Závěr

Výsledky HGF jsou v souladu s citovanou literaturou (2, 5, 8). Vzhledem k provedené standardizaci metodiky měření jednotlivých faktorů má rovněž negativní výsledek týkající se korelace hladin VEGF a bFGF s léčebnou odpovědí velkou výpovědní hodnotu. Naše výsledky naznačují, že

nízká vstupní hladina HGF a vysoká hladina trombospondinu v kostní dřeni úzce souvisí s dobrou prognózou. Jedná se o první rozsáhlejší soubor pacientů, kde byly hodnoceny inhibitory angiogeneze. Zjištění, že u pacientů s MM a dobrou léčebnou odpovědí je angiogeneze inhibována více než u pacientů ostatních, může mít významný dopad nejen prognostický, ale i terapeutický.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	41	33	14
Průměr (SD)	620,8 (572,9)	741,8 (629,1)	2628,1(2534,2)
Medián	472,0	623,0	1810,0
95% IS	417,7 - 823,9	493,0 - 990,7	284,4 - 4971,9
Min. - max.	34 - 2600	70,4 - 2700	527 - 8000

Tabulka č. 1: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty HGF v periferní krvi jsou v pg/ml.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	45	36	14
Průměr (SD)	1519,8 (1800,4)	1898,5 (2029,1)	3080,0 (2960,7)
Medián	886,5	1165,0	1300,0
95% IS	928,0 - 2111,6	1140,8 - 2656,1	804,2 - 5355,8
Min. - max.	143 - 8000	159 - 8000	490 - 8000

Tabulka č. 2: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty HGF v plazmě kostní dřeně jsou v pg/ml.

	VGPR	PR	NEDOSTATEČNÁ ODPOVĚĎ
N	45	36	14
Průměr (SD)	676,7 (729,1)	492,3 (570,8)	358,6 (416,7)
Medián	351,5	303,0	188,0
95% IS	437,1 - 916,3	279,1 - 705,4	38,3 - 678,9
Min. - max.	7,1 - 2060	58,9 - 2060	52,3 - 1350

Tabulka č. 3: Počet pacientů v jednotlivých skupinách dle léčebné odpovědi a základní popis dat, hodnoty trombospondinu v plazmě kostní dřeně jsou v pg/ml.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Durie BG. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. Eur J Cancer. 2006 Jul;42(11):1539-43.
2. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. Br J Haematol (England), Dec 2002, 119(3) p665-71
3. Neben K, Moehler T, Kraemer A et al. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. Br J Haematol. 2001 Dec;115(3):605-8.
4. Pour L., Kovarova L., Büchler T., Penka M., Vorlicek J., Hajek R.: Evaluation of hepatocyte growth factor and endostatin in the bone marrow of patients with multiple myeloma and the effect of peripheral blood admixture. 10<sup>th</sup> International Myeloma Workshop, Sydney, Australia, 10-14 April 2005, Abstract in: Haematologica 90, 2005, Suppl. 1, 170, PO
5. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. Clin Cancer Res (United States), Aug 2000, 6(8) p3111-6
6. Sezer O, Jakob C, Eucker J, et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. Eur J Haematol (Denmark), Feb 2001, 66(2) p83-8
7. Ščudla V., et al.: Comparison of serum levels of selected biological parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. Vnitr Lek. 2006 Mar;52(3):232-40. Czech.
8. Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. Haematologica (Italy), Feb 2003, 88(2) p176-85

### STANOVENÍ PROGNÓZY NA ZÁKLADĚ VYHODNOCENÍ ANGIOGENEZE Z TREPANOBIOPTICKÉHO VZORKU

#### DETERMINATION OF PROGNOSIS BASED ON BONE MARROW MICROVASCULAR DENSITY

POUR L.<sup>1,3</sup>, ŠVÁCHOVÁ H.<sup>2,3</sup>, SLANÝ M.<sup>3</sup>, KŘEN L.<sup>5</sup>, HÁJEK R.<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> ÚSTAV PATOLOGIE, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

Měření mikrovaskulární density (MVD) je první metodou hodnocení angiogeneze u mnohočetného myelomu. Hlavním cílem této práce bylo zavedení standardní metodiky a získání údajů o silném prognostickém znaku v našich podmínkách. Hodnoceno bylo celkem 59 vzorků kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem, léčených podle jednotného schématu. Pacienti byli rozděleni na skupiny s nízkou, střední a vysokou MVD. Zastoupení v jednotlivých skupinách bylo následující: 17 pacientů s nízkým stupněm, 28 se středním a 14 pacientů s vysokým stupněm MVD. Byla provedena korelace s dobou přežití pacientů a stupněm mikrovaskulární density a bylo statisticky signifikantně prokázáno ( $p = 0,002$ ), že vysoká mikrovaskulární denzita (medián přežití 31 měsíců) úzce koreluje se špatnou prognózou mnohočetného myelomu. U pacientů s nízkým stupněm MVD je naopak medián přežití více než dvojnásobný (78 měsíců).

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, angiogeneze, MVD, mikrovaskulární denzita.

#### Summary

Bone marrow microvascular density evaluation is a confirmed prognostic factor in myeloma patients. We described our primary results and experiences with this Method. We evaluated together 59 patients bone marrow samples, who were treated according to same protocol. Patients were divided into three groups. Patients with low degree of MVD 29% (17/59), 47% (28/59) patients with middle degree of MVD and 24% (14/59) patients with high degree of MVD. Patients with high degree of MVD had statistically significantly ( $p=0,002$ ) decreased median of overall survival (31 month) comparable to patients with low degree of MVD (78 month).

**Key words:** multiple myeloma, angiogenesis, MVD, microvascular density.

#### Úvod

Měření mikrovaskulární density (MVD) je první metodou hodnocení angiogeneze u mnohočetného myelomu. Opakovaně byl prokázán vliv na prognózu myelomu (2). Bylo použito měření mikrovaskulární density, jak je popsáno ve stati metody hodnocení angiogeneze u mnohočetného myelomu. I na našem souboru pacientů jsme prokázali zásadní vliv mikrovaskulární density na prognózu onemocnění.

#### Soubor pacientů a výsledky

Hodnoceno bylo celkem 59 vzorků kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem, léčených dle jednotného schématu zakončeného autologní transplantací periferních kmenových buněk. Vzorky byly odebrány v rámci vstupního vyšetření kostní dřeně. Jednalo se o pacienty zařazené do klinické studie 4W nebo CMG. Pokoušeli jsme se hodnotit mikrovaskulární densitu z koagula kostní dřeně, ale prokázali jsme, že to není vhodná metoda a je nutno použít váleček spongiózní kosti. Hodnocení

bylo semikvantitativní. Pacienti byli rozděleni na skupiny s nízkou, střední a vysokou mikrovaskulární denzitou podle výše uvedené metodiky. Nejvíce pacientů bylo zařazeno do skupiny se střední MVD, počet pacientů s nízkým a vysokým stupněm MVD byl podobný, podrobně viz. Tabulka č.1.

Byla rovněž provedena korelace s dobou přežití pacientů a stupněm mikrovaskulární density a bylo statisticky signifikantně prokázáno ( $p = 0,002$ ), že vysoká mikrovaskulární denzita úzce koreluje se špatnou prognózou mnohočetného myelomu. U pacientů s nízkým stupněm MVD je naopak medián přežití více než dvojnásobný. Podrobněji viz. Tabulka č.2.

#### Závěr

Ve shodě s citovanou literaturou, jsme prokázali zásadní vliv MVD na prognosu myelomu (1, 3, 4, 5). Rovněž v našem souboru pacientů byla zvýšená mikrovaskularita kostní dřeně asociována s kratším přežitím pacientů oproti pacientům s nízkým stupněm mikrovaskulární density.



## příklady využití

Mikrovaskulární denzita	Počet pacientů
Nízká	17
Střední	28
Vysoká	14
Celkem	59

Tabulka č. 1: Počet pacientů v jednotlivých skupinách podle MVD

Mikrovaskulární denzita	Medián přežití
Nízká	78 měsíců
Střední	62 měsíců
Vysoká	31 měsíců

Tabulka č. 2: Medián přežití u pacientů s rozdílnou mikrovaskulární densitou

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434

### Literatura

1. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Feb;20(2):193-9
2. Vacca, A., Ribatti, D., Roccaro, AM. et al.: Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin Oncol.*, 28, 2001, s. 543-550
3. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res (United States)*, Aug 2000, 6(8) p3111-6
4. Sezer O, Niemoller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol (Germany)*, Oct 2000, 79(10) p574-7
5. Munshi NC, Wilson C.: Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol (United States)*, Dec 2001, 28(6) p565-9

## PŘEDSTAVENÍ PRACOVIŠTĚ URC-CMG

(UNIVERSITY RESEARCH CENTRE - CZECH MYELOMA GROUP)  
UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA

## Kolektiv autorů

Bártová E., Burešová I., Čumová J., Dudová S., Foltánková V., Jelínek J., Kovářová L., Krejčí J., Krejčí M., Nečasová J., Potáčková A., Pour L., Slaný M., Smetana J., Šváchová H., Zaoralová R., Zemanová Z., Kuglík P., Michálek J., Hájek R.

Během posledních pěti let došlo ve světě k nebyvalému zvýšení zájmu o oblast výzkumu monoklonálních gamapatií a mnohočetného myelomu. Nepochybně to souvisí s významnými pokroky v léčbě tohoto onemocnění. Tato situace vedla ke vzniku četných, kvalitních, avšak malých a nekoordinovaných výzkumných projektů na národní i mezinárodní úrovni. Konkurenceschopnost EU zvláště ve srovnání s USA zaostávala za očekáváním díky roztržitosti projektů. O dlouhodobou koordinaci v rámci EU se snaží v roce 2004 vzniklá European Myeloma Network ([www.eummne.org](http://www.eummne.org)). Jednou z klíčových aktivit pro akceleraci výzkumu v daném regionu se ukazuje přítomnost silného technologicky špičkově vybaveného centra, které své vědecké úsilí zaměřuje cíleně na tuto problematiku.

Česká myelomová skupina (CMG, [www.myeloma.cz](http://www.myeloma.cz)) byla založena v roce 1996 a dlouhodobě v regionu koordinuje klinické aktivity v oblasti monoklonálních gamapatií. V roce 2001 byla posílena o Nadační fond CMG, který svoji činnost zaměřuje na problematiku pacientů a rovněž podporu výzkumu. K posílení významu přispělo i založení Klubu pacientů s mnohočetným myelomem v roce 2005. V té době vznikl rovněž plán pro zvýšení konkurenceschopnosti CMG v rámci EU. Jeho hlavním cílem bylo vybudovat významné nadregionální vědecké pracoviště zajišťující akceleraci a integraci výzkumu mnohočetného myelomu v centrální Evropě, jež se zaměří na řešení klíčových otázek z oblasti cytogenetiky, genomiky, proteomiky, mikroprostředí myelomu a angiogeneze v oblasti monoklonálních gamapatií. Deset let systematické výzkumné a organizační práce vedlo v roce 2008 ke vzniku nadregionálního centra pro výzkum monoklonálních gamapatií v Brně (viz. Tabulka č.1). Nejprve bylo založeno v roce 2006 Centrum základního výzkumu pro monoklonální gamapatie a mnohočetný myelom v Brně díky pozitivnímu přístupu a za podpory projektem LC06027 MŠMT. Nový název pracoviště Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina (URC-CMG) byl schválen 1.1.2008 vedením a akademickým senátem LF MU Brno. Změnu názvu centra odsouhlasilo také MŠMT.

Prostřednictvím supplementa Klinické onkologie vám jej můžeme poprvé představit včetně rozsahu výzkumného záběru. Poděkování patří i spřáteleným pracovištím v ČR, jejichž pracovníci se na přípravě supplementa podíleli.

Preklinický výzkum byl původně zaměřen na imunoterapii a vývoj protinádorových vakcín (1998-2002). Mnohem komplexnější výzkum odstartoval v roce 2002 a vedl ke vzniku Centra základního výzkumu pro MGUS a MM v Brně (2006). Mezi iniciátory založení výzkumného centra patří výzkumná skupina LEHABI FN Brno prof. Hájka a prof. Michálka ve spolupráci s týmem laboratoře molekulární cytogenetiky, který vede doc. Kuglík. Po dlouhodobé kvalitní spolupráci se k centru přidružila i skupina laboratoře molekulární cytologie a cytometrie v čele s RNDr. Bártovou. Všechny týmy účastníci se projektu jsou aktivně zapojeny do výzkumu v oblasti mnohočetného myelomu a monoklonálních gamapatií. Základnu pro spolupráci s klinickými týmy představuje vytvořená myelomová banka vzorků na Oddělení klinické hematologie ve FN Brno, ve které dochází ke vstupnímu zpracování materiálu od nemocných z brněnského pracoviště (Interní hematologická klinika FN a LF Brno), ale také z řady center v ČR, SR, z Polska a Maďarska. Na vstupní zpracování materiálu navazuje molekulárně-biologické, proteomické, angiogenetické a imunologické vyhodnocování v rámci výzkumných projektů. V současné době tvoří tým 46 pracovní-

ků, který pracuje na 9 aktivních projektech (6 grantů a 3 výzkumná centra) s ročním rozpočtem 15 mil. Kč. V řadě projektů již došlo ke spolupráci s výzkumnými centry v EU a USA. V rozsáhlých a reprezentativních prostorách ILBIT (Integrovaných laboratořích biomedicínských technologií), kde naše centrum sídlí, došlo k mimořádné koncentraci nezbytných technologií. Výjimečnou záležitostí jsou čisté prostory pro výrobu vakcín, schválené Státním ústavem pro výrobu léčiv. Z dlouhodobých grantových projektů byly zakoupeny esenciální nástroje výzkumu a vybaveny laboratoře (FACS Aria sorter buněk, real-time PCR, inkubátory a přístroje pro kultivace buněk, špičkové mikroskopické vybavení, mrazicí boxy ad.). Snahou je koordinace výzkumných aktivit v oblasti centrální Evropy, odkud je díky návaznosti na klinické programy u mnohočetného myelomu v rámci aktivit České myelomové skupiny zajištěn přísun dostatečného množství výzkumného materiálu. Centrum tak využívá mimořádných odborných, personálních, prostorových a organizačních podmínek vzniklých v Brně a v regionu centrální Evropy na začátku nového tisíciletí.

Vzniklé URC-CMG je dlouhodoběji zapojeno do společného mezinárodního výzkumu v oblasti mnohočetného myelomu v rámci několika projektů, zvláště pak v rámci European Myeloma Network EMN). Lze zdůraznit společné projekty s AKH Vienna v oblasti standardizace FISH a cytogenetiky, standardizace flowcytometrie v rámci EMN, projektů imunoterapie v rámci 6 RP a projektů myelomu v rámci International Myeloma Foundation (například projektů „Bank on a Cure“). Pracovníci centra jsou již několik let aktivní v procesu standardizace metodik pro výzkumné projekty tak, aby byla umožněna plná koordinace a kompatibilita v rámci EU a v rámci centrální Evropy.

**Základní údaje o URC-CMG:**

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, ILBIT

Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina

Kamenice 5/A3

625 00 Brno

tel.: +420 549 494 129

**Pracoviště URC-CMG:**

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity (LF MU)

Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie (LEHABI) OKH FN Brno

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie (UCBI) LF MU

Laboratoř molekulární cytogenetiky pro MM a MGUS (LMC)

PřF MU

1998	Založení Laboratoře experimentální hematologie a buněčné imunoterapie (LEHABI) na OKH FN Brno
2003	První aplikace protinádorové vakcíny
2004	Založení banky vzorků a databáze Myelab
2005	Nové prostory v Univerzitním kampusu-ILBIT
2006	Založení Centra základního výzkumu pro monoklonální gamapatie a mnohočetný myelom
2008	Přejmenování výzkumné skupiny na „Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina“

Tabulka 1: Historie výzkumu mnohočetného myelomu v Brně

## z á v ě r



Univerzitní Kampus MU Brno Foto: A PLUS a. s., generální proj.



Vchod do Čistých prostor



Array system 2100 Bioanalyser od firmy Agilent



Laboratoř FISH



AutoMACS



LEHABI



BD FACSCanto II