

Aktywność proteasomu 20S w osoczu pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym

Plasma proteasome 20S activity in patients with newly diagnosed multiple myeloma

Agnieszka Kostur¹, Halina Ostrowska², Agnieszka Kulczyńska¹, Marzenna Galar¹, Janusz Kłoczko¹

STRESZCZENIE

Celem pracy było określenie przydatności oznaczania aktywności ChT-L proteasomu 20S u pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym (MM). Materiał do badań stanowiło osocze 41 pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym. Aktywność ChT-L proteasomu 20S oznaczano przy użyciu fluorogennego substratu Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC w obecności SDS jako selektywnego aktywatora enzymu chymotrypsynopodobnego. Przeprowadzone badania wykazały podwyższoną aktywność ChT-L proteasomu 20S u pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych (mediana 1,24 U/mg; zakres 0,67–3,61 U/mg vs mediana 1,09 U/mg; zakres 0,67–1,62 U/mg). Znamienne wyższą aktywność ChT-L proteasomu 20S wykazano u pacjentów z III stopniem zaawansowania choroby wg ISS (mediana 1,25 U/mg; $p=0,048$). Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a stężeniem β_2 -mikroglobuliny ($p=0,007$). Aktywność ChT-L proteasomu 20S nie zależała od płci i wieku pacjentów. Uzyskane wyniki badań wskazują na przydatność oznaczania aktywności proteasomu 20S w osoczu pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym jako wskaźnika przydatnego w ocenie rokowania przebiegu choroby.

Słowa kluczowe: szpiczak plazmocytowy, aktywność proteasomu 20S

SUMMARY

The purpose of the study is to determine the 20S proteasome ChT-L activity in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM). The 20S proteasome ChT-L activity was assayed using the fluorogenic peptide substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in the presence of an artificial activator sodium dodecyl sulfate (SDS) in the plasma of healthy donors ($n=20$) and MM patients ($n=41$). The 20S proteasome ChT-L activity was higher in the plasma of MM patients at the diagnosis than in healthy subjects (median 1.24 U/mg; range 0.67–3.61 U/mg vs median 1.09 U/mg; range 0.67–1.62 U/mg). The highest 20S proteasome ChT-L activity was observed at 3rd ISS score and the difference was statistically significant (median 1.25 U/mg vs median 1.09 U/mg; $p=0.048$). Statistically significant correlations was found between 20S plasma ChT-L activity and β_2 -microglobulin level ($p=0.007$) as well as between 20S plasma ChT-L activity and creatinine concentration ($p=0.019$). The plasma 20S proteasome ChT-L activity did not correlate with age and did not depend on the gender of the patients. The results of the study point to usefulness of the 20S proteasome ChT-L activity measurement as a prognostic factor in MM patients.

Keywords: Multiple myeloma, Proteasome 20S activity

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 11.04.2012
Zaakceptowano: 15.04.2012

¹ Klinika Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyni
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik: Prof. dr hab. Janusz Kłoczko
² Zakład Biologii Uniwersytetu Medycznego
w Białymstoku
Kierownik: Prof. dr hab. Halina Ostrowska

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:
Mgr Agnieszka Kostur
Klinika Hematologii USK w Białymstoku
ul. M. Curie-Skłodowskiej 24A
15-276 Białystok
tel. 85 7468603
e-mail: agnieszkakostur@wp.pl

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki
i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy
nr N N402 681640 oraz w ramach pracy badawczej
nr 114-52931L finansowanej przez Uniwersytet
Medyczny w Białymstoku.

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (2a): 155–159

Wstęp

System proteasomalny odpowiada za selektywną degradację białek zaangażowanych w podstawowe procesy komórkowe. Proteasomy degradują m. in. białka

regulujące cykl komórkowy, apoptozę, ekspresję genów, a także białka biorące udział w rozwoju komórek w tym endogenny inhibitor czynnika jądrowego – $\kappa B/NF-\kappa B$, I κB . Degradacja I κB prowadzi do ak-

tywacji czynnika jądrowego NF- κ B, który zwiększa transkrypcję białek odpowiedzialnych za przeżycie plazmocytów, ich wzrost, migrację, przyleganie do podścieliska szpiku oraz oporność na chemioterapię [1, 2].

Rozróżniamy dwa rodzaje proteasomów: 20S i 26S. Kompleks proteasomowy 26S składa się z baryłkowanego rdzenia o stałej sedymentacji 20S oraz dwóch regulatorowych kompleksów 19S zlokalizowanych na obu końcach rdzenia. Proteasom 20S zbudowany jest z 28 podjednostek, tworzących 2 pierścienie zewnętrzne α i dwa pierścienie wewnętrzne β [3]. Jedynie podjednostki β są enzymami proteolitycznymi i wykazują odpowiednio: aktywność chymotrypsynopodobną (podjednostka β 5), trypsynopodobną (podjednostka β 2) i kaspazopodobną (podjednostka β 1) [1].

Badania ostatnich lat potwierdzają znaczącą rolę proteasomów w patogenezie wielu chorób układu krwiotwórczego [4]. W osoczu osób zdrowych występują one w niewielkim stężeniu. W przebiegu nowotworów złośliwych dochodzi do wzrostu ich stężenia w wyniku uwolnienia do krążenia, najprawdopodobniej na drodze sekrecji bądź w wyniku rozpadu komórek nowotworowych. Podwyższone stężenia krążących proteasomów wykazano u chorych na szpiczaka plazmocytozy [5], ostre białaczki [6], czerniaka złośliwego [7] oraz u pacjentów z różnymi guzami litymi [8, 9]. Stężenia krążących proteasomów oznaczane są najczęściej metodami immunoenzymatycznymi [10].

Istnieje możliwość oznaczania krążących proteasomów poprzez pomiar aktywności chymotrypsynopodobnej (ChT-L) podjednostki β 5 w obecności SDS – selektywnego aktywatora proteasomu 20S [11]. Enzym ten jest główną proteazą odpowiedzialną za wewnątrzkomórkową degradację białek. Jego zablokowanie skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego i wywołaniem apoptozy zarówno w komórkach prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo [12]. Wzrost aktywności proteasomów obserwowano u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną i szpikową [13–15], przewlekłą białaczkę limfocytową [11] i zespół mielodysplastyczny [14].

Celem pracy była ocena aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 20S w osoczu chorych z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytozy.

Materiał i metody

Badaniem objęto 41 pacjentów z nowo rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytozy (22 kobiety, 19 mężczyzn; mediana 69 lat, zakres 36–87 lat) zakwalifikowanych do leczenia chemioterapeutycznego w Klinice Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyń

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej

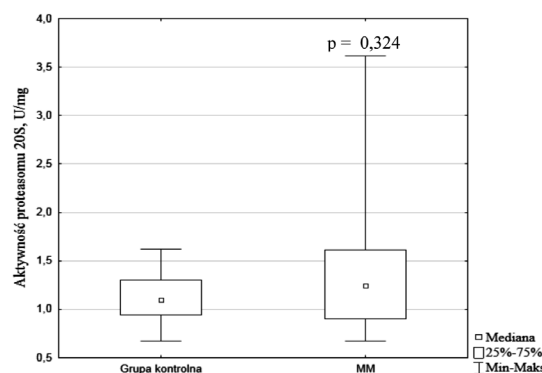
Table I. Characteristics of the patients group

Oceniane parametry	MM (n=41) Mediana (zakres)
Płeć (K/M)	22/19
Wiek (lata)	69 (36–87)
Odsetek plazmocytów w szpiku kostnym (%)	29 (10,2–96,4)
Albumina (g/dl)	3,28 (2,09–4,82)
β_2 -mikroglobulina (mg/L)	5,62 (1,08–22,35)
Białko monoklonalne w surowicy (g/dl)	2,80 (0,02–9,23)
Kreatynina (mg/dl)	1,18 (0,41–6,51)
LDH (IU/L)	214 (108–626)

Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Rozpoznanie MM ustalono na podstawie kryteriów International Myeloma Working Group [16]. Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy w zależności od klasyfikacji prognostycznej ISS (*International Staging System*). W grupie I znalazło się 8 osób, w II – 12, natomiast w III – 21. Grupę porównawczą stanowiło 20 zdrowych ochotników (11 kobiet, 9 mężczyzn; mediana 73 lat, zakres 51–89 lat). Charakterystykę grupy badanej przedstawia tabela I.

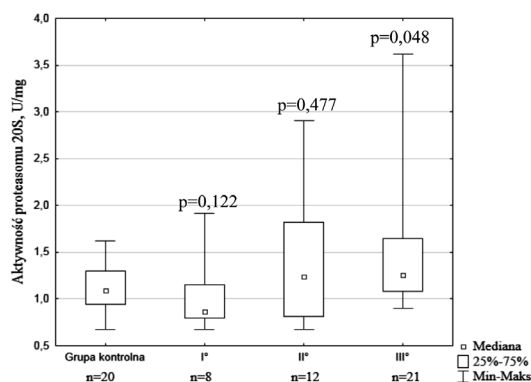
Materiał do badań stanowiło osocze cytrynianowe. Krew pobierano na 3,8% cytrynian sodu i wirowano przy 1500 g przez 15 minut. Uzyskane osocze natychmiast zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania oznaczeń. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Chymotrypsynopodobną aktywność (ChT-L) proteasomu 20S oznaczano w osoczu przy użyciu flu-



Ryc. 1. Aktywność ChT-L proteasomu 20S w grupie kontrolnej i u pacjentów z nowo rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytozy (MM)

Fig. 1. Plasma 20S proteasome chymotrypsin-like (ChT-L) activity in healthy subject and in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM)



Ryc. 2. Aktywność ChT-L proteasomu 20S u pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym (n=41) w zależności od klasyfikacji prognostycznej ISS (International Staging System)

Fig. 2. Plasma 20S proteasome chymotrypsin-like (ChT-L) activity in patients with newly diagnosed multiple myeloma (n=41) depending on ISS score

orogennego substratu Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (100 μ M) w obecności SDS (sól sodowa siarczanu dodecylu) jako selektywnego aktywatora enzymu. Badane osocza aktywowano 10% SDS, a następnie po 15-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej nanoszono na płytkę titracyjną zawierającą bufor (0,05% SDS w 100 mM Tris/HCl o pH 7,5) oraz substrat (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). W celu potwierdzenia, że za hydrolizę substratu był odpowiedzialny proteasom 20S, osocza preinkubowano z inhibitorem proteasomu 20S – epoksymycyną [11].

Do pomiaru uwolnionego barwnika – 7-amino-4-metylokumaryny (AMC) ($E_x=355$ nm, $E_m=460$ nm, czas pomiaru 60 minut w temperaturze 37°C) użyto

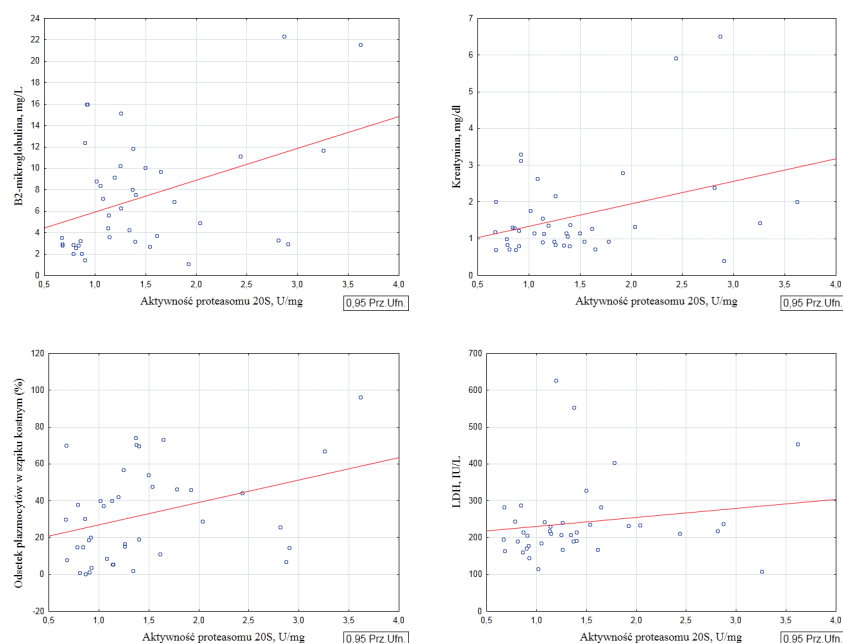
czytnika mikroplętek FLUOstar OPTIMA. Ilość uwolnionego AMC odczytano z wykresu kalibracyjnego sporządzonego na wzorcowych roztworach tego związku. Za jednostkę aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 20S przyjęto 1 pmol AMC uwolniony w ciągu 1 minuty (pmol/min=U). Wszystkie oznaczenia wykonano w tripletach. Stężenie białka w badanych osoczach oznaczono metodą Bradforda przy użyciu odczynnika Bio-Rad w aparacie Biofotometr (Eppendorf). Badania te wykonano w Zakładzie Biologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Analiza statystyczna

Rozkład grupy badanej oceniano testem Shapiro-Wilka. Dalszą analizę wyników przeprowadzono z użyciem testów nieparametrycznych. Za poziom istotności przyjęto $p<0,05$.

Wyniki

Aktywność ChT-L proteasomu 20S w osoczach pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym była wyższa (mediana 1,24 U/mg, zakres 0,67–3,61 U/mg) w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych (mediana 1,09 U/mg, zakres 0,67–1,62 U/mg), jednak różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,324$) (Ryc. 1). Znamiennej wyższą aktywność ChT-L proteasomu 20S obserwowano u pacjentów z III stopniem zaawansowania choroby wg ISS (mediana 1,25 U/mg, zakres 0,89–3,61 U/mg; $p=0,048$) (Ryc. 2). Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a stężeniami: β_2 -mikroglobuliny ($R=0,411$; $p=0,007$) i kre-



Ryc. 3. Zależność pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a wybranymi parametrami klinicznymi MM: stężeniami β_2 mikroglobuliny ($R=0,411$; $p=0,007$), kreatyniny ($R=0,363$; $p=0,019$), odsetkiem plazmacytów w szpiku ($R=0,356$; $p=0,222$) oraz aktywnością dehydrogenazy mleczanowej (LDH) ($R=0,165$; $p=0,314$)

Fig. 3. Correlation between 20S proteasome chymotrypsin-like (ChT-L) activity and MM clinical parameters: β_2 microglobulin level ($R=0,411$; $p=0,007$), creatinine level ($R=0,363$; $p=0,019$), clonal bone marrow plasma cells ($R=0,356$; $p=0,222$) and serum lactic dehydrogenase activity (LDH) ($R=0,165$; $p=0,314$)

atyniny ($R=0,363$; $p=0,019$) oraz odsetkiem plazmacytów w szpiku ($R=0,356$; $p=0,222$). Słabą korelację wykazano pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a aktywnością dehydrogenazy mleczanowej (LDH) ($R=0,165$; $p=0,314$), natomiast słabą ujemną pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a stężeniem albuminy ($R= -0,282$; $p=0,072$) (Ryc. 3). Aktywność ChT-L proteasomu 20S nie korelowała ze stężeniem białka monoklonalnego w surowicy ($R= -0,094$; $p=0,594$), a także nie zależała od płci i wieku pacjentów.

Omówienie

Wzrost ekspresji i aktywności proteasomów w komórkach nowotworowych przyczynia się do zwiększonej degradacji białek kontrolujących cykl komórkowy i apoptozę, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu komórek nowotworowych i ich oporności na chemioterapię. Podejmowane są próby wykorzystania pomiaru stężeń krążących proteasomów do oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej oraz odpowiedzi na leczenie. Zwiększone stężenie proteasomów w osoczu najprawdopodobniej związane jest z ich uwalnianiem do krążenia na drodze sekrecji bądź w wyniku rozpadu komórek nowotworowych. Sugeruje się, iż w nowotworach o dużej dynamice, w tym szpiczaku plazmacytowym, pomiar krążących proteasomów może być wykorzystany do diagnostyki i oceny stopnia zaawansowania choroby [5].

W dostępnej literaturze brak jest doniesień dotyczących pomiarów aktywności ChT-L proteasomu 20S w osoczu chorych na szpiczaka plazmacytowego. Ma i wsp. obserwowali znaczny wzrost aktywności ChT-L proteasomu w osoczach pacjentów z ostrą białaczką szpiczkową, przewlekłą białaczką limfocytową oraz zespołem mielodysplastycznym (MDS) [11, 14]. U osób z przewlekłą białaczką limfocytową aktywność ChT-L proteasomu 20S korelowała ze stopniem zaawansowania choroby, wg klasyfikacji Rai, oraz stężeniem β_2 -mikroglobuliny [11].

Nasze badania wykazały podwyższoną aktywność ChT-L proteasomu 20S w osoczach chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmacytowym. U pacjentów z I oraz II stopniem zaawansowania, wg ISS, aktywność ChT-L proteasomu 20S nie różniła się w sposób istotny statystycznie od wartości stwierdzonych w grupie osób zdrowych, podczas gdy u chorych z III stopniem była znamienne wyższa ($p=0,048$). Podobne obserwacje poczynili Hempel i wsp. U chorych we wczesnych stadiach zaawansowania raka jelita grubego, żołądka oraz piersi (stadium I/II) nie obserwowali istotnych zmian aktywności ChT-L proteasomu 20S, natomiast u osób w zaawansowanym stadium choroby (stadium III/

IV) wartości aktywności ChT-L proteasomu 20S były znacznie wyższe [17].

Stwierdziliśmy istnienie korelacji pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S w osoczu a stężeniem β_2 -mikroglobuliny ($R=0,41$; $p=0,007$) oraz słabą dodatnią korelację pomiędzy aktywnością proteasomu 20S a aktywnością LDH – enzymu wskaźnikowego lizy komórek ($R=0,165$; $p=0,314$). Ostrowska i wsp. [13] uzyskali podobne wyniki u pacjentów z ostrą białaczką szpiczkową. Natomiast u chorych na ostrą białaczką limfoblastyczną i przewlekłą białaczkę limfocytową wartości współczynnika korelacji pomiędzy aktywnościami proteasomu 20S a LDH były znacznie wyższe.

Przeprowadzone badania wykazały istotną zależność pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a stężeniem kreatyniny ($R=0,363$; $p=0,019$). Wyniki te są zbieżne z rezultatami badań otrzymanymi przez Jacoba i wsp., którzy wykazali istnienie znamiennej korelacji pomiędzy stężeniami proteasomu, ocenianymi metodą ELISA, a stężeniem kreatyniny ($R=0,243$; $p=0,04$) [5].

Aktywność ChT-L proteasomu 20S korelowała dodatnio z odsetkiem plazmacytów w szpiku kostnym ($R=0,356$; $p=0,222$).

Uzyskane wyniki, w tym szczególnie istnienie znamiennej korelacji pomiędzy aktywnością ChT-L proteasomu 20S a β_2 -mikroglobuliną – uznanym czynnikiem prognostycznym MM, sugerują, iż ocena aktywności ChT-L proteasomu 20S w osoczu pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmacytowym może być przydatna w prognozowaniu przebiegu choroby. Powyższe wyniki wymagają potwierdzenia na większej grupie chorych.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*, 2003; 29: 3–9.
2. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.*, 2009; 30: 191–296.
3. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35: 12–17.
4. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 7071–75.
5. Jakob Ch, Egerer K, Liebisch P et al. Circulating proteasome levels are independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood*, 2007; 109: 2100–5.
6. Ma W, Kantarjian H, Zhang X et al. Ubiquitin-proteasome system profiling in acute leukemias and its clinical relevance. *Leukemia Res*, 2011; 35: 526–533.
7. Henry L, Lavabre-Bertrand T, Douche T et al. Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma. *Exp Dermatol*, 2010; 19: 1054–1059.

8. Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S et al. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer*, 2001; 92: 2493–2500.
9. Heubner M, Wimberger P, Dahlmann B et al. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2011; 120: 233–238.
10. Dutaud D, Aubry L, Henry L et al. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J Immunol Methods*, 2002; 260: 183–93.
11. Ma W, Kantarjian H, O'Brien S et al. Enzymatic activity of circulating proteasomes correlates with clinical behavior in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2008; 112: 1306–12.
12. Kisslev AF, Goldberg AL. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptides substrates. *Methods Enzymol*, 2005; 398: 364–378.
13. Ostrowska H, Hempel D, Holub M, Sokołowski J, Kloczko J. Assessment of circulating proteasome chymotrypsin-like activity in plasma of patients with acute and chronic leukemia. *Clin Biochem*, 2008; 41: 1377–1383.
14. Ma W, Kantarjian H, Bekele B, Donahue AC, et al. Proteasome enzymatic activities in plasma as risk stratification of patients with acute myeloid leukemia and advanced-stage myelodysplastic syndrome. *Clin Cancer Res*, 2009; 15 (11): 3820–26.
15. Krawczuk-Rybak M, Leszczynska E, Malinowska I, Matysiak M, Ostrowska H. Proteasome chymotrypsin-like activity in plasma as a useful marker for children with acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(1): 67–72.
16. The 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.
17. Hempel D, Wojtukiewicz M, Kozłowski L, Romatowski J, Ostrowska H. Increased plasma proteasome chymotrypsin-like activity in patients with advanced solid tumors. *Tumor Biol*, 2011; 32: 753–759.