

Plymouth Hospitals NHS Trust, DCL – Haematology, Derriford Hospital,
Plymouth, UK

ARCHIE PRENTICE

*Zaburzenia funkcji układu immunologicznego w przebiegu
przewlekłej białaczki limfocytowej B–komórkowej (B–PBL)*

Abnormal immune function in B–Cell Chronic Lymphocytic Leukemia

W przewlekłej białaczce limfocytowej B–komórkowej obserwujemy interesującą paradoks — zdolność przeżycia nowotworowych komórek B wśród pozostałych komórek układu immunologicznego, które powinny rozpoznawać i eliminować komórki nowotworowe. Niekontrolowana proliferacja w B–PBL może świadczyć o istnieniu w komórkach białaczkowych unikalnych mechanizmów pozwalających na ich przeżycie, o nieprawidłowościach „normalnych” elementów układu immunologicznego, o zaburzonej komunikacji pomiędzy prawidłowymi i nowotworowymi komórkami lub też o wspólnym występowaniu tych nieprawidłowości.

Przedstawione poniżej wyniki naszych badań, stanowią próbę wyjaśnienia tych problemów.

Interleukina 4 (IL–4) hamuje *in vitro* apoptozę nowotworowych komórek B poprzez antyapoptotyczną proteinę BCL–2. Efekt ten zależy jednak od dawki IL–4 i jest blokowany przez specyficzne przeciwciała. Większość białaczkowych komórek B i limfocytów T pacjentów z białaczką wykazuje ekspresję wewnątrzkomórkowej IL–4, natomiast zmniejszoną ekspresję receptora dla IL–4 (IL–4R) obserwuje się na limfocytach T. Po stymulacji PHA i PWM białaczkowych komórek B w hodowlach komórkowych nie obserwuje się wyższego poziomu IL–4 w supernatancie w porównaniu z hodowlą zdrowych komórek. Tak więc komórki B–PBL mogą przeżywać dzięki endogennej produkcji i szybkiego wykorzystywania własnej IL–4.

U pacjentów z B–PBL obserwuje się zmniejszoną ekspresję m–RNA dla *spliced variant* IL–4 delta 2, natomiast większą ekspresję *wild-type* lub kompletnego IL–4 m–RNA zarówno w limfocytach B jak i T. Ekspresja m–RNA dla łańcucha alfa IL–4 oraz receptora jest zbliżona do kontroli. *Spliced variants* są naturalnymi inhibitorami produkcji i funkcji *wild-types*. Sugeruje to, że brak *spliced variants* w B–PBL pozwala na antyapoptotyczną aktywność IL–4 bez wzrostu ekspresji IL–4R.

Wstępne wyniki sugerują, że antysensowne m-RNA dla IL-4 może odwrócić jej działanie antyapoptotyczne.

W prawidłowych limfocytach T pacjentów z B-PBL występuje znacząca redukcja ekspresji markerów aktywacji/interakcji HLA-Dr, CD4, CD-5, CD-11a, CD-25, CD-28, CD-152 (CTLA-4). Ekspresja CD-154 jest prawidłowa, a jej zmniejszenie opisywane przez Cantwell'a i Kipps'a okazało się technicznym artefaktem. Ujemna regulacja CD-152 jest bardziej istotna, ponieważ zablokowanie tego markera uniemożliwia zakończenie reakcji immunologicznej. Permabilizacja i OKT-3 stymulacja prawidłowych limfocytów T chorych z B-PBL pokazuje, że mogą one produkować CD-25 i CD-152 na poziomie porównywalnym z kontrolą, ale nie wykazują ich ekspresji zewnętrznej. Podobna jest ekspresja CD28. Hodowle limfocytów T osób zdrowych wykazują znaczący spadek ekspresji CD-25 i CD-152, natomiast nie jest zmieniona ekspresja CD-28. Rezultaty te wskazują na istnienie zewnętrznych czynników wpływających na zdolność limfocytów T do prawidłowej odpowiedzi immunologicznej.

Komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów pacjentów z białaczką mogą być pobudzone przez lizat z białaczkowych komórek B i hodowane z autologicznymi komórkami T. Takie komórki T będą wówczas proliferować, produkować interferon gamma i lizować autologiczne nowotworowe komórki B w większym stopniu niż w jakimkolwiek podobnym nieautologicznym układzie. Cytolityczne działanie nie występuje przeciwko autologicznym nieuważliwionym limfocytom T ani prawidłowym limfocytom T i B. Nie występuje również odpowiedź proliferacyjna, sekrecyjna i cytolityczna w przypadku prawidłowych komórek dendrytycznych ani w przypadku allogenicznym białaczkowych limfocytów B. Eksperymenty z fenotypowaniem i blokowaniem przeciwciałami potwierdzają, że efekt cytolityczny jest zależny od klasy II i przebiega przez komórki CD4. Tak więc pomimo nieprawidłowości limfocytów T i B opisanych powyżej możliwe jest indukowanie wysoko specyficznej odpowiedzi immunologicznej w układzie autologicznym. Wydaje się jasne ze wstępnej analizy lizatów komórek B, że istnieją duże różnice w zawartości protein pomiędzy prawidłowymi i nowotworowymi komórkami, co będzie wymagało dalszych badań.

Będziemy kontynuować badania nad wszystkimi trzema aspektami działania układu immunologicznego w B-PBL z nadzieją, że czynna immunoterapia może stanowić efektywną alternatywę dla form terapii konwencjonalnej, które mają ograniczoną wartość i często zawodzą w tej chorobie.

ABNORMAL IMMUNE FUNCTION IN B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

There is challenging paradox in the survival of malignant B cells in the midst of an immune system, which might be expected to recognise and eliminate them. The uncontrolled proliferation of CLL implies that the malignant cells may have unique survival mechanisms, that there are intrinsic abnormalities of the normal cellular components of the immune system, that communication between the malignant and the

normal cells is dysfunctional or that there is a combination of all these factors. Our research programme has addressed these areas with the following findings.

The cytokine interleukin 4 (IL-4) protects malignant B-cells *in vitro* from apoptosis by up-regulation of the onco-protein bcl-2. This effect is not uniform or absolute, is IL-4 dose dependent and is blocked by specific antibody. Significantly more B-CLL and normal T cells from the same patients contain intracytoplasmic IL-4 and there is increased expression of the IL-4 receptor (IL-4R) in the T cells but not in the B-CLL cells. PHA and PWM stimulation of cell cultures does not result in release of higher levels of IL-4 into the culture supernatant of B-CLL cells compared to normal cells. Therefore the B-CLL cell may survive by endogenous production and rapid utilization of its own IL-4. There is less spliced variant IL-4 delta 2 m.-RNA expression but more wild-type (WT) or complete IL-4 m.-RNA expression in both B and T cells from patients with B-CLL. The IL-4R alpha chain m.-RNA and receptor expression are equal in all. Splice variant production of cytokines is site-specific and may determine cell function by site. Spliced variants are natural inhibitors of WT production and function. This suggests the absence of spliced variant in the CLL setting permits unopposed antiapoptotic activity of IL-4 without increased IL-4R expression.

Preliminary results suggest that IL-4 m.-RNA anti-sense may reverse this antiapoptotic effect.

In the normal T cells of CLL patients there is marked reduction of expression of the key activation/interaction markers HLA-DR, CD4, CD5, CD11a, CD25, CD28 and CD152 (CTLA-4).

The expression of CD154 is normal and the reduced expression described by Cantwell and Kipps is a technical artefact. The down regulation of CD152 knock-out mice exhibit a condition clinically very similar to B-CLL. Permeabilisation and OKT-3 stimulation of CLL normal T cells shows that they can produce CD25 and CD152 at levels similar to T cells from normal controls but they are not expressed externally. CD28 expression is not affected by this manoeuvre. Culture of T cells from normal controls in the serum from AB CLL patients result in a marked increase in CD25 and CD152 expression but no change in CD28 expression. These results imply some CLL extrinsic influence on the T cell on the T cells' capability of completing an immune response.

Dendritic cells (DC) derived from the monocytes of these patients can be pulsed with lysate from the malignant B cells and co-cultured with their autologous T cells. These T cells will then proliferate, secrete gamma-interferon and lyse autologous malignant B cells to a greater degree than in any other non-autologous, similar system. There is no cytotoxic activity against autologous non-sensitised T cells, normal B cells or normal T cells. There is no proliferate, secretory or cytotoxic response if normals' DCs are used nor if the malignant B-cells lysate is allogenic. Antibody blocking and phenotyping experiments confirm that the cytotoxic effect is class II restricted through Cd4 cells. So despite the properties of B and T cell abnormalities described above it is possible to induce an highly specific anti-tumour immune response in an autologous sys-

tem. It is clear from preliminary analysis of the B-cell lysates that there are gross differences in protein content between normal and malignant cells which require further investigation.

We continue to investigate all three aspects of the immune system in B-CLL in the hope that adoptive immunotherapy can be refined to a point where it offers an effective alternative to conventional therapies, all of which are of limited value and eventually fail in this disease.