

APLIKACE PROTEOMIKY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

APPLICATIONS OF PROTEOMICS IN MULTIPLE MYELOMA

POTÁČOVÁ A.¹, ČUMOVÁ J.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,2,3}

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

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, OKH (LEHABI), FN BRNO, PMDV

³ 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 neobtížnější. Jsou mimořádně metodicky náročné. Doposud lze ve světové odborné literatuře nalézt jen ojedinělé práce z oblasti proteomiky zaměřené na mnohočetný myelom (MM) a monoklonální gamopatie 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 α , 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- κ B (NF- κ 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

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- κ 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), γ 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 α -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.