

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
Wydział Lekarski

Joanna Tisończyk

**Charakterystyka molekularnych form
łańcuchów lekkich immunoglobulin
w moczu pacjentów z gammopatią
monoklonalną.**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Ryszard Drożdż

Praca wykonana w Zakładzie Diagnostyki Medycznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Zakładu: dr hab. Ryszard Drożdż

Kraków 2014

*Dziękuję mojemu Promotorowi,
Panu Dr. hab. Ryszardowi Drożdżowi za wsparcie merytoryczne
podczas wykonywania pracy i cierpliwość w chwilach zniechęcenia.*

*Pragnę również podziękować mojej Koleżance
z Zakładu Diagnostyki Medycznej,
Pani Doktor Paulinie Dumnickiej
za pomoc w rozwiązywaniu problemów pojawiających się w trakcie
realizacji pracy oraz jej korektę.*

*Dziękuję także Panu Profesorowi dr hab. Jerzemu W. Naskalskiemu
za życzliwe zaangażowanie oraz cenne uwagi i sugestie.*

*Nie do przecenienia jest wsparcie i wiara we mnie okazana przez
moich Bliskich - Rodzinę i Przyjaciół –
dziękuję Wam.*

Spis treści

| | |
|--|----|
| Alfabetyczny wykaz skrótów i pojęć | 4 |
| 1 Wstęp..... | 6 |
| 1.1 Historia odkrycia łańcuchów lekkich..... | 6 |
| 1.2 Immunoglobuliny – budowa łańcuchów lekkich. | 8 |
| 1.2.1 Źródła różnorodności łańcuchów lekkich immunoglobulin. | 8 |
| 1.2.2 Podtypy łańcuchów lekkich. | 12 |
| 1.3 Łańcuchy lekkie – synteza, metabolizm i znaczenie fizjologiczne. | 13 |
| 1.3.1 Synteza i wydzielanie łańcuchów lekkich immunoglobulin poza komórki plazmatyczne..... | 13 |
| 1.3.2 Usuwanie wolnych łańcuchów lekkich w organizmie człowieka..... | 15 |
| 1.3.3 Znaczenie łańcuchów lekkich immunoglobulin..... | 16 |
| 1.4 Rola łańcuchów lekkich immunoglobulin w procesach chorobotwórczych – gammapatie monoklonalne..... | 18 |
| 1.4.1 Nefropatia wałeczkowa. | 19 |
| 1.4.2 Zespół Fanconiego..... | 20 |
| 1.4.3 AL amyloidoza..... | 22 |
| 1.4.4 Choroba depozytów białkowych z łańcuchów lekkich (LCDD)..... | 27 |
| 1.4.5 Czynniki wpływające na tworzenie się depozytów łańcuchów lekkich immunoglobulin. | 30 |
| 1.5 Oznaczanie łańcuchów lekkich oraz wolnych łańcuchów lekkich (FLC) w diagnostyce laboratoryjnej. | 35 |
| 1.5.1 Gammapatie monoklonalne..... | 35 |
| 1.5.2 Inne jednostki chorobowe..... | 38 |
| 1.6 Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin..... | 40 |
| 2 Założenia i cel pracy. | 42 |
| 3 Pacjenci, materiały i metody. | 43 |
| 3.1 Charakterystyka grupy badanej..... | 43 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.2 | Materiały i metody. | 45 |
| 3.2.1 | Materiał badany. | 45 |
| 3.2.2 | Otrzymywanie liofilizowanych wolnych łańcuchów lekkich (FLC). | 45 |
| 3.2.3 | Elektroforeza wysokorozdzielcza (HRE)..... | 46 |
| 3.2.4 | SDS-PAGE elektroforeza. | 47 |
| 3.2.5 | Elektroforeza na żelach poliakrylamidowych bez dodatku SDS. | 48 |
| 3.2.6 | Oznaczanie typu łańcuchów lekkich..... | 48 |
| 3.2.7 | Oznaczanie stężenia łańcuchów lekkich..... | 48 |
| 3.2.8 | Wysokosprawna chromatografia wykluczenia (HPSEC)..... | 48 |
| 3.2.9 | Oznaczanie reszt tiolowych metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). | 51 |
| 3.2.10 | Ocena wartości odsetkowych dimeru oraz monomeru FLC..... | 51 |
| 3.2.11 | Metody statystyczne. | 51 |
| 4 | Wyniki..... | 53 |
| 4.1 | Różne formy molekularne wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu – monomery oraz kowalencyjne dimery. | 53 |
| 4.2 | Dynamika zmian profilu dimer/monomer w czasie..... | 58 |
| 4.3 | Analiza oligomerycznych form łańcuchów lekkich przy użyciu wysokosprawnej chromatografii wykluczenia (SE HPLC - size exclusion high performance liquid chromatography) | 65 |
| 4.4 | Zróżnicowanie mas cząsteczkowych monomeru oraz dimeru łańcuchów lekkich. .. | 70 |
| 4.5 | Oznaczanie reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi immunoglobulin. ... | 75 |
| 4.6 | Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin u pacjentów z gammopatią monoklonalną..... | 83 |
| 5 | Dyskusja..... | 99 |
| 5.1 | Monomery i kowalencyjne dimery wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. | 100 |
| 5.2 | Niekowalencyjne, oligomeryczne formy łańcuchów lekkich..... | 107 |
| 5.3 | Zróżnicowanie mas cząsteczkowych łańcuchów lekkich immunoglobulin. | 111 |
| 5.4 | Związki tiolowe sprzężone z łańcuchami lekkimi immunoglobulin..... | 114 |
| 5.5 | Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin..... | 123 |

| | | |
|---|--------------------|-----|
| 6 | Wnioski | 131 |
| 7 | Streszczenie | 132 |
| 8 | Summary..... | 134 |
| 9 | Piśmiennictwo..... | 136 |

Alfabetyczny wykaz skrótów i pojęć.

- AIDS** – (*acquired immune deficiency syndrome*); zespół nabytego niedoboru odporności
- AL** – amyloidoza łańcuchów lekkich immunoglobulin
- AOPP** – (*advanced oxidation protein products*); produkty zaawansowanej oksydacji białek
- Arg** – arginina
- Asp** – kwas asparaginowy
- ATTR** – amyloidoza transtyretynowa
- białko BJ** – białko Bence-Jonesa; wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin
- białko M** – monoklonalna immunoglobulina we krwi
- CDR** – (*complementarity-determining region*); region warunkujący dopasowanie
- CH** – część stała łańcucha ciężkiego przeciwciała
- CL** – część zmienna łańcucha lekkiego przeciwciała
- CMQT** – 2-chloro-1-metylkwinoolinium tetrafluoroborate
- Cys** – cysteina
- CysGly** – cysteinyloglicyna
- DTNB** – kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy); odczynnik Ellmana
- DTT** – ditiotreitól
- Ero 1** – (*ER oxidoreductin*); oksydoredukcyjna 1 retikulum endoplazmatycznego
- FLC** – (*free light chains*); wolne łańcuchy immunoglobulin
- fMLP** – formilo-metionilo-leucylo-feniloalanina
- FR** – (*framework region*) region zrębowy części zmiennej przeciwciała
- HLC** – (*heavy light chain*); łańcuch ciężki immunoglobulin
- HPLC** – (*High Performance Liquid Chromatography*); wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HPSEC** – (*high performance size exclusion chromatography*); wysokosprawna chromatografia wykluczenia
- HRE** – (*high resolution electrophoresis*); elektroforeza wysokorozdzielcza
- HV** – (*hypervariable*); region hiperzmienny części zmiennej przeciwciała
- IEF** – (*isoelectric focusing*); ogniskowanie izoelektryczne
- K_D** – stała dimeryzacji
- LC** – (*light chain*); łańcuch lekki
- LCDD** – (*light chain deposition disease*); choroba depozytów białkowych łańcuchów lekkich
- LCMM** – (*light chain multiple myeloma*); choroba łańcuchów lekkich immunoglobulin
- Leu** – leucyna
- MGUS** – (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*); gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu
- MOPSO** – sól sodowa kwasu 3-[N-morfolino]-2-hydroksypropanosulfonowego
- MS** – (*multiple sclerosis*); stwardnienie rozsiane
- MW** – (*molecular weight*); masa cząsteczkowa

NT-proBNP – N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B
PDI – (*protein disulphide isomerase*); białkowa izomeraza disiarczkowa
pI – punkt izoelektryczny
Pro – prolina
RE – retikulum endoplazmatyczne
SAP – (*serum amyloid P*); surowicze białko amyloidowe P
SDS – (*sodium dodecyl sulphate*); siarczan dodecyłu sodu
SDS-PAGE – (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*); elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyłu sodu
TCA – kwas trójchlorooctowy
TECEP – tris(2-carboxyetyl)fosfina
TGFβ – (*transforming growth factor beta*); transformujący czynnik wzrostu beta
THP – (*Tamm-Horsfall protein*); białko Tamma Horsfalla, uromukoid
VL – część zmienna łańcucha lekkiego przeciwciała
γGT – γ-glutamylotranspeptydaza

1 Wstęp

1.1 Historia odkrycia łańcuchów lekkich.

Odkrycie łańcuchów lekkich łączy się z historią szanowanego londyńskiego sprzedawcy Thomasa Alexandra McBean'a, który cierpiał na chorobę opisaną później jako „*mollities osseum*” – miękkość i kruchość kości [^{1,2}]. Jesienią 1845 stan pacjenta znacznie się pogorszył, stosowana do zredukowania bólu flebotomia przestała dawać oczekiwane rezultaty. Skłoniło to doktora Thomasa Watsona, lekarza prowadzącego pacjenta, do zasięgnięcia opinii innego specjalisty. Ów specjalista – przyjaciel doktora Watsona, lekarz londyńskiej przychodni Western General Dispensary, William MacIntyre – zauważył u swojego nowego pacjenta znaczne obrzęki. Zdecydował się więc na zbadanie moczu. Ku jego zaskoczeniu mocz, którego ciężar właściwy – jak odnotował – był znacznie podwyższony, nie zawierał cukrów. Badając próbkę pod kątem obecności albuminy internista odnotował nietypową reakcję na podwyższoną temperaturę – podczas podgrzewania próbka wykazywała znaczną opalescencję, która zniknęła po dodaniu kilku kropeł kwasu. Schłodzenie próbki skutkowało pojawieniem się kłaczkowatego osadu. Zaintrygowany swoim odkryciem lekarz wystąpił z próbką moczu pacjenta wraz z krótką notatką opisującą jego spostrzeżenia do St. George's Hospital.

Na tym etapie historii odkrycia łańcuchów lekkich pojawia się postać doktora Bence-Jonesa, zaledwie 31 - letniego, ale już cenionego patologa, który był odbiorcą przesyłki MacIntyry'a. Potwierdziwszy spostrzeżenia dokonane przez MacIntyry'a, dr Bence-Jones opisał i opublikował w roku 1847 swoje wyniki. Niespotykaną reakcję próbki moczu na działanie temperatury przypisał on obecności nietypowej formy albuminy [³]. Kierując się niezwykłą lekarską intuicją i opierając na wynikach dalszych badań, sir H. Bence-Jones zasugerował jako pierwszy rolę jaką niedawno odkryta nietypowa forma albuminy miałaby odgrywać w diagnostyce pacjentów, u których obserwowano bóle kości i liczne złamania. Obecnie niewielu osobom jest znana postać MacIntyry'a, natomiast sir H. Bence-Jones na trwałe zapisał się na kartach historii. Na cześć tego badacza łańcuchy lekkie immunoglobulin wydzielane do moczu chorych na szpiczaka mnogiego zostały nazwane białkiem Bence-Jonesa.

W 1873 roku dr Von Rustizky podczas autopsji zwłok pacjenta, którego historia choroby przypominała opisany przez Bence-Jonesa przypadek McBean'a, zauważył kilka guzów zlokalizowanych w szpiku kostnym. To właśnie ten rosyjski lekarz zaproponował nazwę szpiczak mnogi. Białko Bence-Jonesa oraz szpiczak mnogi cieszyły się ogromnym zainteresowaniem w świecie lekarzy oraz naukowców. W czasopismach medycznych pojawiało się coraz więcej artykułów poruszających ten temat.

Ogromne postępy na polu diagnostyki laboratoryjnej przyniosło opracowanie przez Tiseliusa elektroforezy białek. Już w pierwszych rozdzielaczach elektroforetycznych białek surowicy we frakcji gamma odkryto dodatkowe ostre frakcje przypominające wieże

kościelne. Modyfikacja klasycznej elektroforezy agarozowej przez Grabara i Williamsa, która zaowocowała powstaniem nowej techniki zwanej immunoelektroforezą, stały się kamieniem milowym dla badań nad białkiem Bence-Jonesa [2]. W roku 1956 dwaj badacze – Korngold i Lipari prowadząc badania nad moczem chorych, u których wykazano obecność „nietypowej albuminy” wyodrębnili dwie podklasy białka Bence-Jonesa (BJ). Do tego celu posłużył im test Ouchterlony (immunodyszfuzja radialna) oraz surowica zwierząt immunizowanych przeciwko białku Bence-Jonesa. Dla upamiętnienia Korngolda i Lipari’ego, dwa typy białka Bence-Jonesa określane są jako kappa i lambda. Korngold i Lipari odkryli również, że w pewnej grupie chorych białko Bence-Jonesa pojawia się także we krwi. Jednakże poznanie, czym naprawdę jest to tajemnicze białko, które przez swego odkrywcę uważane było za niezwykłą formę albuminy i fascynowało wielu badaczy, dokonało się ponad sto lat po opublikowaniu pierwszego przypadku jego istnienia. W roku 1962 Edelman i Gally wykazali, że lekkie łańcuchy immunoglobuliny monoklonalnej w surowicy oraz białko Bence-Jonesa pochodzące z moczu tego samego pacjenta mają identyczny skład aminokwasowy. Ponadto łańcuchy lekkie immunoglobulin, otrzymane poprzez fragmentację kompletnej cząsteczki immunoglobuliny wyizolowanej z surowicy, podczas ogrzewania reagowały tak samo jak białko Bence-Jonesa. Obserwacja ta potwierdziła hipotezę, że łańcuchy lekkie immunoglobulin surowicy to wykrywane w moczu białko Bence-Jonesa [4].

Mimo upływu czasu badania nad łańcuchami lekkimi immunoglobulin nie tracą na swojej atrakcyjności. Wciąż wielu badaczy frapuje tematyka własności fizjologicznych, fizykochemicznych łańcuchów lekkich. Możliwości wykorzystania łańcuchów lekkich w diagnostyce szpiczaka i innych chorób są wciąż przedmiotem licznych publikacji.

1.2 Immunoglobuliny – budowa łańcuchów lekkich.

Immunoglobuliny należą do grupy białek noszącej nazwę nadrodziny immunoglobulin (*immunoglobulin superfamily, IgSF*). Wspólną cechą tych białek jest budowa domenowa oraz mnogość genów kodujących strukturę poszczególnych domen (np. fragment zmienny, łączący, stały). Ostateczna sekwencja aminokwasowa białek należących do nadrodziny immunoglobulin jest wynikiem rekombinacji jednego z wielu genów kodujących fragmenty poszczególnych domen. Charakterystyczną cechą tych białek jest obecność tzw. splotu immunoglobulinowego. Jest to fragment składający się z dwóch struktur beta, stabilizowanych za pomocą mostka disiarczkowego [5]. Tego typu budowa jest istotna dla prawidłowego działania molekuł z nadrodziny immunoglobulin i determinuje ich właściwości fizykochemiczne.

Typowymi przedstawicielami białek z nadrodziny immunoglobulin są syntetyzowane przez pobudzone komórki plazmatyczne przeciwciała, które odgrywają istotną rolę w procesach związanych z odpornością humoralną organizmu. Forma monomeryczna przeciwciała zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych – dwóch łańcuchów lekkich oraz dwóch łańcuchów ciężkich. Zarówno łańcuchy lekkie jak i ciężkie zawierają fragment o bardzo zbliżonej dla wszystkich ludzkich immunoglobulin budowie, jest to tzw. część stała (C). Sekwencja aminokwasowa części stałej łańcuchów ciężkich stanowi podstawę klasyfikacji immunoglobulin na 5 klas: IgG, IgA, IgM, IgE oraz IgD. Podział immunoglobulin na dwa typy: kappa i lambda jest natomiast zdeterminowany budową części stałej łańcuchów lekkich. Każdy łańcuch immunoglobulinowy posiada również część zmienną (V). Sekwencja aminokwasowa części zmiennej gwarantuje dopasowanie fragmentu przeciwciała (paratopu) wchodzącego w interakcje z odpowiadającym mu fragmentem antygeny (epitopem).

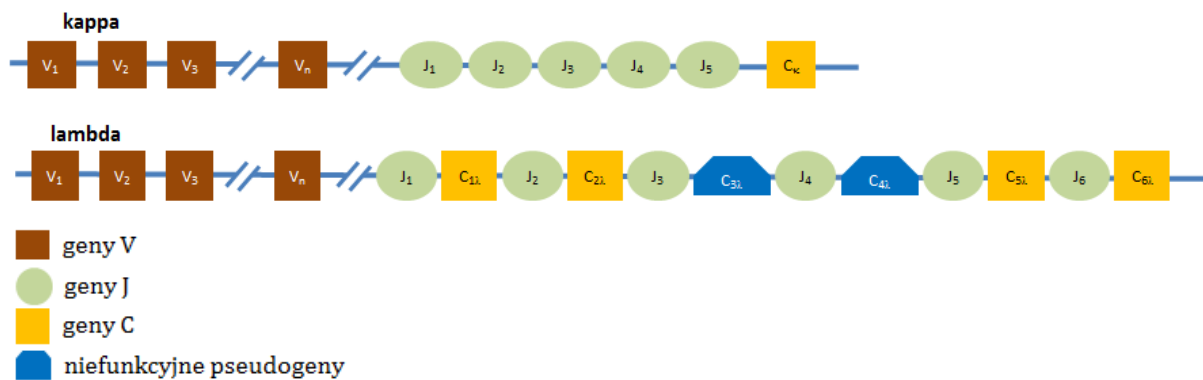
1.2.1 Źródła różnorodności łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Wobec mnogości antygenów, z jakimi organizm ma szanse się zetknąć, układ immunologiczny powinien mieć potencjalną możliwość wyprodukowania ogromnej ilości wariantów przeciwciał, które stałyby się bronią w walce z patogenami. Olbrzymia różnorodność immunoglobulin, a więc także olbrzymia różnorodność łańcuchów lekkich immunoglobulin, związana jest m. in. z charakterystyczną organizacją genów stanowiących podstawę dla syntezy immunoglobulin. Istnieje ok. 200 funkcjonalnych fragmentów genów kodujących łańcuchy ciężkie oraz lekkie immunoglobulin [6]. Fragment stały oraz zmienny łańcucha lekkiego oraz ciężkiego kodowane są przez odrębne grupy genów. Część zmienna łańcucha lekkiego kodowana jest przez geny: V oraz J, natomiast informacja genetyczna na temat sekwencji aminokwasowej części stałej zawarta jest w obrębie genu(ów) C. Geny V, J oraz C w komórkach ludzkich występują w wielu wariantach. Na wczesnym etapie dojrzewania limfocyta B fragmenty genów kodujące łańcuchy lekkie immunoglobulin są rozproszone w obrębie DNA limfocyta. Segmenty genów kodujących część stałą

łańcuchów zlokalizowane są najczęściej blisko siebie i są jednocześnie znacznie oddalone od segmentów genów kodujących części zmienne. Podczas dojrzewania limfocyta B fragmenty genów, które nie będą ulegały ekspresji zostają wycinane powodując, że pozostałe fragmenty genów zbliżają się do siebie i w dalszym etapie mogą ulec ekspresji [7].

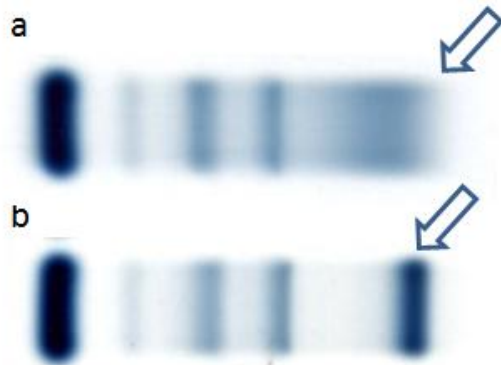
Podział łańcuchów lekkich immunoglobulin na dwa typy – kappa i lambda widoczny jest już na poziomie genomu. Łańcuchy lekkie typu kappa oraz lambda, mimo podobieństw strukturalnych, cechują się znacznymi rozbieżnościami dotyczącymi organizacji i sposobu rearanzacji zlokalizowanych na różnych chromosomach genów (ryc. 1). Geny związane z łańcuchami lekkimi typu kappa znajdują się na chromosomie drugim. Informacja genetyczna dla stałej części łańcuchów kappa kodowana jest przez jeden gen C, stąd znana jest jedna odmiana izotypowa łańcuchów kappa. Dla części zmiennej natomiast istnieje 5 genów J oraz 76 genów V, z których nie wszystkie są genami funkcjonalnymi. Pomimo wielości genów, tylko jeden z genów V oraz jeden z genów J zostanie połączony z genem C i dalej jest wykorzystywany w procesie syntezy łańcuchów kappa [5,7,8]. Geny dla łańcuchów lekkich lambda zlokalizowane są na chromosomie 22 i charakteryzują się nieco innym rozmieszczeniem przestrzennym. Kilkadziesiąt genów V, podobnie jak w przypadku łańcuchów kappa, ułożonych jest w sposób linearny, natomiast każdy z siedmiu segmentów J oddzielony jest od pozostałych genów J genem C. Spośród tego typu kompleksów JC tylko cztery ulegają ekspresji, dlatego wyróżniamy cztery podstawowe odmiany izotypowe łańcuchów lambda.

Funkcjonalny gen dla łańcuchów lekkich immunoglobulin powstaje w trakcie procesu dojrzewania limfocytów B poprzez łączenie segmentów V, J oraz C. Mnogość segmentów genów, które mogą tworzyć gen funkcjonalny, generuje mnogość możliwości w łączeniu segmentów V, J oraz C. Mechanizm ten stanowi podstawę tzw. zmienności rekombinacyjnej przeciwciał [8,9]. Zmienność rekombinacyjna nie jest jedynym czynnikiem warunkującym różnorodność łańcuchów lekkich (lub - mówiąc szerzej - przeciwciał). Dodatkowym czynnikiem jest tzw. zmienność na złączach oraz mutacje punktowe zachodzące w genach V oraz J. Zmienność na złączach generowana jest poprzez pewną „elastyczność”, która cechuje działanie enzymów biorących udział w procesie powstawania funkcjonalnego genu dla immunoglobuliny. Do powstającego fragmentu DNA dołączone zostają nowe nukleotydy lub nawet oligonuklotydowe fragmenty DNA. Pewna liczba nukleotydów tworzących tzw. złącze kodujące (miejsce łączące segmenty V i J) zostaje natomiast usunięta. W konsekwencji powstaje fragment DNA odmienny od DNA macierzystego. Pomimo że zmiana ramki odczytu spowodowana zmiennością na złączach generuje czasem powstanie niefunkcjonalnego białka, mechanizm ten w znaczący sposób zwiększa liczbę wariantów łańcuchów lekkich [5]. Mutacje punktowe odgrywają istotną rolę w procesie dopasowania przeciwciała do antygeny. Generują powstawanie tzw. regionów superzmiennych w części zmiennej łańcuchów lekkich i ciężkich immunoglobuliny i prowadzą do powstania przeciwciał różniących się pojedynczymi aminokwasami.



Ryc. 1 Schematyczne przedstawienie genów kodujących łańcuchy lekkie immunoglobulin. Geny kodujące łańcuchy lekkie kappa znajdują się na 2 chromosomie, natomiast geny kodujące łańcuchy lekkie lambda zlokalizowane są na chromosomie 22. Na schemacie uwidoczniono różnice w organizacji genów dla łańcuchów lekkich kappa oraz lambda. Kilkadziesiąt genów V, 5 genów J oraz jeden gen C łańcuchów kappa ułożone są w sposób linearny w przedstawionej kolejności. Sześć genów J oraz sześć genów C łańcuchów lekkich lambda tworzą kompleksy JC, z których jedynie cztery ulegają ekspresji (wg. *Levinson i Keren*) [11].

Wspomniana różnorodność immunoglobulin może być wykazana wieloma technikami pozwalającymi na wyodrębnienie immunoglobulin spośród innych białek osocza. Jedną z takich technik jest elektroforeza. W prawidłowym obrazie elektroforetycznym immunoglobuliny rysują się jako charakterystyczne szerokie pasmo we frakcji gamma-globulin, które dowodzi, że w skład frakcji gamma wchodzi białka o bardzo zróżnicowanym ładunku elektrycznym. Takie immunoglobuliny nazywane są poliklonalnymi, gdyż powstają jako produkt wielu klonów komórek plazmatycznych (ryc. 2). Wśród białek osocza immunoglobuliny stanowią najbardziej heterogenną grupę. Zmienność rekombinacyjna oraz możliwości łączenia różnych łańcuchów lekkich i ciężkich powoduje, że komórki plazmatyczne mogą produkować $>5 \times 10^7$ immunoglobulin różniących się częścią zmienną. Dodatkowe mechanizmy jak np. zmienność na złączach zwiększają tę liczbę. Szacuje się, że komórki plazmatyczne mogą produkować nawet $>10^9$ różnych immunoglobulin [10].

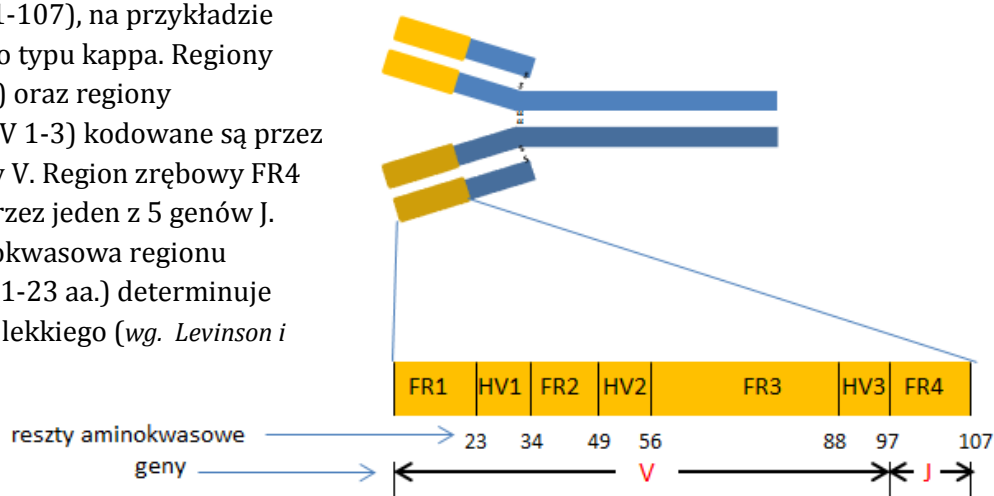


Ryc. 2 Obrazy rozdziałów elektroforetycznych białek surowicy (analizator *HYDRASYS* firmy *Sebia*). Strzałki wskazują frakcję gamma-globulin, gdzie migrują głównie immunoglobuliny. Strefa poliklonalnych immunoglobulin (a): szerokie pasmo dowodzi, że poliklonalne immunoglobuliny różnią się znacznie ładunkiem elektrycznym w środowisku buforu elektroforetycznego (różne punkty izoelektryczne). Dla porównania strefa immunoglobuliny monoklonalnej (b) migrująca jako pojedynczy prążek.

1.2.2 Podtypy łańcuchów lekkich.

C-kończącą część stała łańcuchów kappa składa się ze 107 reszt aminokwasowych, a część stała łańcuchów lambda jest utworzona przez 105 reszt aminokwasowych. Badania serologiczne dotyczące N-końcowej części zmiennej łańcuchów lekkich wykazały, że składa się ona z trzech regionów o dużej zmienności (HV – *ang. hypervariable region* lub inaczej CDR - *ang. complementarity determining regions*), które zaangażowane są w interakcje z antygenami. Cztery regiony o mniejszej zmienności tworzą strukturę zrębową (FR - *ang. framework region*) dla regionów hiperzmiennych. Analizując homologię sekwencji aminokwasowej 22 (lambda) lub 23 (kappa) początkowych aminokwasów pierwszego rejonu zrębowego (FR1), wyróżniono 4 podtypy łańcuchów lekkich kappa ($V_{\kappa I}$, $V_{\kappa II}$, $V_{\kappa III}$, $V_{\kappa IV}$) oraz sześć podtypów łańcuchów lekkich lambda ($V_{\lambda I}$, $V_{\lambda II}$, $V_{\lambda III}$, $V_{\lambda IV}$, $V_{\lambda V}$, $V_{\lambda VI}$) (ryc. 3). Cztery podtypy łańcuchów lekkich kappa oraz pięć z sześciu podtypów łańcuchów lekkich lambda zostało zróżnicowanych metodami serologicznymi. Częstość występowania poszczególnych podtypów łańcuchów lekkich kappa wynosi odpowiednio: 56, 10, 30, 4 %, natomiast dla łańcuchów lekkich lambda: 26, 38, 22, 3, 11 % [11].

Ryc. 3 Schemat budowy części zmiennej łańcucha lekkiego przeciwciała (reszty aminokwasowe 1-107), na przykładzie łańcucha lekkiego typu kappa. Regiony zrębowe (FR 1-3) oraz regiony hiperzmienne (HV 1-3) kodowane są przez jeden z 76 genów V. Region zrębowy FR4 kodowany jest przez jeden z 5 genów J. Sekwencja aminokwasowa regionu zrębowego FR1 (1-23 aa.) determinuje podtyp łańcucha lekkiego (wg. Levinson i Keren) [11].



1.3 Łańcuchy lekkie – synteza, metabolizm i znaczenie fizjologiczne.

1.3.1 Synteza i wydzielanie łańcuchów lekkich immunoglobulin poza komórki plazmatyczne.

Synteza łańcuchów lekkich jest nieodłącznie związana z powstawaniem kompletnej cząsteczki immunoglobuliny. Proces ten rozpoczyna się już na wczesnym etapie dojrzewania limfocytów B. Badania nad prekursorami limfocytów B sugerują, iż synteza kompletnej cząsteczki immunoglobuliny przebiega w pewnej sekwencji zdarzeń. Na etapie komórki progenitorowej rozpoczyna się rekombinacja genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobuliny – początkowo jest to gen dla łańcucha μ . Nim dojdzie do rearanżacji genu łańcucha lekkiego, nowo powstały gen łańcucha ciężkiego podlega ekspresji, a zsintezowany łańcuch ciężki μ przechodzi przez punkt kontrolny, związany z przyłączeniem prekursora łańcucha lekkiego zbudowanego z fragmentów VpreB oraz $\lambda 5$. Jeśli łańcuch ciężki został zsintetyzowany prawidłowo, dochodzi do utworzenia heterodimeru z zastępczym łańcuchem lekkim (VpreB $\lambda 5$). Tego typu kompleks, zostaje wyeksponowany na powierzchni komórki preB. Gdy proces eksponowania imitującego kompletną immunoglobulinę heterodimeru (receptor preBCR) się nie powiedzie, stanowi to sygnał dla komórki o syntezie niefunkcjonalnego łańcucha ciężkiego i komórka pre-B ulega apoptozie. Pojawienie się receptora preBCR na powierzchni komórki stanowi sygnał do jej dojrzewania i różnicowania. Gen dla zastępczego łańcucha lekkiego podlega ekspresji jedynie w komórce progenitorowej oraz pre-B. Na dalszych etapach dojrzewania limfocyta B ekspresja VpreB $\lambda 5$ zostaje wyłączona i rozpoczyna się rearanżacja genu dla łańcucha lekkiego [12]. Także na tym etapie można zaobserwować pewną kolejność zdarzeń – najpierw ulega rearanżacji oraz ekspresji gen dla łańcucha lekkiego kappa. Jeśli powstający w wyniku rekombinacji gen dla łańcuchów lekkich kappa jest nieproduktywny, segment V κ -J κ jest wycinany. Dopiero teraz może rozpocząć się rearanżacja genu i synteza łańcuchów lekkich lambda [13].

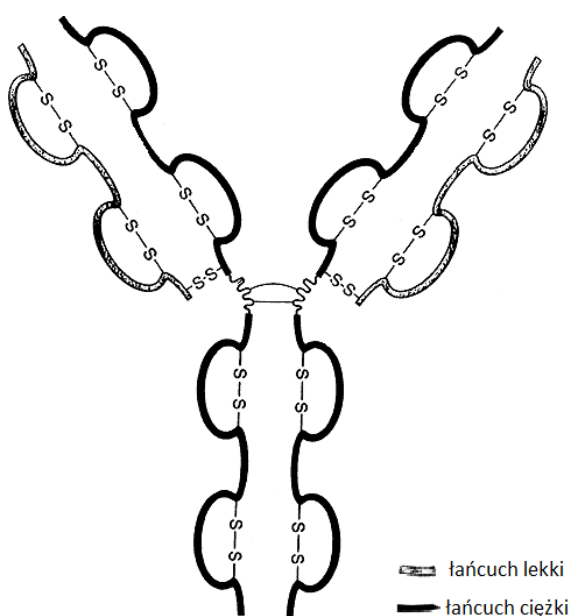
Cząsteczka immunoglobuliny jest białkiem heterodimerskim. Efektywna synteza białek składających się z kilku podjednostek zakłada ścisłą kontrolę nie tylko syntezy poszczególnych składowych takiego białka, ale także asocjacji podjednostek z utworzeniem kompletnego białka. Kluczowym organellum komórkowym dla procesu asocjacji podjednostek białkowych w kompletne białko jest retikulum endoplazmatyczne (RE). W siateczce endoplazmatycznej znajdują się specyficzne białka - chaperony, które niekwalencyjnie oddziałują z częściowo tylko sfałdowanymi prekursorami białek. Mechanizm ten zapobiega wydzielaniu poza obszar komórki molekuł, które – posiadając eksponowane hydrofobowe fragmenty – mogłyby dać początek patologicznemu procesowi agregacji [14]. Powstające w pierwszej kolejności łańcuchy ciężkie immunoglobulin pozostają w formie związanej poprzez domenę CH1 z białkiem opiekuńczym BiP do momentu połączenia z łańcuchem lekkim [15,16, 17]. Dzięki takiej strategii jedynie kompletna cząsteczka immunoglobuliny jest wydzielana poza retikulum endoplazmatyczne komórki plazmatycznej.

Obok udziału białek chaperonowych w procesie zapobiegania uwalnianiu z komórki częściowo sfałdowanego białka, zaproponowano również mechanizm związany z obecnością w białkach C-końcowej cysteiny [18]. Łańcuchy lekkie immunoglobulin posiadają pięć reszt cysteinowych, które odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury tych białek. Cztery z reszt cysteinylowych tworzą dwa wewnętrzne wiązania disiarczkowe, stabilizując w ten sposób część zmienną i część stałą łańcuchów. W obu typach łańcuchów lekkich immunoglobulin – kappa i lambda piąta reszta cysteinylowa znajduje się w C końcowym rejonie białka i zaangażowana jest w tworzenie mostka disiarczkowego z łańcuchem ciężkim immunoglobuliny (ryc. 4). W grupie białek zbudowanych z podjednostek mających w swojej strukturze C-końcową cysteinę, aminokwas ten odgrywa istotną rolę w procesie regulacji wydzielania kompletnego białka poza komórkę [19]. Jeśli wspomniana reszta cysteinylowa pozostaje niezwiązana, stanowi to sygnał do zatrzymania białka w obrębie struktur siateczki endoplazmatycznej. Prace nad procesem polimeryzacji immunoglobuliny IgM ukazały trojaką rolę cysteiny w pozycji 575 (C-końcowa cysteina IgM). Ma ona kluczowe znaczenie dla procesów: formowania kompletnego białka (pentameru bądź heksameru), zatrzymywania immunoglobuliny niekompletnej oraz kierowania niepełnowartościowego białka na drogę degradacji w proteosomach [20]. Analogiczny proces angażujący C-końcową cysteinę (dla łańcuchów lekkich jest to cysteina w pozycji 214) do zatrzymywania wolnych łańcuchów lekkichⁱ oraz ciężkich immunoglobulin polega najprawdopodobniej na tworzeniu odwracalnego wiązania disiarczkowego z białkami macierzy RE zawierającymi wolną cysteinę [21]. Okazuje się jednak, że same łańcuchy lekkie immunoglobulin nie zawsze podporządkowują się regule stanowiącej, że białko niekompletne nie jest wydzielane poza komórkę, lecz jest kierowane na drogę degradacji w proteosomach. Zauważono, że obok kompletnej cząsteczki immunoglobuliny, komórka plazmatyczna uwalnia poza obręb komórki pewną pulę wolnych łańcuchów lekkich [22]. Nie jest to proces patologiczny – w warunkach prawidłowych komórki plazmatyczne zawsze syntetyzują pewien nadmiar łańcuchów lekkich w stosunku do ilości potrzebnej do utworzenia kompletnej cząsteczki przeciwciała. Jednym z mechanizmów unikania zależnego od C - końcowej cysteiny procesu zatrzymywania niekompletnych białek wewnątrz RE, jest proces maskowania wolnej grupy tiolowej. W przypadku wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin maskowanie polega na tworzeniu dimerów przez monomery połączone wiązaniem disiarczkowym lub przyłączenie do Cys214 łańcucha lekkiego cysteiny lub innego związku tiolowego [19].

Tworząca pierwszorzędową strukturę łańcuchów lekkich immunoglobulin sekwencja aminokwasowa, która poprzedza Cys214, jest także niezwykle istotna w procesie uwalniania

ⁱ Termin wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin oznacza cząsteczki, które nie są związane z odpowiadającymi im komponentami kompletnej immunoglobuliny (łańcuchami ciężkimi immunoglobulin).

wolnych łańcuchów lekkich w RE. W większości dotychczas zbadanych przypadków łańcuchów lekkich związanych z łańcuchami ciężkimi, C-końcowa cysteina poprzedzona jest aminokwasami o charakterze kwaśnym. Kluczowym dla zrozumienia roli aminokwasów poprzedzających C-końcową cysteinę w procesie uwalniania wolnych łańcuchów jest doświadczenie, w którym zastąpienie kwaśnej reszty kwasu asparaginowego neutralną resztą glicyny, czy zasadową resztą lizyny spowodowało retencję, a następnie degradację niezwiązanych łańcuchów lekkich immunoglobulin [19].



Ryc. 4 Schematycznie przedstawiona cząsteczka immunoglobuliny z uwzględnieniem reszt cysteinyłowych. Cząsteczka łańcucha lekkiego posiada pięć reszt cysteinyłowych. Cztery z nich tworzą dwa wewnętrzne wiązania disiarczkowe stabilizujące część zmienną i część stałą łańcuchów. Piąta reszta cysteinyłowa znajduje się w C-końcowym rejonie białka i zaangażowana jest w tworzenie mostka disiarczkowego z łańcuchem ciężkim immunoglobuliny (wg. Liu i May) [23].

1.3.2 Usuwanie wolnych łańcuchów lekkich w organizmie człowieka

Wolne łańcuchy lekkie (*ang. free light chain - FLC*) są białkami drobnocząsteczkowymi, w osoczu występującymi zwykle w formie monomeru i/lub dimeru. Masa cząsteczkowa wolnych łańcuchów lekkich wynosi ok. 22 kDa dla monomeru oraz ok. 44 kDa dla dimeru. Cząsteczki o masie cząsteczkowej tego rzędu bez trudu przechodzą przez błonę podstawną kłębuszków nerkowych, a następnie są reabsorbowane w komórkach nabłonkowych cewek nerkowych bliższych. Resorpcja FLC zachodzi poprzez tandem receptorowy megalinę oraz kubulinę, a następnie ma miejsce degradacja FLC w lizosomach komórek cewek proksymalnych. Wspomniane receptory biorą udział w procesie endocytozy zarówno łańcuchów kappa jak i lambda, przy czym niektóre podtypy kappa czy lambda wiążą się chętniej z kubuliną, podczas gdy inne z megaliną [24]. Jeśli jednak zostanie przekroczona zdolność resorpcyjna kanalików nerkowych, „nadmiarowe” łańcuchy zostają wydalone z moczem. U zdrowych osób FLC szybko usuwane są z krwi. Okres półtrwania dla monomeru łańcucha lekkiego wynosi ok. 2-4 godziny, natomiast dla dimeru 3-6 godzin.

Wolne łańcuchy lekkie są produkowane przez komórki plazmatyczne w pewnym nadmiarze w stosunku do łańcuchów ciężkich - w ciągu doby jest produkowane ok 500 mg FLC. Ze względu na dużą zdolność cewek nerkowych do metabolizowania wolnych łańcuchów lekkich, w warunkach prawidłowych bardzo niewielka ilość tego białka (1-10 mg na dobę) pojawia się w moczu [25]. Podejrzewa się również, że pewna ilość łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu osób zdrowych ma pochodzenie lokalne. Najprawdopodobniej powstaje w trakcie syntezy immunoglobulin IgA w dystalnej części nefronu oraz w cewce moczowej [26].

1.3.3 Znaczenie łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Łańcuchy lekkie, będące fragmentem kompletnej cząsteczki immunoglobuliny, mają istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania przeciwciał. Regiony determinujące dopasowanie łańcuchów lekkich partycypują w formowaniu miejsc wiążących antygen przez kompletną cząsteczkę przeciwciała. Jak ważna jest rola łańcuchów lekkich immunoglobulin dla prawidłowego funkcjonowania przeciwciała obrazuje przykład defektu w genie kodującym łańcuchy kappa, który można zaobserwować w populacji Indian z plemienia Nawajów. Obecność nieproduktywnej wersji jednego z alleli genu kodującego fragment części zmiennej łańcucha kappa jest przyczyną słabej odpowiedzi na szczepionkę przeciwko *Haemophilus influenzae* u przedstawicieli tej populacji [27]. Udowodniono, że same łańcuchy lekkie mają zdolność wiązania antygenów, jednak ich powinowactwo do antygeny jest mniejsze niż powinowactwo kompletnej cząsteczki immunoglobulin. Monoklonalne, dimeryczne łańcuchy lekkie lambda, powstające po stymulacji komórek plazmatycznych za pomocą wazoaktywnego peptydu jelitowego, wykazują pięciokrotnie mniejsze powinowactwo do antygeny niż kompletne przeciwciało [28]. Badania nad krystaliczną strukturą kompleksu antygen - przeciwciało wykazały, że liczba powierzchni kontaktu z antygenem dla łańcuchów ciężkich oraz lekkich jest porównywalna [29]. Możliwość zróżnicowania miejsca wiążącego antygen poprzez tworzenie par różnych lekkich i ciężkich łańcuchów zwiększa repertuar przeciwciał, a więc ilość rozpoznawanych antygenów. Łańcuchy lekkie biorą także udział w procesie regulacji wydzielania poza komórkę plazmatyczną kompletnego przeciwciała. Łączenie łańcucha lekkiego z ciężkim jest jednym z etapów regulacyjnych dla tego procesu [15]. Dodatkowo wolne łańcuchy lekkie wykazują aktywność proteolityczną wobec antygenów polipeptydowych, przeciwko którym skierowana jest macierzysta immunoglobulina. Sekwencja aminokwasowa regionu zmiennego niektórych podgrup łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazuje podobieństwa do sekwencji części aktywnej pewnych proteaz serynowych. [30].

Wolne łańcuchy lekkie przeciwciał mogą wykazywać działanie podobne do autoprzeciwciał. Monoklonalne wolne łańcuchy lekkie lambda wiążące czynnik H – jeden z regulatorów alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza, wykryto w krwi oraz moczu pacjentów cierpiących na błoniasto-rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek. Wiązanie dimeru łańcuchów lekkich lambda do czynnika H hamuje jego oddziaływanie z fragmentem

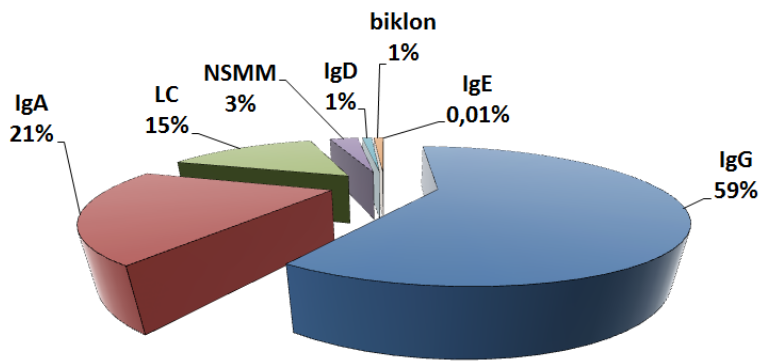
C3b układu dopełniacza, co jest przyczyną niekontrolowanej aktywacji układu dopełniacza oraz niszczenia błony podstawnej kłębuszków nerkowych [31]. Wolne łańcuchy lekkie mogą się także wiązać z czynnikiem X układu krzepnięcia, co powoje patognomiczne objawy wybroczyn okularowych w przebiegu amyloidozy [32].

Na modelu mysim wykazano ponadto, że wolne łańcuchy lekkie mają zdolność uczulania mastocytów. Udowodniono udział łańcuchów lekkich w patogenezie opóźnionej reakcji nadwrażliwości typu komórkowego. Wiązanie specyficznych antygenów haptenowych do uczulonych wolnymi łańcuchami lekkimi mastocytów skutkuje uwolnieniem mediatorów zapalnych, stymulując równocześnie działanie limfocytów T i dalszy rozwój reakcji nadwrażliwości [33,34]. Zastanawiano się także, czy przy udziale podobnego mechanizmu wolne łańcuchy lekkie specyficzne dla antygenów peptydowych mogą brać udział w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Teoria ta poparta jest przez spostrzeżenie, że w wielu chorobach takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena występują podwyższone stężenia wolnych łańcuchów lekkich. Dodatkowo istnieją sugestie, że komórki tuczne odgrywają pewną rolę w mechanizmie procesu autoimmunizacji. Wiadomo również, iż u ponad 90% chorych na stwardnienie rozsiane (MS - *ang. multiple sclerosis*) obserwuje się wewnątrzoponową syntezę oligoklonalnych immunoglobulin [35,36], któremu towarzyszy synteza wolnych łańcuchów lekkich [37,38]. Łańcuchy lekkie stały się zatem atrakcyjnym celem dla nowych leków stosowanych w terapii chorób o podłożu zapalnym. Badania nad potencjalnymi możliwościami wykorzystania specyficznych antagonistów łańcuchów lekkich wykazały użyteczność tego typu związków w hamowaniu rozwoju takich chorób jak: astma czy alergia kontaktowa [39]. Spośród komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej mastocyty nie są jedynymi, na których funkcję wpływają wolne łańcuchy lekkie. Badania Cohena i wsp. wykazały, że wolne łańcuchy lekkie upośledzają reakcję neutrofilii na czynniki chemotaktyczne. Po stymulacji za pomocą aktywatora chemotaksji-peptydu fMLP, w obecności wolnych łańcuchów lekkich odpowiedź neutrofilii była słabsza. Wyniki przytoczonych badań sugerują, że podwyższony w stosunku do wartości prawidłowych poziom FLC u chorych z gammapatią monoklonalną lub z chorobami z autoagresji wpływa z jednej strony na występowanie przewlekłego stanu zapalnego, a z drugiej strony na obniżoną odporność komórkową i większą zapadalność na infekcje bakteryjne, co jest jedną z częstszych przyczyn śmiertelności w tych grupach chorych [40]. Monoklonalne wolne łańcuchy syntetyzowane w dużych ilościach w chorobach limfoproliferacyjnych mogą powodować uszkodzenie nerek lub odkładać się w wielu narządach, przyczyniając się do upośledzenia ich funkcji. Duże stężenie monoklonalnych łańcuchów lekkich w osoczu osób chorych jest złym czynnikiem prognostycznym [41]

1.4 Rola łańcuchów lekkich immunoglobulin w procesach chorobotwórczych – gammapatie monoklonalne.

Gammapatie monoklonalne są to zmiany białkowe towarzyszące grupie chorób o etiologii związanej z nowotworowym rozrostem komórek plazmatycznych. Pierwotną przyczyną gammapatii monoklonalnych jest nowotworowy rozrost pojedynczego klonu komórek plazmatycznych produkujących i wydzielających do osocza immunoglobuliny lub fragmenty immunoglobulin. Proces ten manifestuje się obecnością w surowicy jednorodnej frakcji białkowej zwanej białkiem monoklonalnym (białkiem M), które w rozdzielach elektroforetycznych zwykle lokalizuje się w obszarze gamma globulin. Jedną z form gammapatii monoklonalnej jest szpiczak mnogi. Zmienione nowotworowo komórki plazmatyczne zwykle produkują kompletną cząsteczkę immunoglobuliny monoklonalnej klasy IgG. Rzadziej produkowane są cząsteczki immunoglobulin innych klas lub tylko fragmenty immunoglobulin (np. wolne łańcuchy lekkie). Na ryc. 5 przedstawiono klasyfikację szpiczaka mnogiego w oparciu o produkowaną cząsteczkę białka monoklonalnego.

Odmiana szpiczaka mnogiego, w której produkowane są jedynie łańcuchy lekkie immunoglobulin, natomiast rutynowymi metodami laboratoryjnymi nie jest wykrywana kompletna cząsteczka białka monoklonalnego, nazywana jest chorobą łańcuchów lekkich - LCMM (*light chain multiple myeloma*) [25]. LCMM występuje u 15% chorych na szpiczaka mnogiego. Zwiększona ilość wolnych łańcuchów lekkich powoduje przekroczenie zdolności resorpcyjnej cewek nerkowych i obecność białka Bence-Jonesa w moczu. Wytwarzane przez komórki plazmatyczne wolne łańcuchy lekkie są nefrotoksyczne. Mogą wywoływać ostrą lub przewlekłą niewydolność nerek. Wykazano, że łańcuchy lekkie pochodzące od różnych pacjentów mają odmienne toksyczne działanie na nerki. Część z nich ma tendencję do odkładania się w kłębuszkach nerkowych prowadząc do rozwoju choroby depozytów łańcuchów lekkich (LCDD – *light chain deposition disease*). Można je nazwać łańcuchami glomerulopatycznymi [42]. Inne, oprócz powinowactwa do kłębuszków nerkowych, wykazują również tendencję do tworzenia uporządkowanych złogów w innych częściach nefronu (łańcuchy amyloidogenne). Dodatkowo FLC uszkadzające przede wszystkim komórki cewek proksymalnych mogą przyczynić się do rozwoju zespołu Fanconiego (łańcuchy tubulopatyczne). Jednak najczęstszym powikłaniem związanym z produkcją zwiększonej ilości łańcuchów lekkich przez nowotworowo zmienione komórki plazmatyczne jest tzw. nerka szpiczakowa, której rozwój związany jest z tworzenie wałeczków woskowych i prowadzi bardzo często do niewydolności nerek.



Ryc. 5 Częstość występowania poszczególnych klas immunoglobulin lub fragmentów immunoglobulin w szpiczaku mnogim. LC (*ang. light chain*) – łańcuchy lekkie immunoglobulin; NSMM (*ang. nonsecretory multiple myeloma*) – szpiczak niewydzielniczy (wg. Bradwell i wsp) [25].

1.4.1 Nefropatia wałeczkowa.

Nefropatia wałeczkowa jest związana z tworzeniem wałeczków białkowych w kanalikach dystalnych oraz cewkach zbiorczych chorych na gammapatii monoklonalne. Manifestuje się znacznym i szybko postępującym uszkodzeniem nerek. Dotyczy ok. 50% pacjentów ze szpiczakiem mnogim i zwana jest potocznie nerką szpiczakową [42]. Rozwija się u chorych, u których ilość wolnych łańcuchów lekkich przewyższa zdolność resorpcyjną cewek nerkowych bliższych. W patofizjologii rozwoju nerki szpiczakowej niebagatelną rolę odgrywa białko Tamm - Horsfalla (THP) – glikoproteina produkowana i wydzielana przez komórki cienkiego ramienia wstępującego pętli Henlego. Mieszane agregaty zbudowane z THP oraz FLC tworzące wałeczki białkowe blokują przepływ przez cewki nerkowe, będąc przyczyną rozwijającego się upośledzenia funkcji nerek. Wykazano, że zarówno łańcuchy lekkie typu kappa jak i lambda mają zdolność tworzenia wałeczków, a za interakcję z FLC odpowiada charakterystyczna sekwencja w białku THP. Dziewięć-aminokwasowa sekwencja: AHWSGHCL (aminokwasy 225-233) tworzy domenę wiążącą łańcuchy lekkie, natomiast szczególne znaczenie dla powinowactwa THP do FLC wydaje się mieć cysteina [43]. Łańcuchy lekkie tworzące wałeczki posiadają podobny profil hydropatyczny jak region THP wiążący FLC. Oddziaływania hydrofobowe są najprawdopodobniej podstawą interakcji między tymi dwoma białkami [43]. Region wiążący THP, znajduje się w obszarze pętli trzeciej regionu warunkującego dopasowanie (CDR3). Trzy pętle CDR części zmiennej łańcucha lekkiego są rejonami o najwyższej zmienności. Dzięki rearanżacji VJ oraz mutacjom punktowym sprawiają, że nie ma dwóch takich samych łańcuchów lekkich, jednak wspólną cechą rejonów CDR wszystkich rodzajów łańcuchów lekkich jest częste występowanie w tych rejonach aminokwasów hydrofobowych, zwłaszcza tryptofanu oraz tyrozyny [44]. Łańcuchy lekkie pochodzące z różnych klonów komórek plazmatycznych (a więc różniące się pierwszorzędowną strukturą CDR3) mają odmienne powinowactwo do THP, a co za tym idzie - różną zdolność do tworzenia wałeczków białkowych. Nie wykazano zależności pomiędzy zdolnością FLC do tworzenia wałeczków a ich stężeniem. Według Hutchinson i wsp. najniższe

stężenie FLC w surowicy chorych z postępującą nefropatią wałeczkową wynosi 855 mg/l, natomiast najwyższe odnotowane stężenie FLC wynosiło 69 430 mg/l [45].

Czynniki środowiskowe pełnią istotną rolę w patofizjologii nefropatii wałeczkowej. Nawet FLC od pacjentów, u których nie zaobserwowano objawów nefropatii wałeczkowej, w warunkach *in vitro* mogą wiązać się z THP. Łańcuchy lekkie o słabym powinowactwie do THP u odpowiednio nawodnionych szczurów nie tworzą wałeczków, natomiast u zwierząt odwodnionych tworzą się wałeczki oraz pojawiają się objawy upośledzonego funkcjonowania nerek [44]. Ważnym czynnikiem wpływającym na zdolność tworzenia połączeń łańcuchów lekkich z THP jest ich punkt izoelektryczny (pI) [46,47]. W sytuacji, kiedy punkt izoelektryczny białka Bence-Jonesa jest wyższy od pH płynu cewkowego (> 5), białko posiada ładunek dodatni i łatwiej tworzy nierozpuszczalne kompleksy z kwaśną mukoproteiną Tamma-Horsfalla (pI 3.2).

Poznanie mechanizmów oddziaływania łańcuchów lekkich z białkiem Tamma - Horsfalla oraz wpływu czynników zewnętrznych na to oddziaływanie stwarza możliwość wyboru odpowiedniej strategii zapobiegania rozwinięcia się nerki szpiczakowej u chorych z gammopatia monoklonalną.

1.4.2 Zespół Fanconiego.

Zespół Fanconiego jest stosunkowo rzadkim powikłaniem szpiczaka mnogiego charakteryzującym się dysfunkcją komórek nabłonkowych wyściełających światło cewek proksymalnych. Następstwem dysfunkcji komórek cewek nerkowych proksymalnych jest upośledzenie zdolności degradacji białek drobnocząsteczkowych (w tym łańcuchów lekkich), które pojawiają się w moczu (białkomocz cewkowy). Towarzyszy temu również zaburzenie resorpcji jonów fosforanowych, jonów wodorowęglanowych (z następową kwasimą cewkową typu II), jonów magnezu, potasu oraz wapnia, a także kwasu moczowego, glukozy i aminokwasów.

Zespół Fanconiego związany z klonalnym rozrostem komórek plazmatycznych i produkcją białka monoklonalnego towarzyszy tlącemu się szpiczakowi (*ang. smoldering myeloma*), a pojawiające się w moczu łańcuchy lekkie immunoglobulin są zazwyczaj łańcuchami typu kappa [48]. W większości przypadków zespołu Fanconiego w przebiegu szpiczaka mnogiego obserwuje się także obecność krystalicznych wtrętów wewnątrz lizosomów komórek cewek proksymalnych. Z użyciem metody immunofluorescencji wykazano, że są to łańcuchy lekkie immunoglobulin, prawie wyłącznie typu kappa. Podobne wtręty obecne są również w makrofagach szpiku kostnego oraz (rzadko) monoklonalnych komórkach plazmatycznych.

Eksperymenty, w których porównano łańcuchy lekkie uzyskane z moczu pacjentów oraz białko będące składową wtrętów pochodzących z komórek proksymalnych cewek nerkowych, dały kilka istotnych informacji na temat łańcuchów lekkich u chorych z zespołem Fanconiego. Wtręty z cewek proksymalnych okazały się być polipeptydami zbudowanymi ze 107 aminokwasów, odpowiadającymi fragmentom zmiennym łańcuchów lekkich

otrzymanych z moczu badanych pacjentów. W krystalicznych złogach komórkowych znaleziono także niewielką domieszkę kompletnych cząsteczek łańcuchów lekkich. Kompletnie cząsteczki łańcuchów lekkich uzyskanych od wspomnianych pacjentów poddane działaniu enzymów proteolitycznych występujących w lizosomach komórek cewek proksymalnych (trypsyna, pepsyna, katepsyna B), ulegają fragmentacji na część stałą oraz część zmienną. Jednak po poddaniu samej części zmiennej działaniu enzymów proteolitycznych, zauważono nietypową dla pozostałych łańcuchów lekkich oporność na ich działanie [49]. W pracy Siraca i wsp. [49] metodami inżynierii genetycznej zastąpiono myszy fragment zmienny łańcuchów lekkich (V_M), ludzkim fragmentem zmiennym (V_H) pochodzącym od pacjentów z zespołem Fanconiego w przebiegu szpiczaka mnogiego. Myszy transgeniczne rozwinęły zespół Fanconiego z typowymi patologicznymi zmianami w nerkach: obecnością wewnątrzkomórkowych wtrętów, powiększeniem mitochondriów i zmianami w rąbku szczoteczki komórek kanalików proksymalnych nerek oraz objawami dysfunkcji kanalików proksymalnych. Zauważono również, że rozległość zmian nerkowych koreluje z ilością łańcuchów lekkich produkowanych przez komórki plazmatyczne. W komórkach cewek proksymalnych myszy transgenicznych zauważono mniej krystalicznych wtrętów w porównaniu do komórek ludzkich, a także bardziej łagodne zmiany morfologii komórek cewek proksymalnych i nieobecność w moczu glukozy oraz aminokwasów [49].

Łańcuchy lekkie produkowane przez chorych, u których rozwija się zespół Fanconiego, charakteryzują się wysoką homologia dotyczącą struktury pierwszorzędowej części stałej. Zwykle są produktem niezróżnicowanego genu O2/O12 lub podobnego genu O8/O18 kodujących część zmienną łańcuchów kappa podtypu 1. Cechą charakterystyczną produktów wspomnianych genów jest obecność nietypowej hydrofobowej reszty aminokwasowej w pozycji 30 łańcucha polipeptydowego pierwszej pętli regionu determinującego dopasowanie. Dodatkowe badania nad częścią zmienną łańcuchów lekkich związanych z patogenezą zespołu Fanconiego, ujawniły w większości przypadków obecność hydrofobowej reszty aminokwasowej w pozycji 94. Jednoczesne występowanie reszt hydrofobowych w pozycjach 30 i 94 części zmiennej łańcuchów lekkich warunkuje najprawdopodobniej oporność białka na działanie enzymów proteolitycznych. Powoduje to wewnątrzkomórkową akumulację FLC. W innym modelu mysim zastąpienie niepolarnego alaniny w pozycji 30 aminokwasem polarnym, spowodowało zahamowanie krystalizacji fragmentów łańcuchów lekkich w komórkach cewek proksymalnych [50]. Istnieją jednak badania, w których dowiedziono, że niektóre monoklonalne fragmenty części zmiennej łańcuchów kappa podtypu 1 oraz podtypu III nie wykazują oporności na działanie lizosomalnych enzymów proteolitycznych i nie tworzą wewnątrzkomórkowych wtrętów. Pomimo to mogą prowadzić do rozwinięcia pełnoobjawowego zespołu Fanconiego lub częściowej dysfunkcji kanalików proksymalnych bliższych [48,50]. Dane te sugerują, że nie tylko zdeponowane wewnątrzkomórkowo formy krystaliczne łańcuchów lekkich biorą udział w patogenezie zespołu Fanconiego, ale i same łańcuchy lekkie mają bezpośredni toksyczny wpływ na komórki kanalików nerkowych. W pracy Cogne i wsp [51] dwie linie komórkowe

z cewek nerkowych proksymalnych były inkubowane z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi CHEB, które u ludzi prowadzą do powstania zespołu Fanconiego. Inkubacja z łańcuchami CHEB prowadziła do obniżenia syntezy DNA oraz działała hamująco na proliferację komórek (efekt nefrotoksyczny obserwowano już dla stężeń >20 µg/ml). Działanie takie jest specyficzne dla łańcuchów lekkich związanych z zespołem Fanconiego. W próbie kontrolnej inkubowano komórki cewek proksymalnych z łańcuchami BON otrzymanymi od pacjentów z LCDD i nie zaobserwowano znaczącego wpływu na proliferację komórek. Do wytworzenia wewnątrzkomórkowych wtrętów z glomerulopatycznych FLC konieczna jest dłuższa niż 48h ekspozycja komórek cewek proksymalnych na ich działanie [⁵¹].

1.4.3 AL amyloidoza

Amyloidozy to grupa chorób, których cechą charakterystyczną jest występowanie zewnątrzkomórkowych depozytów białkowych. Amyloidozy definiowane są przez rodzaj białka będącego prekursorem włókien fibrylarnych tworzących złogi amyloidowe. Do tej pory zidentyfikowano przynajmniej 28 białek, których odkładanie w tkankach staje się przyczyną powstawania różnych chorób z tej grupy [⁵²]. Do białek będących prekursorami złogów amyloidowych w różnych tkankach należą m. in.: wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (w przebiegu gammapatii monoklonalnych), transtyretyna (u chorych z amyloidozą starczą lub rodzinną), surowiczy amyloid A (w przebiegu przewlekłych chorób zapalnych lub nowotworów złośliwych) czy β 2-mikroglobulina (u chorych przewlekle dializowanych). Tabela 1 przedstawia sześć najczęściej występujących typów amyloidoz oraz białek prekursorowych. Pomimo różnorodnej budowy i funkcji prekursorów, powstałe złogi amyloidowe mają podobną strukturę.

Amyloid jest nierozpuszczalną formą tworzącego go białka, ukształtowaną w nierozgałęzione włókna, które powstają poprzez niekwalencyjne oddziaływanie podjednostek białkowych. Dodatkowym uniwersalnym składnikiem depozytów amyloidowych jest tzw. komponenta P amyloidu - glikoproteina, którą można również znaleźć w formie wolnej we krwi (*ang. serum amyloid P, SAP*) [⁵³]. Cechą wspólną złogów amyloidowych, bez względu na rodzaj białka będącego ich prekursorem, jest zdolność wiązanie barwników takich jak: czerwień Kongo czy tioflawina. Cecha ta wykorzystywana jest w celach diagnostycznych. Umiejscowienie tworzących się złogów odróżnia amyloidozy narządowe, gdzie depozyty białkowe odkładają się głównie w jednym narządzie (np. nerkach, sercu czy ośrodkowym układzie nerwowym) od systemowych, w których agregaty białkowe zlokalizowane są w kilku różnych organach.

Kliniczne manifestacje amyloidoz związanych są przede wszystkim z obecnością depozytów białkowych w różnych organach, a co za tym idzie, z upośledzeniem funkcji zajętych narządów. Mechanizmy prowadzące do uszkodzenia tkanek, w których odkładają się złogi białkowe, nie są jeszcze do końca poznane. Prosta teoria tłumacząca postępujące uszkodzenie organów zajętych przez proces amyloidogenezy zastępowaniem substancji międzykomórkowej przez włókna amyloidowe, jest niewystarczająca. Wydaje się, że

w przebiegu takich chorób spichrzeniowych jak: choroba Alzheimera czy amyloidoza transtyretynowa (ATTR) właściwości cytotoksyczne wykazują jedynie oligomeryczne prekursorzy złogów amyloidowych, nie zaś same włókna amyloidowe. Podobnie prawidłowości występują w przypadku amyloidozy łańcuchów lekkich immunoglobulin (AL). Istnieją przesłanki przemawiające za cytotoksycznością samych amyloidogennych łańcuchów lekkich. Palladini i wsp. w badaniach na grupie 171 pacjentów ze zdiagnozowaną AL amyloidozą oraz obecnością złogów amyloidowych w sercuⁱⁱ zaobserwowali interesującą zależność. Wykazali, że wraz ze spadkiem stężenia amyloidogennych łańcuchów lekkich we krwi na skutek zastosowanej chemioterapii, spada stężenie N-końcowej części prekursora peptydu natriuretycznego (NT-proBNP) w osoczu, czemu towarzyszy poprawa funkcji serca i wydłużenie czasu przeżycia pacjenta. Jednocześnie wartym odnotowania jest fakt, że spadkowi NT-proBNP nie towarzyszyły oznaki zmniejszenia się złogów amyloidogennych w tkance serca [54].

Identyfikacja białka tworzącego złoży amyloidowe jest niezwykle istotna dla diagnostyki choroby. Rodzaj białka będącego prekursorem amyloidu determinuje sposób leczenia pacjenta. W przypadku amyloidozy łańcuchów lekkich celem terapii jest zniszczenie patologicznych klonów komórek plazmatycznych, a co za tym idzie, obniżenie stężenia krążących wolnych łańcuchów lekkich.

Amyloidoza AL jest najczęstszą postacią amyloidozy. Według danych Roberta Kyla z 1992 roku zapadalnośćⁱⁱⁱ na AL amyloidozę w Stanach Zjednoczonych wynosi 0.89 [55]. Występowanie amyloidozy towarzyszy 10-15% przypadkom szpiczaka mnogiego, choć ze względu na problemy z wykrywaniem tej choroby wydaje się obecnie, że liczba ta jest niedoszacowana. W grupie chorych na szpiczaka amyloidoza zazwyczaj rozwija się w trakcie choroby, ale może się również zdarzyć, że rozwój amyloidozy wyprzedza objawową postać szpiczaka mnogiego (0.4% przypadków) [56]. Pacjenci z AL amyloidozą zwykle charakteryzują się występowaniem w szpiku niskiego (ok. 5–10%) odsetka komórek plazmatycznych oraz manifestacjami klinicznymi zaburzeń funkcji jednego lub kilku organów innych niż szpik kostny (tabela 2)

W większości przypadków amyloidozy AL włókna fibrylarne wyizolowane z tkanek pacjentów składają się z części zmiennej (VL), której towarzyszy fragment części stałej łańcuchów lekkich (CL) lub wyłącznie z części zmiennej. Nieliczne są przypadki, gdy ze złogów

ⁱⁱ obecność złogów amyloidowych w sercu oceniano badaniem echokardiograficznym i określona jako średnią grubość ściany lewej komory (*mean left ventricular wall thickness*) > 12 mm, przy równoczesnym braku innych potencjalnych czynników wywołujących przerost lewej komory serca

ⁱⁱⁱ liczba nowo zarejestrowanych przypadków konkretnej choroby w przedziale czasu (roku) na 100 tys. osób badanej populacji

białkowych wyizolowano całe białko. Nie ma jednak danych, które by jednoznacznie określiły, czy tworzenie złogów białkowych z fragmentów łańcuchów lekkich jest związane z ich wcześniejszą proteolizą, czy może wadliwą syntezą, prowadzącą do powstania jedynie fragmentu tego białka [57]. W przebiegu AL amyloidozy komórki plazmatyczne produkujące prekursory włókien fibrylarnych około 3 razy częściej wykazują ekspresję łańcuchów lekkich typu lambda niż kappa [58]. Diagnostyka AL amyloidozy obejmuje przede wszystkim badanie szpiku kostnego pod kątem obecności monoklonalnych komórek plazmatycznych oraz wykazanie obecności amyloidu w tkankach. Amyloidowe złogi białkowe wykazują charakterystyczne jasnozielone zabarwienie widoczne we fluorescencyjnym mikroskopie polaryzacyjnym po wybarwieniu czerwienią Kongo oraz żółtozieloną fluorescencję po barwieniu tioflawiną. Aspiracja tkanki tłuszczowej śródbrzusza i badanie aspiratu pod kątem obecności włókien fibrylarnych przy użyciu wspomnianych barwników jest prostą i nieinwazyjną metodą stosowaną w diagnostyce AL amyloidozy. Jednak metoda ta daje wynik dodatni w 70% przypadków, stąd istnieje niekiedy konieczność uzyskania materiału bezpośrednio z zajętego organu. Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda w surowicy, elektroforetyczne wykrywanie białka monoklonalnego w surowicy czy białka Bence-Jonesa w moczu oraz immunofiksacja surowicy są badaniami wykazującym pomocniczą wartość w diagnostyce AL amyloidozy w stosunku do badania bioptatu tkankowego.

Problem amyloidozy łańcuchów lekkich dotyczy przede wszystkim osób starszych. Średnia wieku wśród osób dotkniętych tą chorobą w momencie zdiagnozowania schorzenia wynosi ok. 65 lat. Nierzadko choroba charakteryzuje się szybką progresją i kończy śmiercią pacjenta [59].

Tabela 1 Zestawienie najczęściej występujących amyloidoz systemowych (wg. Merlini i wsp.) [52].

| TYP | SKRÓT | PRECURSOR/ SKRÓT | MIEJSCE SYNTEZY BIAŁKA PREKURSOROWEGO | ZACHOROWALNOŚĆ/ ROK |
|---|-------------|---|--|--|
| Amyloidoza łańcuchów lekkich immunoglobulin | AL | monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLC) | szpik kostny, nowotworowe komórki plazmatyczne | 4.5/100,000 |
| Amyloidoza odczynowa | AA | surowicze białko amyloidowe A (SAA) | wątroba | 0.5–1/ 100,000 |
| Starcza amyloidoza układu | SSA | transtyretyna | wątroba w ponad 90% przypadków | |
| Amyloidoza β_2 mikroglobuliny | $A\beta_2M$ | β_2 mikroglobulina | nerki | < 5% przyp. zachorowań na amyloidozę < 1/ 100,000 (< 5% przyp. zachorowań na amyloidozę) |
| <u>Amyloidoza rodzinna:</u> | | | | |
| ▪ Amyloidoza transtyretyny | ATTR | wariant transtyretyny zawierający ponad 100 mutacji | wątroba w ponad 90% przypadków | - |
| ▪ Amyloidoza fibrynogenu | AFib | wariant fibrynogenu | wątroba | - |

Tabela 2 Objawy kliniczne amyloidozy związane z zajęciem różnych narządów (wg. Merlini i Gertz) [52,60].

| ORGAN | MANIFESTACJE KLINICZNE | % PACJENTÓW Z AMYLOIDOZĄ UKŁADOWĄ |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| Nerki | Zespół nefrotyczny (białkomocz; > 0,5 g/ 24h) | 70 |
| | Niewydolność nerek | 50 |
| Serce | Kardiomiopatia: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pogrubiona ściana serca, ▪ zmiany w zapisie EKG (niski woltaż zespołów QRS) ▪ zmniejszona pojemność minutowa serca | 60 |
| | Cholestatyczne uszkodzenie wątroby: <ul style="list-style-type: none"> ▪ hepatomegalia (> 15 cm) – twarda, nietkliwa wątroba ▪ znacznie podwyższona aktywność alkaicznej fosfatazy przy jednoczesnym nieznacznym wzroście poziomu aminotransferaz | 25 |
| Wątroba | Złogi amyloidowe najczęściej zlokalizowane w obrębie zatok wątrobowych. | |
| | Neuropatia obwodowa: <ul style="list-style-type: none"> ▪ symetryczna czuciowo-ruchowa obwodowa neuropatia kończyn dolnych | 20 |
| Układ nerwowy | Neuropatia układu autonomicznego: <ul style="list-style-type: none"> ▪ zaburzenia perystaltyki żołądka, ▪ pseudozaparcia ▪ zaburzenia mikcji ▪ niedociśnienie ortostatyczne | 15 |
| | <ul style="list-style-type: none"> ▪ powiększenie języka (objaw patognomiczny) ▪ zmiany skórne w tym krwihak okularowy ▪ artropatia ▪ chromanie przestankowe (złogi amyloidu w naczyniach), ▪ powiększenie węzłów chłonnych ▪ zespół cieśni nadgarstka | 10 |
| Tkanki miękkie | | |

1.4.4 Choroba depozytów białkowych z łańcuchów lekkich (LCDD).

Innym przykładem choroby, w której dochodzi do odkładania się w tkankach złogów białkowych utworzonych z łańcuchów lekkich immunoglobulin jest choroba depozytów białkowych łańcuchów lekkich (LCDD – *ang. light chain deposition disease*). Patologiczne złogi białkowe nie przybierają charakterystycznej, uporządkowanej formy włókien fibrylarnych, lecz odkładają się w tkankach w postaci amorficznych struktur. Tego typu amorficzne struktury nie wiążą czerwieni Kongo oraz nie oddziałują z tioflawiną. Zauważono również, iż amorficzne agregaty białkowe nie zawierają komponenty P [61]. Podobnie jak AL amyloidoza, LCDD związana jest często z występowaniem szpiczaka mnogiego (58% przypadków LCDD związana jest z objawowym szpiczakiem mnogim, 17% z MGUS - *monoclonal gammopathy of undetermined significance* [62]). Znamienne jest, że w przebiegu choroby LCDD w większości przypadków produkowane są łańcuchy lekkie kappa. Według danych niektórych badaczy udział łańcuchów lekkich kappa w tworzeniu depozytów białkowych w przebiegu LCDD sięga 92%. Są to głównie łańcuchy lekkie podtypu κ IV [63]. Jest to kolejna cecha różnicująca chorobę depozytów białkowych od amyloidozy AL z uporządkowanymi fibrylarnymi złogami białkowymi, gdzie patologiczny klon komórek plazmatycznych zwykle produkuje łańcuchy lekkie typu lambda.

W badaniach autopsyjnych wykonanych w grupie 57 osób zmarłych na skutek niewydolności nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego, Ivanyi i wsp. [64] wykazali u 5% z nich obecność złogów białkowych charakterystycznych dla LCDD. 11 % badanych miało w nerkach złogi amyloidowe, a w 32% przypadkach zdiagnozowano nefropatię wałeczkową. Z przytoczonych danych widać, że choroba LCDD jest stosunkowo rzadkim powikłaniem szpiczaka mnogiego. Choroba ta 2.5 raza częściej dotyka mężczyzn, zaś mediana wieku pacjentów, u których zdiagnozowano LCDD wynosi 58 lat. Najważniejsze cechy kliniczne i manifestacje LCDD zostały zebrane w tabeli 3.

Czasem u pacjentów ze szpiczakiem mnogim, u których uprzednio nie zaobserwowano oznak deponowania łańcuchów lekkich w tkankach, LCDD rozwija się w okresie nawrotu choroby, jako skutek uboczny zastosowanej chemioterapii. Cytostatyki, stosowane u pacjentów z różnymi postaciami gammopatii monoklonalnej, indukują mutacje i w ten sposób mogą przyczynić się do powstania cząsteczek immunoglobulin wykazujących nieprawidłowości strukturalne [64].

Depozyty białkowe w przebiegu LCDD odkładają się głównie w nerkach. Procesowi temu towarzyszy białkomocz (nierzadko >3 g/dobę) oraz krwiomocz. U większości pacjentów z LCDD funkcja nerek gwałtownie pogarsza się, co związane jest z postępującym zapaleniem kłębuszków nerkowych lub ostrym cewkowo-śródmiażdżowym zapaleniem nerek wywołanym cytotoksycznym działaniem odkładających się w mięszu nerek łańcuchów lekkich. Niewydolność nerek pojawia się w tej grupie pacjentów bardzo często (>90% przypadków), bez względu na stężenie monoklonalnych łańcuchów lekkich we krwi [65]. Gulliermo i wsp. [42], próbując wyjaśnić patomechanizm toksycznego działania łańcuchów lekkich na nerki, zaproponowali istnienie w komórkach mezangialnych kłębuszka nerkowego

receptora, z którym łączą się łańcuchy lekkie uruchamiając kaskadę zmian prowadzących do wytworzenia charakterystycznego obrazu histopatologicznego.

Okazuje się, że różny jest wpływ na tkanki złogów białkowych uformowanych w włókna fibrylarne oraz tworzących amorficzne agregaty. W badaniach na nerkowych komórkach mezangium wykazano, że gdy komórki te były inkubowane z łańcuchami lekkimi od chorych z LCDD następował wzrost aktywności czynników proliferacyjnych (np. transformującego czynnika wzrostu beta - TGF β) z towarzyszącym mu spadkiem aktywności proteaz (np. kolagenazy IV lub metaloproteinazy 7). W rezultacie tych zmian obserwowano wzrost produkcji białek zewnątrzkomórkowej macierzy mezangialnej (kolagenu typu IV, lamininy, fibronektyny) oraz apoptozę komórek. Gdy komórki mezangium były inkubowane z łańcuchami od chorych z AL efekt był przeciwny. Wzrastała aktywność kolagenazy IV, natomiast aktywność TGF β oraz stężenie białek substancji międzykomórkowej malało. Włókna uporządkowanego amyloidu w przebiegu AL amyloidozy zastępują macierz międzykomórkową komórek mezangium, natomiast proliferacja substancji międzykomórkowej w przebiegu LCDD prowadzi do wytworzenia charakterystycznych zmian guzkowych niebarwiących się czerwienią Kongo oraz tioflawiną, które w badaniach immunomorfologicznych z surowicami anty- κ lub anty- λ wykazują silne świecenie. Jest ono widoczne najczęściej w kłębuszkowych błonach podstawnych oraz błonie podstawnej cewek nerkowych [66].

Mediana przeżycia w LCDD wynosi 4 lata. Schyłkowa niewydolność nerek wymagająca zastosowania dializoterapii rozwija się zwykle w okresie krótszym niż 3 lata od momentu rozpoznania [42]. W tabeli 3 zabrano najważniejsze cechy charakteryzujące chorych z chorobą depozytów łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Bez względu na formę, jaką przyjmują złogi białkowe oraz typ oddziaływań z komórkami zajętego organu, ich obecność zawsze powoduje upośledzenie funkcji zajętego narządu. Zdefiniowanie czynników i mechanizmów prowadzących do rozwoju chorób związanych z odkładaniem się w tkankach wolnych łańcuchów lekkich, czy z ich bezpośrednim działaniem toksycznym na tkanki jest niezwykle istotne w kontekście odpowiedniego leczenia, a tym samym poprawy jakości i przedłużenia życia pacjentów.

Tabela 3 Charakterystyka chorych z chorobą depozytów białkowych z łańcuchów lekkich immunoglobulin – LCDD (wg. Jimenez-Zepeda)[⁶²]

| | |
|---|----------------|
| Mediana wieku pacjentów | 58 lat |
| Współczynnik płci (mężczyźni:kobiety) | 2.5 |
| Nadciśnienie (% chorych, u których wystąpił dany objaw) | 53% |
| Krwimocz (% chorych, u których wystąpił dany objaw) | 45% |
| Mediana stężenia kreatyniny w momencie diagnozy [$\mu\text{mol/L}$] | 232 |
| Mediana dobowego wydalania białka z moczem w momencie diagnozy (g/dzień) | 3.74 |
| Obecność białka monoklonalnego (surowica lub mocz) | 88% |
| Pacjenci z łańcuchami typu kappa | 92% |
| Pacjenci ze szpiczakiem mnogim | 50-58% |
| Najczęściej zajęte organy (% chorych z zajęтым organem): | |
| ▪ nerki | 93-100% |
| ▪ wątroba | 23% |
| ▪ obwodowy układ nerwowy (polineuropatia) | 20% |

1.4.5 Czynniki wpływające na tworzenie się depozytów łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Tworzenie nierozpuszczalnych struktur z białka, które pierwotnie ma formę rozpuszczalną jest procesem złożonym, a jego molekularne podłoże nie jest jeszcze do końca poznane. Fakt, że u chorych z amyloidozą nawet po przeszczepie zajętego narządu ponownie dochodzi do tworzenia się złogów białkowych świadczy, że patomechanizm tworzenia depozytów białkowych nie jest związany wyłącznie z samym zajęтым organem. Wiadomo również, że nie zawsze w przebiegu gammapatii monoklonalnych dochodzi do tworzenia się amyloidowych lub amorficznych złogów, co sugeruje konieczność szukania odpowiedzi na pytanie o patomechanizm tworzenia złogów białkowych w strukturze samego białka. Z drugiej strony próby wytworzenia z prekursorów białkowych włókien fibrylarnych czy amorficznych złogów w warunkach *In vitro* nie zawsze kończą się powodzeniem. Stąd wniosek, że na proces tworzenia złogów białkowych składa się wiele różnych czynników, obejmujących przede wszystkim interakcje między środowiskiem i samym białkiem [4]. Tworzenie złogów białkowych związane jest najprawdopodobniej z oddziaływaniami pomiędzy eksponowanymi w częściowo sfałdowanym białku hydrofobowymi resztami aminokwasowymi. Wyodrębnienie w pierwszorzędowej strukturze białka specyficznych fragmentów, które w szczególny sposób pretendują do tworzenia agregatów, jest bardzo trudne ze względu na dużą zmienność strukturalną, jaka charakteryzuje cząsteczki FLC.

Cechą wspólną białek będących prekursorami włókien amyloidowych jest obecność struktury beta. Badanie struktury krystalicznej łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazało, że zarówno część zmienna, jak i część stała łańcuchów są cząsteczkami białkowymi bogatymi w strukturę beta. Region zmienny łańcuchów lekkich immunoglobuliny IgG składa się z wysoce konserwatywnych regionów zrębowych utworzonych przez antyrównoległe struktury o konformacji beta oraz trzech pętli zawierających region warunkujący dopasowanie przeciwciała do antygeny. Dwie struktury beta kartki stanowiące najbardziej hydrofobową wewnętrzną część domeny, utworzone są przede wszystkim przez aminokwasy o charakterze hydrofobowym. Aminokwasy hydrofilowe tworzą konserwatywne mostki wodorowe z innymi resztami hydrofilowymi lub ze szkieletem polipeptydowym, co zapewnia stabilność całej struktury. Dwie antyrównoległe struktury beta kartki stabilizowane są dodatkowo przez mostek disiarczkowy, który tworzą: reszta cysteinowa w pozycji 23 oraz reszta cysteinowa w pozycji 88. Ponieważ aminokwasy w hydrofobowym wnętrzu białka są ściśle upakowane, nie bez znaczenia dla stabilności całego białka jest kształt i rozmiar reszt aminokwasowych tworzących hydrofobowy rdzeń. Część zmienna stabilizowana jest dodatkowo przez mostek solny utworzony przez kwaśną resztę kwasu asparaginowego w pozycji 82 oraz zasadową resztę argininy w pozycji 61 [67].

Pośród białek, które mogą być zaangażowane w patomechanizm chorób związanych z odkładaniem się w tkankach depozytów białkowych u ludzi, łańcuchy lekkie wyróżniają się największą zmiennością dotyczącą sekwencji aminokwasowej. Region zmienny łańcuchów lekkich (V_L), a w szczególności jego fragment zwany regionem warunkującym dopasowanie

(CDR), jest unikalny dla każdego klonu komórek plazmatycznych i stanowi miejsce szczególnie podatne na powstawanie w nim mutacji. Łańcuchy lekkie immunoglobulin posiadają średnio 10-12 substytucji aminokwasowych w stosunku do białka, które powstałoby jako produkt genu macierzystego [68]. Ta zmienność w budowie części zmiennej łańcuchów lekkich immunoglobulin wpływa na różną tendencję do agregacji. Produkty pewnych klonów komórek plazmatycznych mają szczególną tendencję do tworzenia złogów amyloidowych, podczas gdy łańcuchy lekkie innych klonów pozostają rozpuszczone w roztworach wodnych. Pomimo, że molekularne podstawy tworzenia amyloidowych włókien fibrylarnych czy amorficznych złogów łańcuchów lekkich nie są jeszcze do końca poznane, zauważono pewne reguły. Patogeneza amyloidozy AL, gdzie depozyty białkowe mają strukturę uorganizowanych włókien, oraz choroby depozytów łańcuchów lekkich (LCDD), gdzie występują amorficzne depozyty białkowe, często związana jest z występowaniem gammapatii monoklonalnej. Fakt, iż łańcuchy lekkie immunoglobulin odpowiedzialne za tworzenie depozytów białkowych są produktem jednego klonu, identycznym w kontekście ich sekwencji aminokwasowej, zainspirował badaczy do poszukiwania odpowiedzi na pytanie o czynniki wywołujące zwiększoną tendencję białka do agregacji w jego strukturze pierwszorzędowej [69]. Wyróżniono sekwencje aminokwasowe wspólne dla wielu rodzajów prekursorów amyloidu łańcuchów lekkich [70]. Bazując na współczesnej wiedzy, amyloidozę łańcuchów lekkich, można uważać za chorobę konformacyjną.

Badania nad częstością występowania amyloidozy w obrębie poszczególnych podtypów łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazały, iż prawie wszystkie podtypy mogą być zaangażowane w tworzenie depozytów białkowych. Łańcuchy lekkie lambda są częściej zaangażowane w tworzenie złogów amyloidowych o uporządkowanej strukturze w przebiegu amyloidozy AL. W tym kontekście warto wspomnieć, że łańcuchy lekkie typu lambda mają większą tendencję do tworzenia dimerów oraz różnego rodzaju oligomerów w porównaniu do łańcuchów typu kappa. Są wolniej wydalane przez nerki, co również może mieć znaczenie dla tworzenia fibrylarnych włókien amyloidowych [71]. Podtypem łańcuchów lekkich lambda o zwiększonej tendencji do tworzenia amyloidowych depozytów białkowych jest podtyp λ IV. Łańcuchy lekkie kappa natomiast dwa razy częściej niż łańcuchy lekkie lambda są zaangażowane w tworzenie amorficznych złogów białkowych, w przebiegu choroby depozytów łańcuchów lekkich (LCDD) [70]. Nie odkryto podtypów łańcuchów lekkich kappa, które cechowałyby wyjątkową zdolność do tworzenia agregatów, chociaż wydaje się, że rzadki podtyp κ IV wykazuje zwiększoną tendencję do tworzenia granularnych złogów białkowych [72]. Wspomniany podtyp κ IV odróżnia się od pozostałych dłuższą pętlą utworzoną przez pierwszy rejon determinujący dopasowanie (CDR1) zawierający hydrofobowe reszty aminokwasowe.

Agregaty łańcuchów lekkich immunoglobulin w przebiegu AL amyloidozy są w głównej mierze zbudowane z części zmiennych łańcuchów lekkich. W ostatnich pracach pojawiają się również doniesienia o złogach białkowych utworzonych przez kompletne

cząsteczki łańcuchów lekkich. W przebiegu LCDD granularne złogi zawsze utworzone są z całych cząsteczek łańcuchów lekkich, a u części pacjentów obecne są dodatkowo ich fragmenty [71].

W modelowym eksperymencie z wykorzystaniem rekombinowanych łańcuchów λ wykazano, że stabilność fragmentów łańcuchów lekkich (LC – *light chains*) zmienia się w szeregu: $V_L < \text{cała cząsteczka LC} < C_L$. Zatem część stała łańcucha lekkiego pełni rolę stabilizującą całą cząsteczkę łańcucha, natomiast część zmienna może wpłynąć destabilizująco na tę cząsteczkę [73]. Sytuacja, gdy mutacja w części zmiennej łańcuchów lekkich immunoglobulin powoduje wyeksponowanie części hydrofobowej, może spowodować destabilizację drugorzędowej struktury białka i być przyczyną nabrania przez to białko cech amyloidogenności lub pojawienia się tendencji do tworzenia amorficznych agregatów danego białka. Jednym ze spektakularnych przykładów, kiedy zamiana jednego aminokwasu w konserwatywnej części sekwencji aminokwasowej łańcuchów lekkich immunoglobulin wywołuje nabranie cech amyloidogenności jest zamiana konserwatywnej proliny w pozycji 40 na leucynę [68]. W jednej z prac nad wpływem pierwszorzędowej struktury łańcuchów lekkich immunoglobulin na ich tendencję do tworzenia złogów amyloidowych zidentyfikowano kilka kolejnych pozycji oraz reszt aminokwasowych, które odróżniają białka związane z tworzeniem amyloidu od białek niewykazujących tendencji do tworzenia włókien fibrylarnych. Okazuje się, że mostek solny, który zwykle utworzony jest pomiędzy Arg-61 oraz Asp-82 dwóch regionów zrębowych części zmiennej łańcuchów lekkich immunoglobulin ma kluczowe znaczenie dla stabilności cząsteczek tego białka. Mutacje powodujące zastąpienie jednej z reszt aminokwasowych tworzących mostek solny, prowadzą do destabilizacji całego białka. Zastąpienie Arg-61 neutralną resztą aminokwasową jak np. Asn prowadzi *in vitro* do tworzenia się włókien fibrylarnych, natomiast zastąpienie Asp-82 neutralną resztą aminokwasową jak np. Leu prowadzi do tworzenia amorficznych złogów białkowych [74]. Fakt, że zastąpienie Asp-82 przez Leu prowadzi do destabilizacji łańcuchów lekkich immunoglobulin i tworzenia amorficznych złogów białkowych w tkankach został także potwierdzony w badaniach *in vivo* [75]. Powyższe eksperymenty zaowocowały spostrzeżeniem, iż sekwencja pierwszorzędowa łańcuchów lekkich tworzących złogi białkowe ma wpływ nie tylko na samo zjawisko powstawania depozytów w tkankach, ale także na ich morfologię [74]. Jednakże ogromna różnorodność pierwszorzędowej struktury monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin otrzymanych od różnych pacjentów utrudnia identyfikację sekwencji aminokwasowej, która w szczególny sposób byłaby odpowiedzialna za nabranie przez białko cech amyloidogenności czy pojawienia się tendencji do tworzenia amorficznych agregatów. Spostrzeżenie, iż niezależnie od czynników środowiskowych pewne łańcuchy lekkie mają tendencję do tworzenia amyloidu bardzo dobrze ilustrują wyniki eksperymentu, w którym myszom, wstrzyknięto dootrzewnowo łańcuchy lekkie otrzymane od pacjentów z amyloidową i w konsekwencji zaobserwowano tworzenie oraz odkładanie w tkankach włókien amyloidowych zbudowanych z ludzkich łańcuchów lekkich oraz mysiej komponenty P. Gdy wstrzykiwane były łańcuchy lekkie

otrzymane od pacjentów bez złogów amyloidowych, nie obserwowano tworzenia się włókien fibrylarnych [57].

Jednak nie tylko zmiany w pierwszorzędowej strukturze białka mogą wywoływać zapoczątkowanie procesu amyloidogenezy czy tworzenia amorficznych złogów białkowych. Inkubacja łańcuchów lekkich niewykazujących tendencji do tworzenia złogów amyloidowych z krótkimi włóknami fibrylarnymi, może być początkiem tworzenia amyloidu. Badania nad kinetyką tworzenia złogów amyloidowych zaowocowały spostrzeżeniem, że tworzenie włókien fibrylarnych z rozpuszczalnych prekursorów jest znacznie przyspieszone w obecności tzw. zarodków. W nieobecności zarodków etapem ograniczającym szybkość tworzenia włókien amyloidowych jest tworzenie wspomnianych krótkich włókien fibrylarnych, które z kolei determinowane jest przez stężenie prekursorów obecnych w środowisku reakcji [76].

Fakt, iż amorficzne złogi amyloidowe czy uporządkowane włókna fibrylarne w przeważającej większości zlokalizowane są zewnątrzkomórkowo, wzmacnia hipotezę, że formowanie depozytów białkowych może być wyzwalane przez czynniki środowiskowe. Białka nieprawidłowo sfałdowane nie są uwalniane poza komórkę, lecz są degradowane we wnętrzu komórki. Mogą również tworzyć wewnątrzkomórkowe agresomy. Zjawisko to zostało zaobserwowane dla amyloidogennych łańcuchów lekkich SMA będących produktem linii komórkowej COS-1. Łańcuchy lekkie SMA nie były uwalniane na zewnątrz, natomiast dalsze badania wykazywały ich obecność w przyjądrowych agresomach. Jeśli podobna sytuacja zaistnieje w organizmie żywym agresomy powodują śmierć komórki oraz uwolnienie zagregowanego białka na zewnątrz [70].

Prawdopodobnie większość monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin ma wewnętrzny potencjał tworzenia depozytów białkowych. Dane na temat nabrania przez nie-amyloidogenne łańcuchy lekkie zdolności do tworzenia złogów białkowych po wcześniejszej proteolizie zdają się potwierdzać tę hipotezę. Jednakże brak korelacji pomiędzy tworzeniem włókien fibrylarnych *ex vivo* i pojawieniem się złogów białkowych ze sztucznie wytworzonych fragmentów łańcuchów lekkich w tkankach [77] sugeruje niebagatelną rolę, jaką odgrywają czynniki środowiskowe - niezbędne, żeby zapoczątkować odkładanie się białka w tkankach. Jednym z tego typu czynników jest odwodnienie. Zauważono, że 48 - godzinne pozbawienie myszy wody znacznie przyspieszało tworzenie się złogów z łańcuchów lekkich wyizolowanych od pacjentów z amyloidozą [57].

pH środowiska to kolejny czynnik pełniący ważną rolę w procesie tworzenia depozytów białkowych. Fibrylarna czy amorficzna struktura złogów białkowych z łańcuchów lekkich ma związek z punktem izoelektrycznym tworzących je prekursorów. Punkt izoelektryczny łańcuchów lekkich otrzymywanych z zajętych przez proces tworzenia złogów tkanek pacjentów z AL amyloidozą mieści się w granicach 3.8 – 5.2. Podczas gdy białka tworzące złogi w LCDD mają bardziej zasadowy charakter. Opisano jednak nieliczne przypadki, gdy białka tworzące złogi w amyloidozie AL mają charakter zasadowy. Najprawdopodobniej biochemiczne przyczyny, które powodują, że depozyty białkowe łańcuchów lekkich

przyjmują postać uporządkowanych lub amorficznych złogów są o wiele bardziej skomplikowane niż proste zależności z związane z punktem izoelektrycznym.

Opisano przypadek pacjenta, u którego obok tworzenia depozytów białkowych łańcuchów lekkich w tkankach (amyloidoza AL, fibrylarne złogi białkowe), łańcuchy lekkie wydalone były także z moczem. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że zarówno białko tworzące depozyty (nierozpuszczalne) jak i białko wydalone z moczem (rozpuszczalne) jest N-końcowym fragmentem regionu zmiennego podtypu III łańcuchów lekkich kappa. Zaskakujący wydaje się być fakt, że *in vitro* w środowisku o fizjologicznym pH (7.4) rozpuszczalne białko BJ nie tworzyło uporządkowanych złogów amyloidowych, zaobserwowano natomiast tworzenie amorficznych agregatów. Podobnie w pH 6.5 łańcuchy lekkie tworzyły agregaty o strukturze amorficznej. Dopiero zastosowanie środowiska kwaśnego (pH 4.5; 5.5) umożliwiło otrzymaniem włókien fibrylarnych [78]. Opisane doświadczenia sugerują wpływ na tworzenie *in vivo* oraz postać złogów białkowych kolejnego, innego niż pH, czynnika.

Zmniejszona zdolność nerek do przesączania łańcuchów lekkich immunoglobulin ma wpływ na tworzenie złogów białkowych w nerce. Badania przeprowadzone grupie 137 pacjentów z amyloidozą AL wykazały, że po zastosowaniu chemioterapii u 50% pacjentów dochodziło do spadku stężenia łańcuchów lekkich we krwi oraz regresję depozytów amyloidowych [79]. Sugeruje to wpływ stężenia prekursorów na nasilenie procesu amyloidogenezy.

Jedna z hipotez powstawania złogów białkowych sugeruje, że prekursorami amyloidów stają się białka, które przyjmują konformację charakterystyczną dla częściowo sfałdowanych cząsteczek. Badania nad częścią zmienną rekombinowanych amyloidogennych łańcuchów lekkich SMA wykazały, że mogą one przybierać dwojakiemu rodzaju częściowo sfałdowaną strukturę. Struktura, która nieznacznie różni się od struktury cząsteczek białka natywnego, w przeważającej większości prowadzi do powstawania złogów amorficznych. Prekursorem włókien fibrylarnych zaś jest forma łańcuchów lekkich SMA o wysoce niestabilnej konformacji [80].

1.5 Oznaczanie łańcuchów lekkich oraz wolnych łańcuchów lekkich (FLC) w diagnostyce laboratoryjnej.

1.5.1 Gammapatie monoklonalne.

Zwiększona produkcja monoklonalnych łańcuchów lekkich należących do jednego z typów FLC jest charakterystyczna dla chorób z grupy gammapatii monoklonalnych. W niektórych wariantach szpiczaka mnogiego łańcuchy lekkie immunoglobulin są jedynym fragmentem immunoglobuliny produkowanej przez nowotworowy klon komórek plazmatycznych. Już odkrywca łańcuchów lekkich immunoglobulin – Henry Bence-Jones zwrócił uwagę na istnienie zależności między obecnością w moczu odkrytego przez siebie białka i chorobą określaną wtedy jako słabość i kruchość kości. Metoda wykrywania białka Bence-Jonesa w moczu (obserwacja wytrącającego się pod wpływem ogrzewania próbki osadu) ma już tylko historyczne znaczenie. Współcześnie powszechnie używane są różne warianty metod elektroforetycznych, a ostatnimi czasy coraz większe znaczenie uzyskują metody immunochemiczne wykorzystujące nefelometrię i turbidymetrię. Wśród systemów elektroforetycznych zasadnicze znaczenie dla wykrywania szpiczaka mnogiego ma klasyczna elektroforeza na żelu agarozowym. Rozdzielając białka surowicy z użyciem elektroforezy stwierdza się obecność monoklonalnej frakcji u ok. 80% pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Wąski odgraniczony prążek lokujący się we frakcji gamma nie sprawia trudności interpretacyjnych nawet dla niewprawnego obserwatora. Jednak w przypadku, gdy strefa białkowa zlokalizowana jest nietypowo – blisko frakcji beta, w obrębie frakcji beta lub frakcji alfa₂ globulin, konieczne staje się sięgnięcie do innych wariantów elektroforezy – elektroforezy o podwyższonej rozdzielczości (*HRE – high resolution electrophoresis*) lub immunofiksacji surowicy.

Pomimo, że wymienione narzędzia diagnostyczne często są wystarczające do postawienia prawidłowej diagnozy, według niektórych autorów istnieje również konieczność oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w moczu [^{42,81}]. Wśród chorych na choroby z grupy gammapatii monoklonalnych, 15% stanowią pacjenci ze szczególnym wariantem choroby – tzw. chorobą łańcuchów lekkich [⁸²]. Charakterystyczną manifestacją tego zaburzenia jest produkowanie przez nowotworowo rozrastające się komórki plazmatyczne wyłącznie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Ze względu na krótki okres półtrwania we krwi, który charakteryzuje FLC, zmiany białkowe związane z chorobą są łatwiejsze do uchwycenia w moczu pacjenta. Dlatego w panelu badań diagnostycznych powinna znaleźć się również elektroforeza białek moczu. W laboratoriach rutynowych stosuje się wiele wariantów metod elektroforetycznych mogących służyć do wykrywania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu. Metodą referencyjną jest elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (ryc. 6). Jest to też współcześnie najczęściej stosowana technika do wykrycia obecności białka Bence-Jonesa w moczu. Ponadto elektroforeza białek moczu jest jednym z elementów oceny funkcji nerek. Obok oszacowania ilości wydalanych z moczem łańcuchów lekkich, umożliwia również ocenę

wydalanie z moczem innych białek (jak albumina czy kompletne cząsteczki immunoglobulin), a więc dostarcza informacji na temat integralności błony podstawnej kłębuszków nerkowych. Niewydolność nerek stanowi bezpośrednią przyczynę zgonów u ok. 25% chorych na choroby z grupy gammapatii monoklonalnych [42]. Dlatego monitorowanie funkcji tego narządu wydaje się być bardzo ważnym elementem opieki nad pacjentem cierpiącym na chorobę z grupy gammapatii monoklonalnych oraz bardzo ważnym parametrem prognostycznym.

Ze względu na ograniczoną czułość diagnostyczną stosowanych metod elektroforetycznych, zaistniała potrzeba stworzenia nowego testu do diagnostyki gammapatii monoklonalnych. Nowy test byłby pomocny w sytuacjach, gdy rutynowa elektroforeza, immunofiksacja czy nefelometryczne oznaczanie związanych łańcuchów lekkich nie są wystarczające do postawienia prawidłowej diagnozy. Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin z wykorzystaniem metody nefelometrycznej pojawiło się stosunkowo niedawno wśród badań wykonywanych u pacjentów cierpiących na schorzenia z grupy gammapatii monoklonalnych. Test ten wykazuje pewną wyższość w stosunku do metod elektroforetycznych czy oznaczania łańcuchów lekkich związanych z immunoglobuliną. Krótszy okres półtrwania (2-6 h) charakteryzujący wolne łańcuchy lekkie w stosunku do kompletnej cząsteczki immunoglobuliny (IgG – ok. 21 dni) lub łańcuchów lekkich związanych, czyni ten test bardziej adekwatnym do oceny odpowiedzi pacjenta na leczenie. Wyższa czułość testu pozwala również na wczesne zdiagnozowanie pacjentów, u których po okresie remisji dochodzi do wznowy choroby [83]. Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich metodą nefelometryczną wykazuje także przydatność w diagnostyce chorych na szpiczaka niewydzielniczego, gdzie kompletna cząsteczka immunoglobuliny lub wolne łańcuchy lekkie występują w krwi lub moczu w stężeniach poniżej wykrywalności metodami elektroforetycznymi.

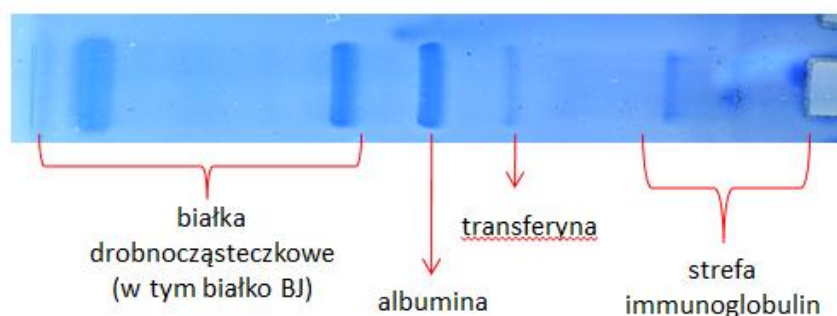
Stężenie poliklonalnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda może być podwyższone w chorobach reumatycznych, czy innych jednostkach chorobowych, którym towarzyszy aktywacja komórek plazmatycznych (hipergammaglobulinemie). Narzędziem umożliwiającym uniknięcie błędnego przypisania podwyższonej wartości stężeń łańcuchów lekkich spowodowanych nadprodukcją poliklonalnych immunoglobulin do objawów gammapatii monoklonalnych jest obliczenie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do wolnych łańcuchów lekkich lambda. W chorobach charakteryzujących się monoklonalnym rozrostem komórek plazmatycznych stosunek wolnych łańcuchów κ/λ (*free κ /free λ*) jest podwyższona lub obniżona w odniesieniu do wartości referencyjnej dla tego parametru. Nieprawidłowy stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa i lambda jest również czynnikiem prognostycznym rozwoju gammapatii monoklonalnej o niekreślonym znaczeniu (MGUS) czy bezobjawowego („tłącego się”) szpiczaka w kierunku choroby pełnoobjawowej [26]. Co więcej, nefelometryczne oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy pozwala ominąć wszelkie problemy, które związane są z koniecznością zebrania dobowej zbiórki moczu. Jednak pomimo niewątpliwych zalet omawianego testu i wysokiej użyteczności w laboratoriach klinicznych, w praktyce laboratoryjnej obserwuje się

pewne niespójności analityczne związane z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich. Trwają badania nad wyjaśnieniem przyczyn wspomnianych niespójności. Poszerzenie podstawowej wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych łańcuchów lekkich zaangażowanych w patogenezę chorób z grupy gammapatii monoklonalnych może być pomocne w wyjaśnieniu budzących wątpliwość diagnosty czy klinicysty wyników oznaczenia FLC, a więc zwiększyć przydatność omawianego badania.

Proces asocjacji łańcuchów lekkich i ciężkich w trakcie syntezy immunoglobulin zachodzi w retikulum endoplazmatycznym komórek plazmatycznych. Istnieją dowody na to, że struktura łańcucha ciężkiego jednoznacznie determinuje typ łańcucha lekkiego, z którym się łączy. Wydaje się, że łańcuchy ciężkie wykazują większą skłonność do przyłączania łańcuchów lekkich kappa. Zjawisko to, o nie do końca poznanym mechanizmie, tłumaczy wyższe od jedności (1.35 – 2.65) wartości stosunku stężeń łańcuchów kappa do lambda, gdy są one związane z łańcuchem ciężkim w kompletnej cząsteczce immunoglobuliny. Natomiast wolne łańcuchy lekkie lambda we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz ślinie ludzi zdrowych występują w wyższym stężeniu niż wolne łańcuchy lekkie kappa. W moczu zdrowego człowieka obserwuje się odwrotne zjawisko – stężenie wolnych łańcuchów lekkich kappa jest wyższe niż stężenie wolnych łańcuchów lekkich lambda. Okres półtrwania wolnych łańcuchów lekkich kappa w porównaniu do okresu półtrwania wolnych łańcuchów lekkich lambda we krwi jest krótszy. Za tym idzie szybsze usuwanie przez nerki do moczu wolnych łańcuchów lekkich kappa. Jest to najprawdopodobniej konsekwencją różnic w czwartorzędowej budowie łańcuchów lekkich kappa i lambda [8]. Wolne łańcuchy lekkie kappa występują najczęściej w postaci monomeru lub/i niekowalencyjnie związanego dimeru, natomiast wolne łańcuchy lekkie lambda najczęściej występują w postaci kowalencyjnego dimeru. Opisane zjawiska mają swoje odzwierciedlenie w stworzonych wartościach referencyjnych dla łańcuchów lekkich immunoglobulin oraz wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin oznaczanych w surowicy oraz moczu (tabela 4).

Tabela 4 Wartości referencyjne dla stężeń łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy oraz moczu (*analizator Behring NEPHELOMETER II*)

| Nazwa testu | Zakres wartości referencyjnych | |
|---------------|--------------------------------|-------------------|
| | surowica | mocz |
| LC κ | 1.7 – 3.7 g/l | <7.099 mg/l |
| LC λ | 0.9 – 2.1 g/l | <3.899 mg/l |
| LC κ / LC λ | 1.35 – 2.65 | 0.75 – 4.5 |
| FLC κ | 3.3 – 19.4 mg/l | 1.35 – 24.19 mg/l |
| FLC λ | 5.71 – 26.3 mg/l | 0.24 – 6.66 mg/l |
| FLC κ / FLC λ | 0.26 – 1.65 | 2.04 – 10.37 |



Ryc. 6 Obraz elektroforezy białek moczu na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS prowadzonej w warunkach nieredukujących. Na obrazie widoczne łańcuchy lekkie immunoglobulin (białko BJ) migrujące w strefie białek drobnocząsteczkowych. Obok informacji na temat obecności/ braku białka BJ, SDS elektroforeza białek moczu pozwala uzyskać informacje na temat integralności błony kłębuszków nerkowych. Obecność wyraźnego prążka w strefie immunoglobulin jest wskaźnikiem znacznego uszkodzenia błony kłębuszków nerkowych.

1.5.2 Inne jednostki chorobowe

Istnieją również doniesienia o próbie zaadoptowania oznaczania łańcuchów lekkich w diagnostyce chorób innych niż choroby limfoproliferacyjne (głównie choroby z autoagresji). W badaniach prowadzonych w grupie pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) oraz pierwotnym zespołem Sjögrena wykazano podwyższone wartości wolnych łańcuchów lekkich w osoczu [84]. Podwyższony poziom FLC korelował z nasileniem stanu chorobowego u pacjentów z RZS oraz zajęciem dodatkowych narządów wewnętrznych u chorych z zespołem Sjögrena.

Oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich w płynie mózgowo-rdzeniowym ma znaczenie dla diagnostyki stwardnienia rozsianego, szczególnie u pacjentów na wczesnym etapie choroby [85]. Istnieją sugestie, że oznaczenie indeksu wolnych łańcuchów lekkich^{iv} kappa metodą nefelometryczną powinno stać się jednym z elementów algorytmu rozpoznawania stwardnienia rozsianego. W pozostałych chorobach neurologicznych, którym towarzyszy pojawienie się prążków oligoklonalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym, indeks wolnych łańcuchów lekkich kappa także może być podwyższony. Jednak zawsze towarzyszy mu wzrost indeksu wolnych łańcuchów lekkich lambda, co może być wykorzystane

^{iv} indeks wolnych łańcuchów lekkich – stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz wolnych łańcuchów lekkich w surowicy

w diagnostyce różnicowej MS [37]. Wykazano także, że podwyższony poziom wolnych łańcuchów lekkich koreluje z aktualnie toczącym się procesem demielinizacji. Wewnątrzoponowej syntezie oligoklonalnych immunoglobulin zawsze towarzyszy wewnątrzoponowa synteza wolnych łańcuchów lekkich. Ze względu na barierę krew - płyn mózgowo-rdzeniowy okres półtrwania wolnych łańcuchów lekkich w PMR jest porównywalny do okresu półtrwania innych białek. Dlatego nawet niewielki wzrost wolnych łańcuchów lekkich, syntetyzowanych wewnątrzoponowo razem z kompletną cząsteczką immunoglobuliny, znacznie zwiększy indeks wolnych łańcuchów lekkich [86]. Okazuje się, że immunofiksacja białek PMR uwidacznia obecność wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin jedynie u 8% pacjentów z ogólnoustrojową syntezą oligoklonalnych immunoglobulin. W przypadku niemożności porównania ogniskowania izoelektrycznego białek płynu mózgowo-rdzeniowego oraz surowicy, obecność oligoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w płynie mózgowo-rdzeniowym przemawia za wewnątrzoponową produkcją immunoglobulin [85]. Jednak brak jest dostępnych w literaturze badań na dużych grupach pacjentów, które pozwoliłyby w sposób realny ocenić przydatność oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w schorzeniach neurologicznych. Pomimo obiecujących wyników badań przeprowadzonych na niewielkich grupach pacjentów, jak do tej pory nie stworzono zakresu referencyjnego dla FLC oznaczanych w płynie mózgowo-rdzeniowym.

1.6 Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Pierwsze doniesienia o nietypowym wzorze migracji wolnych łańcuchów lekkich związane są z wprowadzeniem nowych technik diagnostycznych – immunofiksacji białek (IF) oraz elektroforezy wysokorozdzielczej na żelach agarozowych (HRE). Nowe techniki cechowała większa czułość w wykrywaniu niewielkiej ilości białek oraz użyteczność diagnostyczna w porównaniu do wcześniej stosowanych metod rozdzielania na octanie celulozy oraz immunoelektroforezy. Jednak napotymano również problemy interpretacyjne związane z pojawianiem się wzorów migracji białek w surowicy czy moczu, o których znaczeniu i przydatności w diagnozowaniu chorób początkowo niewiele było wiadomo. Dotyczyło to przede wszystkim obecnych w moczu wolnych łańcuchów lekkich. Ze względu na większą czułość nowych technik, w obszarze gamma globulin coraz częściej obserwowano prążki białkowe, niejednokrotnie układające się we wzór opisany później jako zjawisko tworzenia drabiny.

Zjawisko tworzenia drabin łańcuchów lekkich po raz pierwszy opisane zostało w pracy Harrisona, która zapoczątkowała dyskusję na temat etiologii oraz znaczenia diagnostycznego zjawiska występowania drabin FLC. [87] Sposób migracji łańcuchów lekkich immunoglobulin zwany drabiną najczęściej opisywany jest jako występowanie kilku (3-8) dobrze odgraniczonych i równomiernie rozmieszczonych prążków zlokalizowanych we frakcji gamma-globulin (HRE) lub reagujących z przeciwciałami o swoistości anty- κ lub anty- λ [88,89,90,91]. Według Harrisona wzór migracji prążków tworzących drabinę różni się u różnych pacjentami pod względem ilości prążków oraz ich intensywności. Występowanie drabin najczęściej wiązano z łańcuchami lekkimi typu kappa, chociaż odnotowano również przypadki, gdzie za powstanie charakterystycznego wzoru migracji łańcuchów lekkich składającego się z kilku prążków odpowiedzialne były łańcuchy kappa i lambda jednocześnie [87]. Jednak stężenie łańcuchów lekkich typu lambda w moczu było niższe, a prążki barwiły się słabiej [89]. Oszacowano, że zjawisko drabin 4-6 razy częściej związane jest z łańcuchami typu kappa [90,91].

Występowanie zjawiska drabin, opisywanego również jako „pseudooligoklonalny wzór migracji łańcuchów lekkich”, związane jest z poprawą czułości technik elektroforetycznych takich jak immunofiksacja białek moczu. W konsekwencji poliklonalne łańcuchy lekkie, zwykle wydalane w niewielkich ilościach do moczu, były uwidocznione na żelach. Obraz składający się z kilku prążków interpretowany był jako wynik klonalnych różnic w ładunku wolnych poliklonalnych łańcuchów lekkich. Ścisłej mówiąc, różnice w ładunku odnoszono do występowania czterech podtypów w obrębie łańcuchów kappa oraz sześciu podtypów w obrębie łańcuchów lambda. Podstawą do podziału na podgrupy jest występowanie znacznej homologii w sekwencji aminokwasowej tworzącej region zrębowy (FR1) łańcuchów lekkich immunoglobulin [10,11]. Hipoteza ta potwierdzona była przez dwa spostrzeżenia. Po pierwsze, wzór drabin łańcuchów lekkich pojawia się przede wszystkim u pacjentów, których schorzeniom towarzyszy wzrost wydzielania do moczu wolnych, poliklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Mogą to być pacjenci

z uszkodzeniem cewek nerkowych lub pacjenci z przewlekłymi chorobami zapalnymi. W pierwszej grupie pacjentów obserwuje się upośledzenie resorpcji zwrotnej białek drobnocząsteczkowych (w tym wolnych, poliklonalnych łańcuchów lekkich), a w drugiej grupie pacjentów ma miejsce wzrost syntezy poliklonalnych łańcuchów lekkich. Harrison i wsp. obserwowali wspomniany specyficzny wzór migracji u osób z chorobami takimi jak: zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) czy nadczynność tarczycy o podłożu autoimmunologicznym [90]. W pracy MacNamara i wsp. dla potwierdzenia, iż drabiny łańcuchów lekkich immunoglobulin związane są z obecnością w moczu poliklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin, u zdrowych ochotników wywołano przejściowy białkomocz cewkowy. Elektroforeza z immunofiksacją potwierdziła, iż białkiem dającym charakterystyczny obraz kilku równo oddzielonych od siebie prążków są poliklonalne wolne łańcuchy lekkie [89]. Drugim spostrzeżeniem potwierdzającym hipotezę o poliklonalnym pochodzeniu łańcuchów w obrazie drabin jest fakt, że zwiększając czułość metody elektroforetycznej (np. poprzez zagęszczenie moczu lub zastosowanie bardzo czułego barwienia złotem), można zaobserwować to zjawisko w większości poddanych rozdziałowi próbek. W tych przypadkach uwidocznione na żelu są poliklonalne łańcuchy lekkie, które w ilości ok. 10 mg/dobę wydzielane są do moczu u osób zdrowych [25]. Według MacNamara i wsp. ilość uwidoczniionych prążków tworzących drabinę łańcuchów lekkich zależy od czułości użytej metody oraz ilości wolnych łańcuchów w materiale [89].

Zjawisko drabin łańcuchów lekkich w kilku pracach łączone było z występowaniem białka Bence-Jonesa w moczu, w kontekście problemów interpretacyjnych, jakie mogą być wywołane maskowaniem niewielkich ilości monoklonalnych łańcuchów lekkich przez jeden z prążków drabiny. Niewielkie stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich występują w moczu pacjentów w początkowych stadiach gammapatii monoklonalnych, u pacjentów z MGUS, czy w przypadkach, w których po okresie remisji dochodzi do nawrotu choroby. Ponieważ wspomniani pacjenci często są w wieku podeszłym lub starszym, u których może występować upośledzenie funkcji cewek nerkowych, w moczu mogą pojawiać się również poliklonalne FLC [89,89, 90]. Wykrycie u tego typu osób patologicznego białka Bence-Jonesa ma nierzadko istotne znaczenie dla wczesnego i prawidłowego zdiagnozowania lub wykrycia wznowy choroby. Problem ten stanowił podstawowy kierunek badań nad zjawiskiem drabin. Niewielu autorów prac zajmowało się natomiast zjawiskiem drabin dotyczącym jedynie monoklonalnych, bez domieszki poliklonalnych, łańcuchów lekkich immunoglobulin. Tylko jedna praca opisuje przypadek migracji monoklonalnych łańcuchów lekkich w postaci kilku równomiernie rozłożonych i wyraźnie odgraniczonych prążków [92]. Opisanie tego zjawiska i próba odkrycia mechanizmów stojących u podstaw rozdzielanych elektroforetycznie różnych form molekularnych wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich wzbogaci wiedzę na temat monoklonalnych FLC.

2 Założenia i cel pracy.

Monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin to heterogenna grupa białek, które biorą udział w powstawaniu wielu procesów patologicznych. Jednym z elementów decydującym o powstawaniu toksycznych depozytów białkowych są własności fizykochemiczne i strukturalne poszczególnych klonów białkowych. Celem pracy jest przeprowadzenie charakterystyki różnych form molekularnych monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin a w szczególności zbadanie:

- zjawiska kowalencyjnej dimeryzacji monoklonalnych łańcuchów lekkich typu kappa i lambda;
- zmian stosunku dimer/monomer w dłuższym przedziale czasowym;
- częstości występowania niekowalencyjnych form oligomerycznych;
- zróżnicowania mas cząsteczkowych FLC wyznaczanych techniką elektroforezy SDS - PAGE;
- zjawiska charakterystycznego wzoru migracji FLC w rozdzielach elektroforetycznych (zjawisko drabin łańcuchów lekkich);
- modyfikacji reszty sulfhydrylowej cysteiny 214 w cząsteczkach łańcuchów lekkich typu kappa oraz lambda;
- profilu tiolacji - procentowego udziału cysteiny, cysteinyloglicyny, homocysteiny i glutationu w tworzeniu mieszanych disiarczków z cząsteczkami monoklonalnych FLC.

3 Pacjenci, materiały i metody.

3.1 Charakterystyka grupy badanej.

Grupę badaną stanowili pacjenci Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, u których zdiagnozowano choroby należące do grupy gammadopatii monoklonalnych. W toku rutynowej diagnostyki przebadano 163 pacjentów. U pacjentów tych wykonywane były następujące badania:

- elektroforeza białek surowicy na żelach agarozowych (141 pacjentów)
- immunofiksacja surowicy pacjenta na żelach agarozowych (87 pacjentów)
- elektroforeza białek moczu na żelach poliakrylamidowych z dodatkiem SDS w warunkach nieredukujących (163 pacjentów)
- nefelometryczne oznaczanie łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (34 pacjentów) i moczu (124 pacjentów).

Wykorzystując obrazy elektroforetycznego rozdziału białek moczu (SDS elektroforeza) zbadano częstość występowanie łańcuchów lekkich w postaci: wyłącznie dimeru, dimeru oraz monomeru, a także wyłącznie monomeru. Opierając się na wynikach nefelometrycznego oznaczania łańcuchów lekkich w surowicy i/lub moczu lub wyniku immunofiksacji surowicy, korelowano następnie występowanie łańcuchów lekkich w jednej z wymienionych form z typem łańcucha lekkiego. Dla 54 pacjentów stanowiących 33% grupy badanej możliwa była retrospektywna analiza odsetka dimeru/monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin z wykorzystaniem obrazów elektroforetycznego rozdziału białek moczu pacjentów otrzymanych w różnym czasie. Wykonywano analizy mające na celu stwierdzenie, czy odsetek dimeru/monomeru łańcuchów lekkich zmienia się w czasie.

W podgrupie pacjentów stanowiącej 27% grupy badanej (n=44) wykonano oznaczenie związków tiolowych związanych z łańcuchami lekkimi immunoglobulin. W wyborze pacjentów, których materiał posłużył do oznaczania stężenia związków tiolowych opierano się na obrazach rozdziału elektroforetycznego białek moczu na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS w warunkach nieredukujących. Wybrano pacjentów, których obrazy rozdziału białek moczu w systemie SDS elektroforezy spełniały następujące kryteria:

- obecność prążka/ków zlokalizowanych w strefie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (białka Bence Jonesa)
- odpowiednio wysokie (min. 1g/l) stężenie łańcuchów lekkich w moczu
- brak prążka lub niewielkiej intensywności prążek zlokalizowany w strefie albuminy
- brak prążka zlokalizowanego w strefie immunoglobulin.

Bardzo ważnym kryterium wyboru w tym przypadku była nieobecność albuminy w moczu. Powyższy warunek związany jest z faktem obecności wolnej cysteiny w pozycji 34 ludzkiej albuminy [⁹³].

Podobne kryterium wyboru podgrupy badanej zastosowano do analizy występowania form oligomerycznych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Do tego badania włączono również pacjentów o niższych stężeniach łańcuchów lekkich w moczu (<1g/l). Za pomocą wysokosprawnej chromatografii wykluczenia przebadano 53 pacjentów (32.5% grupy badanej; 31 kappa, 22 lambda).

W celu zbadania zróżnicowania mas cząsteczkowych dimeru oraz monomeru FLC wybrano preparaty łańcuchów lekkich, których rozdziały w elektroforezie SDS-PAGE charakteryzowały się ostro wyodrębnionymi frakcjami białkowymi. W tej podgrupie znalazło się 74 pacjentów stanowiących 45.4% grupy badanej.

Pacjenci wyrazili zgodę na wykorzystanie ich materiału dla potrzeb niniejszej pracy, badania zaś uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (nr zgody: KBET/161/B/2009).

3.2 *Materiały i metody.*

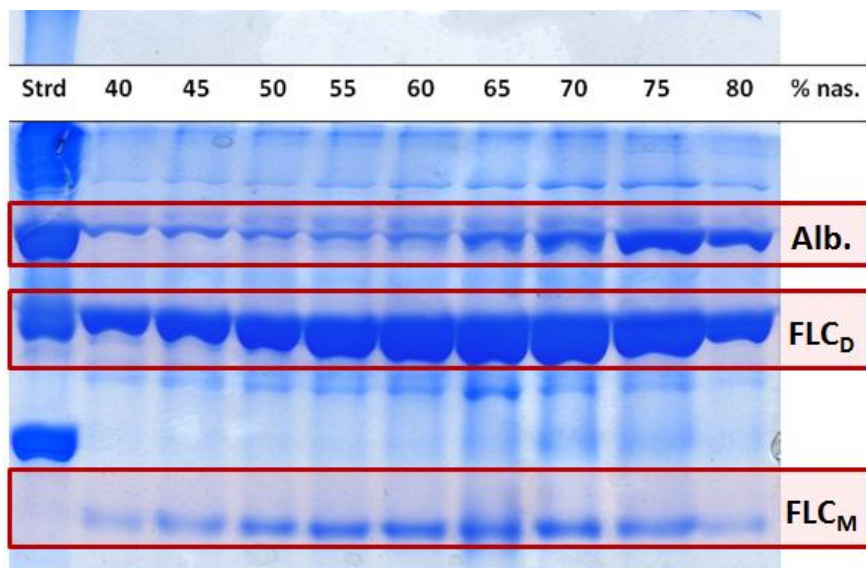
3.2.1 *Materiał badany.*

Materiałem badanym były poranne próbki moczu pacjentów z gammopatią monoklonalną pobrane metodą środkowego strumienia. Próbki moczu były natychmiast poddane analizie. Jeśli natychmiastowa analiza próbek nie była możliwa, były one przechowywane w temperaturze 4 °C do 24 godzin od momentu pobrania, następnie próbki były zamrażane i przechowywane w temperaturze -20 °C. Stwierdzono brak negatywnego wpływu zamrażania próbek moczu na jakość rozdzielców elektroforetycznych białek moczu wszystkimi stosowanymi metodami.

3.2.2 *Otrzymywanie liofilizowanych wolnych łańcuchów lekkich (FLC).*

Z próbek moczu pacjentów ze zdiagnozowaną gammopatią monoklonalną i białkomoczem Bence Jonesa, wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin zostały wyizolowane przy pomocy metody wysalania roztworem siarczanu amonowego. Wstępnie mocze pacjentów były wirowane (4 °C, 10 000g, 30 min), osad został odrzucony. Wszystkie etapy procedury wykonywane były w temperaturze 4 °C.

Do próbek moczu dodawano schłodzony (4°C) nasycony roztwór siarczanu amonu w takiej objętości, aby końcowe stężenie wynosiło ok. 60 % nasycenia. Stężenie nasyconego siarczanu amonu potrzebne do selektywnego wytrącenia łańcuchów lekkich z maksymalną wydajnością zostało ustalone eksperymentalnie (ryc. 7). Otrzymany osad wirowano (2000 g, 15 min, T= 4°C). Osad rozpuszczano ponownie w wodzie destylowanej. Procedurę wysalania powtarzano. Po ponownym rozpuszczeniu osadu roztwór dializowano wobec wody dejonizowanej (12 h), a następnie wobec buforu PBS o pH 7.4 (12 h) przy użyciu worków dializacyjnych SPECTRA/POR® firmy SERVA o wartości *cutoff* 10 kDa. W przypadku uzyskania niewielkiej ilości osadu, po procedurze ponownego wysalania osad rozpuszczano w 4 ml wody destylowanej, a następnie przeprowadzono proces odsalania przy użyciu filtrów AMICON Ultra – 4 firmy Millipore o wartości odcięcia 10 kDa, stosując następujące parametry wirowania: 4000 g; 30 min. T = 4°C. Procedurę powtarzano 3- krotnie, dopełniając materiał pozostały na filtrze do objętości 4 ml za pomocą roztworu PBS o pH 7.4. Po ostatnim wirowaniu, materiał umieszczano w szczelnie zamykanych probówkach, dopełniając do objętości 0.5-2 ml. Preparaty łańcuchów lekkich immunoglobulin były przechowywane w temperaturze -20 °C.



Ryc. 7 Obraz elektroforetyczny (12 % SDS-PAGE, warunki nieredukujące) rozdziału łańcuchów lekkich immunoglobulin wyizolowanych metodą wysalania z moczu pacjenta, w którym obok łańcuchów lekkich lambda znajdowała się również albumina. Procent nasycenia siarczanu amonu używanego do izolacji został zaznaczony na górze ryciny. Czerwoną ramką wyróżniono strefę lokalizacji albuminy (Alb.), dimeru łańcuchów lekkich (FLC_D) oraz monomeru łańcuchów lekkich (FLC_M). Przy pomocy programu DensyGraf analizowano intensywność prążka albuminy w odniesieniu do intensywności prążków dimeru i monomeru łańcuchów lekkich. Najmniej intensywny prążek albuminy oraz najbardziej intensywne prążki łańcuchów lekkich zaobserwowano dla ścieżki z użyciem 60% nasycenia siarczanu amonu.

3.2.3 Elektroforeza wysokorozdzielcza (HRE).

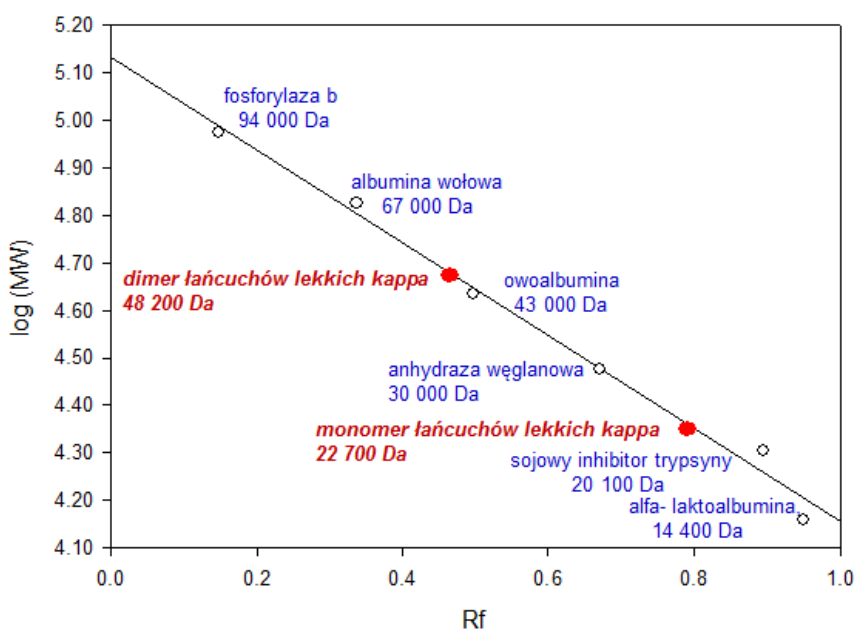
Rozdziały na wysokorozdzielczym żelu agarozowym wykonywane były przy użyciu zestawów do wysokorozdzielczej elektroforezy firmy Corning oraz zestawów HYDRAGEL 7HR firmy Sebia. W manualnym systemie firmy Corning ok. 1.6 µl materiału badanego było nałożone na 1% (w/v) żel agarozowy z dodatkiem buforu barbituranowego o pH 8.6, a następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny (90 V, 35 min.) przy użyciu buforu MOPSO o pH 7.4. Jako barwnik stosowano kwaśny fiolet.

W półautomatycznym system firm Sebia, 10 µl materiału badanego nakładano na dołączony do zestawu aplikator, a następnie materiał był umieszczany na żelu agarozowym (0.8% - w/v) z dodatkiem buforu barbituranowego pH 8.6. Elektroforeza była prowadzona z użyciem prądu stałego o napięciu 255V do momentu osiągnięcia 75Vh (przez ok. 18 min.) w środowisku buforu barbituranowego o pH 8.7. Do barwienia użyto barwnika kwaśny fiolet.

3.2.4 SDS-PAGE elektroforeza.

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem detergentu SDS (sodium dodecyl sulfate) wykonywano z użyciem 12.5% żelu poliakrylamidowego w warunkach nieredukujących. Do sporządzenia żelu zagęszczającego użyto buforu Tris-glicyna o pH 6.8 z dodatkiem SDS, natomiast żel rozdzielający sporządzany był przy użyciu buforu Tris-glicyna o pH 8.8 z dodatkiem SDS. Rozdział białek prowadzony był w buforze elektrodowym Tris-glicyna o pH 8.3 z dodatkiem SDS. Elektroforeza w obecności SDS frakcjonuje białka zależnie od ich masy cząsteczkowej (długości łańcucha polipeptydowego). Do wizualizacji prążków na żelu użyto barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250.

Obok próbek materiału pochodzącego od pacjentów, na żelu prowadzono rozdział standardu mas cząsteczkowych (Sigma Marker, low range) zawierającego następujące białka: alfa-laktoalbumina (14.4 kDa), sojowy inhibitor trypsyny (20.1 kDa), anhydraza węglanowa (30 kDa), owoalbumina (43 kDa), albumina wołowa (67 kDa) oraz fosforylaza b (94 kDa). Względą ruchliwość elektroforetyczną (R_f), czyli stosunek odległości poszczególnych prążków białek wzorca od początku żelu rozdzielającego do odległości, na jaką przemieścił się barwnik, wyznaczono z wykorzystaniem programu graficznego DensyGraf. Krzywa kalibracyjna została sporządzona poprzez odłożenie na osi rzędnych logarytmów mas cząsteczkowych wzorców białek, a na osi odciętych wartości R_f . Dla każdego żelu była przygotowana odrębna krzywa kalibracyjna i następnie użyta do oceny mas cząsteczkowych albuminy, dimeru oraz monomeru łańcuchów lekkich (ryc. 8).



Ryc. 8 Krzywa kalibracyjna zależności logarytmu masy cząsteczkowej (Da) białek wchodzących w skład standardu mas cząsteczkowych (Sigma Marker, low range) od ruchliwości (współczynnik R_f). Rozdział białek prowadzono w warunkach nieredukujących, na 12.5% żelu poliakrylamidowym, z użyciem buforu Tris-glicyna o pH 8.3.

3.2.5 Elektroforeza na żelach poliakrylamidowych bez dodatku SDS.

Elektroforeza na żelach poliakrylamidowych bez dodatku detergentu (SDS) była wykonywana z użyciem 9% żelu poliakrylamidowego w warunkach nieredukujących. Do sporządzenia żelu zagęszczającego użyto buforu Tris-glicyna o pH 6.8. Żel rozdzielający sporządzany był przy użyciu buforu Tris-glicyna o pH 8.8. Rozdział białek prowadzony był w buforze elektrodowym Tris-glicyna o pH 8.3. Elektroforeza natywna na żelu poliakrylamidowym rozdziela białka przede wszystkim w zależności od ładunku oraz kształtu białek. Do wizualizacji prążków na żelu użyto barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250.

3.2.6 Oznaczanie typu łańcuchów lekkich.

Analizę typu łańcuchów lekkich wytwarzanych przez poszczególnych chorych przeprowadzono z użyciem następujących technik badawczych: immunofiksacji białek surowicy, nefelometrycznego oznaczenia łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu oraz nefelometrycznego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (test FREELITE). Immunofiksację białek surowicy przeprowadzono z użyciem zestawów HYDRAGEL 6 IF firmy Sebia. Nefelometryczne oznaczanie łańcuchów lekkich w moczu oraz wolnych łańcuchów lekkich w surowicy wykonano na analizatorze Behring Nephelometer II Analizer firmy Siemens z użyciem przeciwciał poliklonalnych anty- κ ; anty- λ oraz anty-free κ i anty-free λ firmy Binding Site.

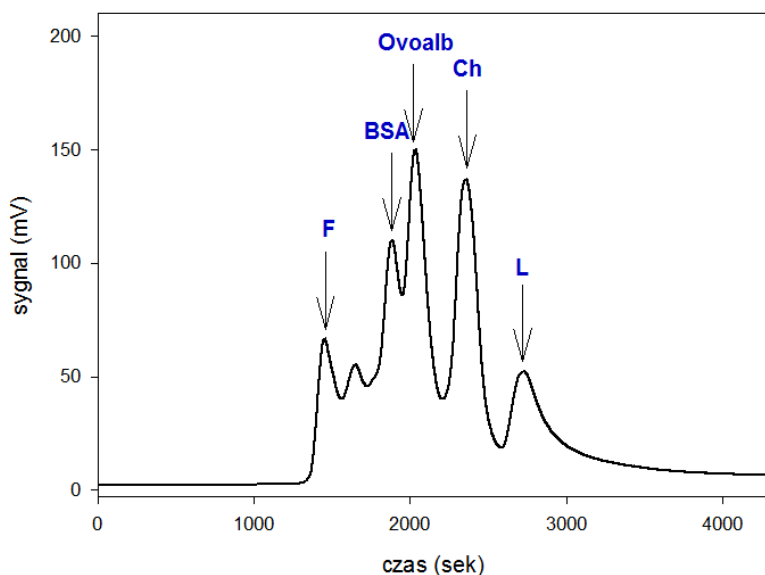
3.2.7 Oznaczanie stężenia łańcuchów lekkich.

Do oznaczenia stężenia łańcuchów lekkich w materiałach otrzymanych po wyizolowaniu łańcuchów lekkich z moczu wykorzystano metodę Bradforda [⁹⁴]. Krzywą kalibracyjną sporządzono z użyciem liofilizowanego preparatu łańcuchów lekkich kappa κ 470AD.

3.2.8 Wysokosprawna chromatografia wykluczenia (HPSEC).

Do oceny występowania form oligomerycznych łańcuchów lekkich immunoglobulin w oczyszczonych preparatach łańcuchów lekkich pochodzących od pacjentów z gammopatią monoklonalną wykorzystano system wysokosprawnej chromatografii wykluczenia (*HPSEC – high performance size exclusion chromatography*). Rozdział był prowadzony w systemie izokratycznym przy użyciu 0.1 M buforu fosforanowego o pH 6.5. Do rozdzielania używano kolumny SPHEROGEL TM (TSK 2000, 7.5mmID x 60 cm) wraz z prekolumną TSK guardcolumn SW (7.5mmID x 7.5 cm). Przed rozdziałem kolumna była zrównoważona przez ok. 30 min. przy przepływie 0.5 ml/min z użyciem 0.1 M buforu fosforanowego o pH 6.5. Czas rozdziału próbki wynosił ok. 60 minut, przepływ fazy mobilnej 0.5 ml/min. Przy pomocy detektora UV - Vis monitorowano charakterystyczny dla białek wzrost absorbancji przy długości fali 210 nm. Do kalibracji kolumny użyto następujących białek: lizozym, chymotrypsynogen A, owoalbumina, albumina wołowa oraz ferrytyna (liofilizowane preparaty białkowe wchodziły

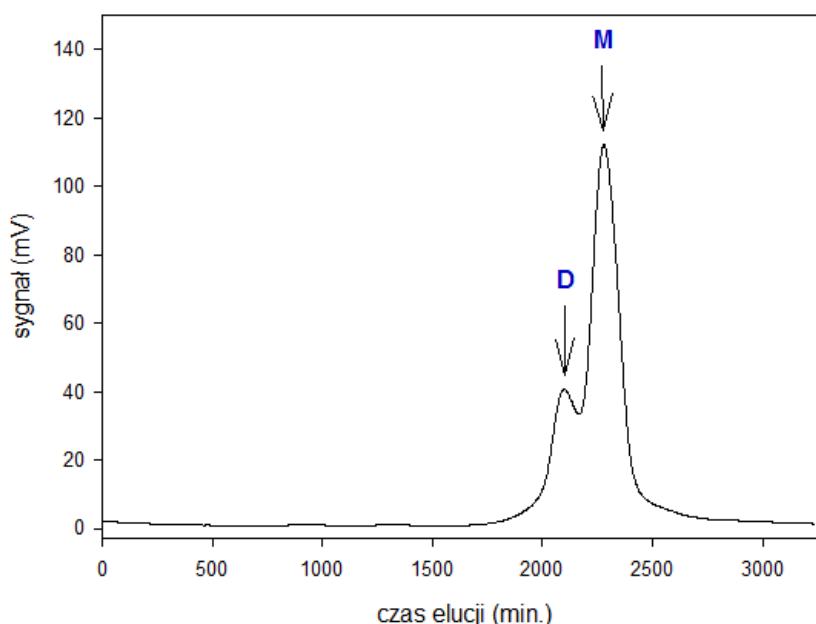
w skład zestawu standardów mas cząsteczkowych zakupionego w firmie SERVA) (ryc. 9). Czas elucji ferrytyny wykorzystano do oznaczenia objętości pustej kolumny. Liofilizowane preparaty łańcuchów lekkich typu kappa (κ 470AD) oraz lambda (λ 70292) otrzymane metodą wysalania z moczu pacjentów ze zdiagnozowaną gammadopatią monoklonalną oraz potwierdzoną obecnością białka BJ w moczu służyły do oszacowania czasu elucji dimeru i monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin. Na kolumnę chromatograficzną aplikowano 5 μ l roztworów odpowiednich białek rozpuszczonych w 0.1 M buforze fosforanowym pH 6.5 o stężeniu 5 mg/ml. Do oceny występowania wyższych niż dimer niekowalencyjnych form łańcuchów lekkich immunoglobulin wykorzystano oczyszczone preparaty łańcuchów lekkich immunoglobulin pochodzące z moczu pacjentów z gammadopatią monoklonalną. Przebadano materiały pochodzące od 53 pacjentów aplikując na kolumnę chromatograficzną ok. 25 μ g białka w objętości 5-20 μ l.



| Białko | Masa cząsteczkowa (kDa) | Czas elucji (min.) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| Lizozym (L) | 16 | 46 |
| Chymotrypsynogen (Ch) | 25 | 39 |
| Owoalbumina (Ovoalb) | 45 | 34 |
| Albumina wołowa (BSA) | 67 | 32 |
| Ferrytyna (F) | 480 | 24 |

Ryc. 9 Rozdział białek wzorcowych do kalibracji kolumny chromatograficznej: F – ferrytyna; Ovoalb – owoalbumina; BSA – albumina wołowa; Ch – chymotrypsynogen; L – lizozym. W tabeli zestawiono masy cząsteczkowe poszczególnych białek oraz czasy elucji odpowiednich frakcji.

W celu preparatywnego rozdzielania formy dimerycznej oraz monomerycznej łańcuchów lekkich kappa, 20 μ l roztworu łańcuchów kappa (κ 470AD) o stężeniu 5g/l zostało nałożone na kolumnę chromatograficzną, a następnie prowadzono rozdział w warunkach opisanych powyżej. Frakcje białkowe rozdzielane na kolumnie zbierano w określonych przedziałach czasowych. Frakcję dimeru łańcuchów kappa zbierano w czasie $t=32.5$ min- 34.5 min, frakcję monomeru łańcuchów kappa zbierano w czasie $t=37.5$ min- 40 min. W kolejnym etapie obie frakcje zagęszczano przy użyciu filtrów Amicon Ultra 10k firmy Millipore o wartości odcięcia 10kDa do końcowej objętości ok. 20 μ l. Procedurę rozdziału łańcuchów lekkich kappa z następującym po nim etapem zbierania frakcji oraz zagęszczania wielokrotnie powtarzano. Następnie sprawdzono czystość uzyskanych preparatów przy użyciu elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (12.5%) z dodatkiem SDS w warunkach nieredukujących.



Ryc. 10 Rozdział chromatograficzny łańcuchów lekkich kappa (κ 470AD; 25 μ g). Rozdział prowadzono w systemie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosując izokratyczny rozdział w środowisku 0.1M buforu fosforanowego pH 6.5. Frakcję dimeru (D; $t= 2100$ sek.) zbierano w czasie $t = 32.5$ min – 34.5 min, frakcję monomeru (M; $t= 2280$ sek.) zbierano w czasie $t = 37.5$ min – 40 min.

3.2.9 Oznaczanie reszt tiolowych metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).

Analiza reszt tiolowych w preparatach łańcuchów lekkich immunoglobulin uzyskanych z moczu pacjentów z gammopatią monoklonalną została przeprowadzona techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Balda i Głowackiego [95]. Wstępnym etapem oznaczania reszt tiolowych było wyizolowanie łańcuchów lekkich z moczu pacjentów z gammopatią monoklonalną, a następnie dializa wobec wody dejonizowanej oraz roztworu PBS o pH 7.4 przy pomocy worków dializacyjnych SPECTRA/POR® firmy SERVA o wartości *cutoff* 10 kDa lub z zastosowaniem filtrów AMICON Ultra – 4 firmy Millipore o wartości odcięcia 10 kDa. W celu zapewnienia odpowiednich warunków derywatywacji (lekko alkaliczne pH), próbki były wstępnie rozcieńczane 0.2M buforem fosforanowym o pH 7.6. Następnie dodawano ok. 5 ul 1M NaOH. Jako czynnik redukujący wiązania disiarczkowe został użyty związek tris(2-carboksyetyl) fosfina (TCEP) w stężeniu 0,25M. Do derywatywacji wolnych związków tiolowych użyto 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT) w stężeniu 0.1mM. Przed aplikacją na kolumnę chromatograficzną badany materiał był poddawany odbiałczaniu przy pomocy 100% (m/v) kwasu trichlorooctowego (TCA). Rozdziaty były prowadzone w układzie odwróconej fazy na kolumnie chromatograficznej Eclipse Plus C18, 4.6 x 150mm, 5µm z użyciem kompatybilnej prekolumny Eclipse Plus C18 Grd, 4.6 x 12.5mm, 5µm, 4pk (Perlan Technologies). Jako solwentu używano 0.1M TCA oraz 0.1 M LiOH. Stosowano przepływ gradientowy. Opisana procedura pozwalała na jednoczesne oznaczanie w materiale badanym homocysteiny, glutationu, cysteiny oraz cysteinyloglicyny. W metodzie zastosowano zewnętrzną kalibrację dla każdego z oznaczanych związków tiolowych w zakresach stężeń: glutation – 0-20 nM/ml; homocysteina – 0-10 nM/ml; cysteina – 0-50 nM/ml oraz cysteinyloglicyna – 0-40 nM/ml.

3.2.10 Ocena wartości odsetkowych dimeru oraz monomeru FLC.

Densytometrycznej oceny rozdziałów elektroforetycznych białek moczu dokonano za pomocą technik cyfrowej analizy obrazu przy pomocy programu DensyGraf z użyciem skanera EPSON Perfection 4990 PHOTO [96]. Intensywność plam barwnych mierzono analizując czerwoną składową barwy.

3.2.11 Metody statystyczne.

W statystyce opisowej podawano liczbę (odsetek grupy) dla zmiennych nominalnych, średnią +/- odchylenie standardowe dla zmiennych ciągłych o rozkładzie normalnym i medianę (dolny-górny kwartył) dla zmiennych ciągłych o rozkładzie różnym od normalnego. Do badania normalności rozkładu stosowano test Shapiro-Wilka. W przypadkach, gdzie nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym, do porównań między grupami użyto testów nieparametrycznych. Porównując odsetek dimeru dla łańcuchów lekkich kappa oraz lambda użyto testu Manna-Whitney'a. Różnice między kolejnymi pomiarami odsetka

dimeru/monomeru łańcuchów lekkich dla jednego pacjenta badano nieparametrycznym testem Wilcozona. Korelacje oceniano przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana. Nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallisa z odpowiednim dla niego testem *post - hoc* wykorzystano do porównania zmienności mas cząsteczkowych formy dimerycznej oraz monomerycznej łańcuchów lekkich oraz albuminy (grupa kontrolna). Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA v 10.0.

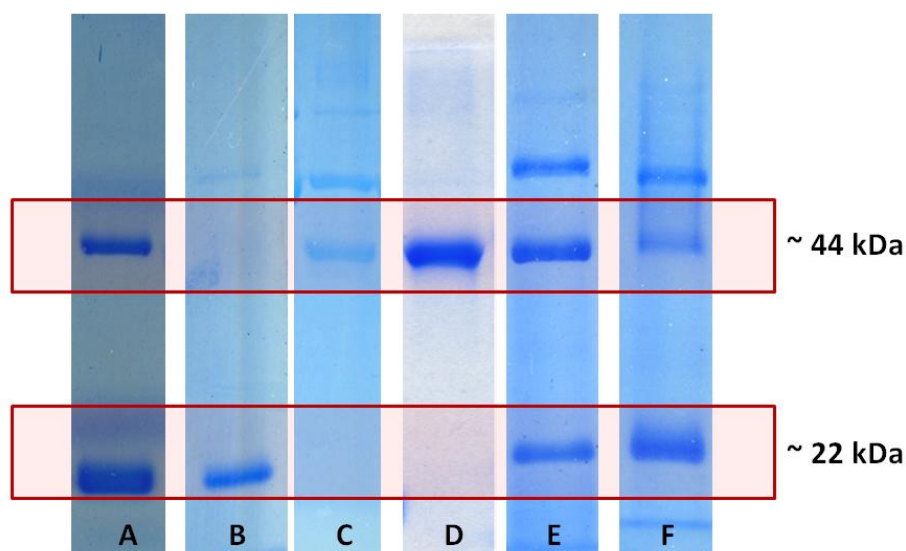
4 Wyniki.

4.1 Różne formy molekularne wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu – monomery oraz kowalencyjne dimery.

Analizując różne formy wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu chorych z gammapatią monoklonalną przeprowadzono elektroforetyczne rozdziały białek moczu 163 chorych. 93 chorych posiadało łańcuchy lekkich typu kappa, natomiast u pozostałych 70 były obecne łańcuchy typu lambda. Rozdziały w systemie SDS-PAGE w warunkach nieredukujących wskazują, że wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin występują w moczu w formie monomeru o masie cząsteczkowej ok. 22 kDa i (lub) w formie kowalencyjnego dimeru o masie cząsteczkowej ok. 44 kDa.

Ryc. 11 przedstawia obrazy elektroforetyczne białek moczu wybranych chorych z gammapatią monoklonalną, u których stwierdzono obecność łańcuchów lekkich. Najczęstszą formą łańcuchów lekkich kappa jest mieszanina dimeru i monomeru (ścieżka A; 70% przypadków chorych z łańcuchami lekkimi kappa [n= 65/90]). Rzadziej łańcuchy lekkie typu kappa występują wyłącznie w formie monomerycznej (ścieżka B; 25.8% przypadków [n=24/90]), a w rzadkich przypadkach wyłącznie w formie dimerycznej (ścieżka C; 4.3% przypadków [n=4/90]). Jak widać procentowa zawartość dimeru w grupie łańcuchów kappa może się wahać w bardzo szerokich granicach: 0-100%, chociaż interpretacja miar położenia (dolny, górny kwartył) wskazuje, że 50% obserwacji mieści się w przedziale 0-54%, a jedynie u 25% chorych odsetek dimeru jest wyższy od 54%. Mediana procentowego udziału dimerycznej formy łańcuchów lekkich kappa wynosi 33.22%.

Łańcuchy lekkie typu lambda prezentują odmienny profil form molekularnych. Ścieżki D-F przedstawiają różne formy molekularne łańcuchów lekkich lambda. Najczęstszą formą dla łańcuchów lambda jest występowanie jedynie formy dimerycznej (ścieżka D). W grupie badanej u 67.1% (n=47/70) pacjentów z łańcuchami lekkimi typu lambda zaobserwowano profil form molekularnych z występowaniem jedynie formy dimerycznej łańcuchów. Rzadszą sytuacją jest występowanie obok formy dimerycznej również monomeru lambda (ścieżka E oraz F; 32.9% pacjentów, n=23/70). W większości przypadków jednoczesnego występowania formy dimerycznej oraz monomerycznej łańcuchów lambda, forma dimeryczna jest wciąż formą dominującą (30% chorych; [n=21/70]). Odsetek formy dimerycznej w tej grupie wynosił powyżej 50% (ścieżka E). Jedynie u 2.9% chorych z łańcuchami lambda (n=2/70) odsetek formy dimerycznej stanowił mniej niż 50% (ścieżka F). Można więc stwierdzić, że procentowa zawartość dimeru w grupie pacjentów z łańcuchami lekkimi typu lambda mieściła się w szerokich granicach: 31.5 – 100% (mediana = 100%). Jednak przypadki, gdzie odsetek dimeru stanowi < 50% są rzadkie (2 przypadki w grupie badanej).



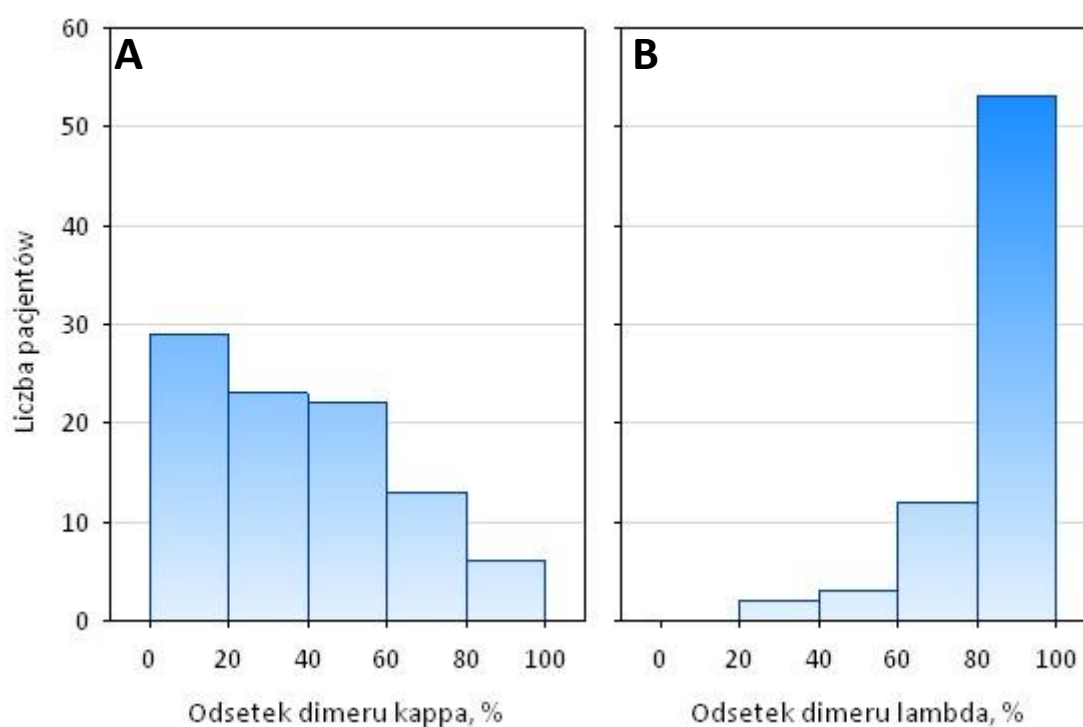
Ryc. 11 Rozdział elektroforetyczny białek moczu wybranych pacjentów z gammapatią monoklonalną, u których stwierdzono obecność łańcuchów lekkich typu kappa (A-C) oraz lambda (D-F). Widoczne są różne formy łańcuchów lekkich typu kappa: A – mieszanina dimeru (~44kDa) i monomeru (~22kDa); B – jedynie forma monomeryczna (~22kDa); C – jedynie forma dimeryczna (~44kDa). Ścieżki D-F przedstawiają różne formy łańcuchów lekkich typu lambda: D –najbardziej typowy obraz, gdzie dominuje forma dimeryczna (~44kDa) oraz E, F – stosunkowo rzadkie przypadki o znacznej zawartości formy monomerycznej (~22kDa).

W tabeli 5 zebrano wybrane dane dotyczące odsetkowej zawartości dimeru łańcuchów lekkich kappa i lambda.

Tabela 5 Wybrane dane statystyczne odsetka dimeru łańcuchów lekkich kappa oraz lambda.

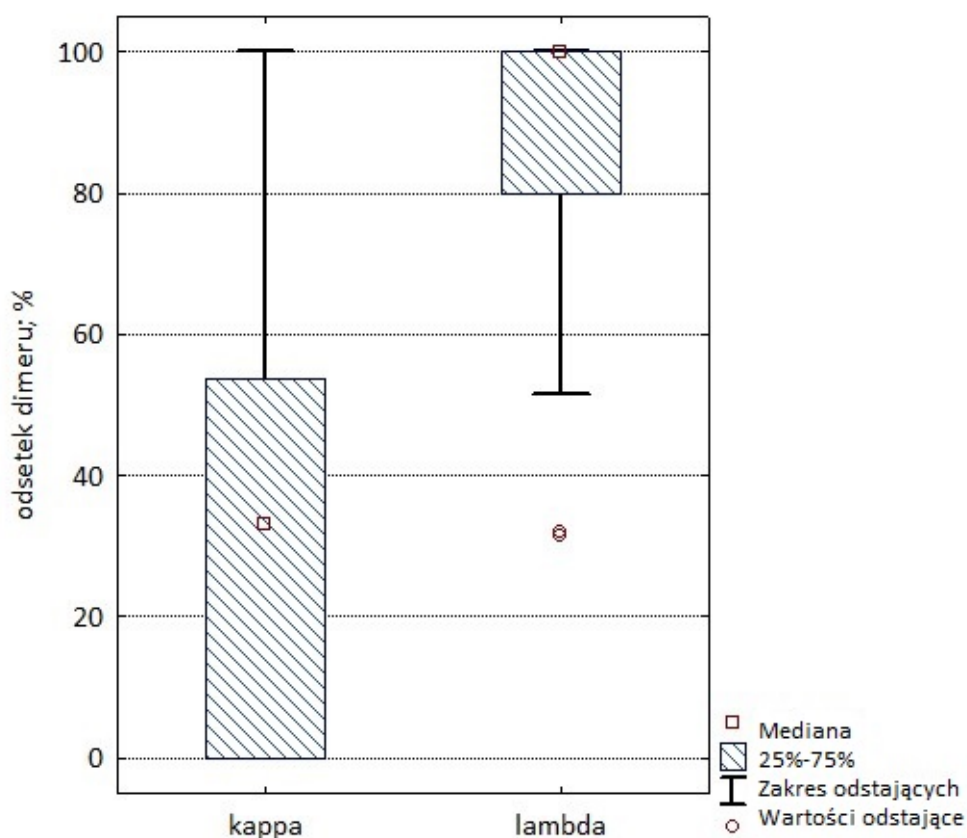
| | mediana (dolny-górny kwartył), % | minimum-maksimum, % | Zakres wartości nieodstających, % |
|--------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| kappa | 33.2 (0-53.7) | 0-100 | 0-100 |
| lambda | 100 (80-100) | 31.5-100 | 51.5-100 |

Ryc. 12 przedstawia histogramy rozkładu odsetkowej zawartości dimeru łańcuchów lekkich typu kappa (A) oraz lambda (B). Badanie normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka wykazało, że w obu przypadkach są to rozkłady różne od rozkładu normalnego. Analiza histogramów odsetka dimeru w grupie pacjentów z FLC kappa oraz lambda potwierdza wcześniejsze spostrzeżenie, iż łańcuchy lekkie typu kappa występują najczęściej w formie mieszaniny dimeru i monomeru. Zwraca uwagę stosunkowo niski udział formy dimerycznej (wysoki formy monomerycznej) w grupie FLC kappa. U ok. 31% (n=29) chorych procentowy udział formy dimerycznej był mniejszy niż 20%. W przypadku łańcuchów lekkich typu lambda uderzająca jest przewaga formy dimerycznej. U ok. 76% pacjentów (n=53), u których wykryto łańcuchy lambda odsetek dimeru był wyższy od 80%.



Ryc. 12 Histogram rozkładu procentowej zawartości formy dimerycznej monoklonalnych łańcuchów lekkich kappa - A (n=93) oraz lambda - B (n=70) oszacowanej na podstawie pomiarów densytometrycznych żeli poliakrylamidowych. Zwraca uwagę wysoki udział formy monomerycznej (niski udział dimeru) dla łańcuchów lekkich typu kappa oraz wysoki udział formy dimerycznej dla łańcuchów lekkich lambda w badanych próbkach.

Na ryc. 13 przedstawiono różnice w wartościach odsetka dimeru w grupach FLC typu kappa oraz lambda. Estymatorami są w tym przypadku mediana oraz górny i dolny kwartyl. Na rycinie zaznaczono także obserwacje odstające^v obserwowane w grupie łańcuchów lekkich lambda oraz zakres wartości nieodstających dla obu typów łańcuchów lekkich. Obserwacje odstające w grupie FLC typu lambda odpowiadają przypadkom (n = 2), gdzie odsetek dimeru < 50% (wynosi 31.5% oraz 32%). Przeprowadzona w dalszym etapie (rozdział 4.2) analiza zmian odsetka formy dimerycznej w kolejnych oznaczeniach wykonanych u tych pacjentów potwierdziła, że tak niskie wartości odsetka dimeru są cechą dla nich charakterystyczną.



Ryc. 13 Wykres przedstawia porównanie statystyk opisowych (mediana, dolny-górny kwartyl, oraz zakres nieodstających) dla odsetka dimerów łańcuchów kappa oraz lambda. Na wykresie zaznaczono wartości odstające (w grupie łańcuchów lekkich lambda – 2 przypadki z odsetkiem dimeru < 50%).

^v Obserwacje odstające - wartości spełniające następujące warunki:
wartość obserwacji > górny kwartyl + 1.5*(górny kwartyl – dolny kwartyl) lub wartość obserwacji < dolny kwartyl – 1.5*(górny kwartyl – dolny kwartyl)

Podsumowując otrzymane dane dotyczące formy dimerycznej oraz monomerycznej łańcuchów lekkich immunoglobulin można stwierdzić, że łańcuchy lekkie kappa oraz lambda znacznie różnią się między sobą. Spostrzeżenie to zostało potwierdzone poprzez analizę statystyczną. Za pomocą testu Manna-Whitney'a wykazano, że odsetek dimeru łańcuchów lekkich kappa był istotnie różny od odsetka dimeru dla łańcuchów lambda ($p < 0.0001$). Łańcuchy lekkie kappa występują najczęściej w postaci zarówno dimeru jak i monomeru, forma monomeryczna jest formą dominującą. Łańcuchy lekkie lambda występują przede wszystkim w formie dimerycznej. W przeważającej większości przypadków, gdzie obecna jest zarówno forma dimeryczna jak i forma monomeryczna, odsetek dimeru jest znacznie wyższy od odsetka monomeru.

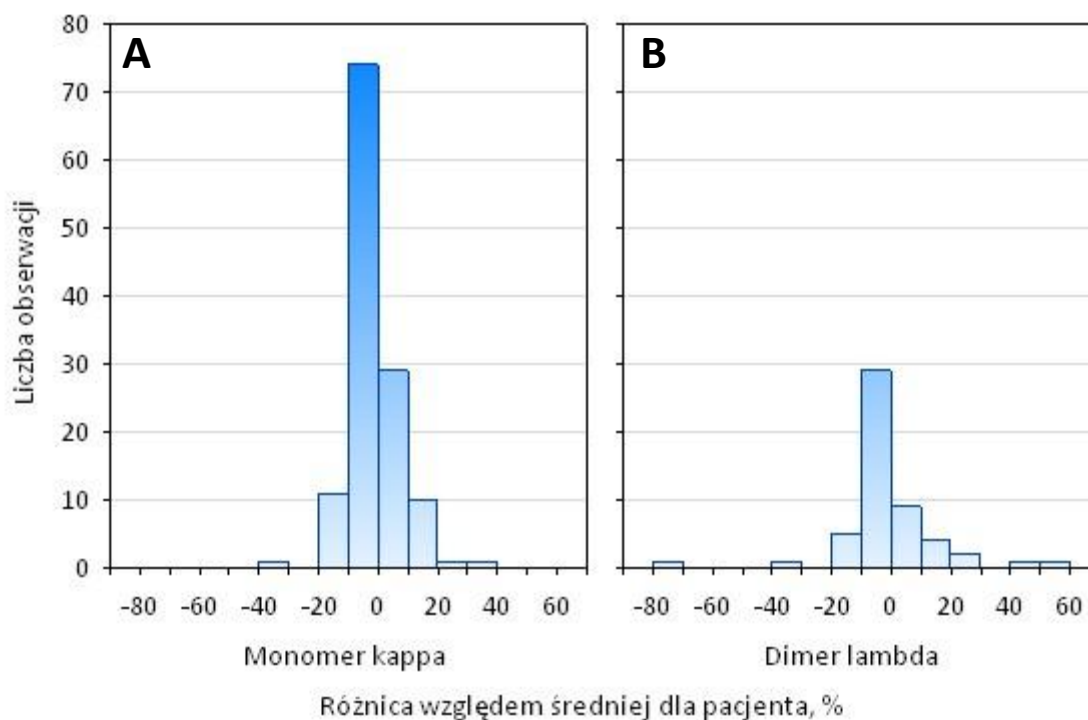
4.2 Dynamika zmian profilu dimer/monomer w czasie.

Dla 54 pacjentów stanowiących 33% grupy badanej dokonano analizy zmian odsetka dimeru lub monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin w czasie trwania choroby. U tych pacjentów w trakcie prowadzenia badań nad niniejszą pracą, w toku rutynowej diagnostyki, wykonywana była więcej niż jedna elektroforetyczna analiza białek moczu metodą SDS - PAGE. Analizie poddano 130 oznaczeń elektroforetycznych wykonanych u 38 pacjentów dla łańcuchów lekkich kappa (2-8 oznaczeń u jednego pacjenta) i 53 oznaczenia wykonanych u 16 pacjentów dla łańcuchów lekkich lambda (2-8 oznaczeń u jednego pacjenta). Dla łańcuchów lekkich lambda oceniano zmiany odsetkowe formy dimerycznej, ponieważ forma dimeryczna jest w tym przypadku formą dominującą. W przypadku łańcuchów lekkich kappa formą dominującą jest forma monomeryczna, dlatego analizowano zmiany odsetka monomerów. Aby ocenić zmiany odsetkowe formy monomerycznej łańcuchów lekkich kappa oraz formy dimerycznej łańcuchów lekkich lambda u pojedynczych pacjentów w czasie trwania choroby, dla każdego pacjenta obliczono średni odsetek monomeru kappa lub dimeru lambda (średnia ze wszystkich oznaczeń wykonywanych u danego pacjenta). Następnie dla każdego wyniku uzyskanego u pacjenta obliczono różnicę wartości pojedynczego pomiaru oraz średniej ze wszystkich pomiarów. Otrzymałą różnicę podzielono przez wartość średniej dla wszystkich wyników tego pacjenta, zgodnie ze wzorem: $[(\text{pojedynczy wynik} - \text{średnia z wyników pacjenta}) / \text{średnia z wyników pacjenta}] \times 100\%$. Dla potrzeb niniejszej pracy, zróżnicowanie odsetka monomeru kappa, wyrażone jako różnica pojedynczego wyniku odsetka monomeru kappa i wartości średniej odsetka monomeru kappa podzielona przez wartość średnią odsetka monomeru kappa, nazwano względną różnicą wartości odsetkowych monomeru kappa. Zróżnicowanie odsetka dimeru, wyrażone w postaci różnicy pojedynczego wyniku odsetka dimeru lambda i wartości średniej odsetka dimeru lambda podzielonej przez wartość średnią odsetka dimeru lambda, zostało nazwane względną różnicą wartości odsetkowych dimeru lambda. W tabeli 6 zostały przedstawione mierzalne parametry statystyczne opisujące uzyskane wyniki.

Tabela 6 Wybrane dane statystyczne dotyczące zmian odsetka monomeru kappa i dimeru lambda w czasie.

| Względne różnice wartości odsetkowych | mediana (dolny-górny kwartył), % | 2.5-97.5 percentyl, % | minimum-maksimum, % |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| monomerów kappa | 0 (-0.2 – 2.3) | -17.4 – 16.7 | -36.4 – 33.3 |
| dimerów lambda | 0 (-3.4 – 3.6) | -37.2 – 41.3 | -72.3 – 50.8 |

Ryc. 14 przedstawia histogram rozkładu względnych różnic wartości odsetkowych monomeru kappa (A) oraz względnych różnic wartości odsetkowych dimeru lambda (B). Względne różnice wartości odsetkowych monomeru kappa oraz dimeru lambda charakteryzowały rozkłady różne od normalnych. Dla łańcuchów lekkich kappa 95% obserwacji mieściło się w przedziale: (-17.4%; 16.7%). 50% obserwacji natomiast mieściło się w wąskich granicach: (-0.2%; 2.3%). Zmienność czasowa procentowej zawartości monomeru dla łańcuchów lekkich kappa u pojedynczego pacjenta była więc niewielka. Dla pacjentów z łańcuchami lekkimi lambda zaobserwowano większe zróżnicowanie odsetka dimeru. 50% względnych różnic wartości odsetkowych dimeru mieściło się w zakresie: (-3.4%; 3.6%). Dla 95% obserwacji względne różnice odsetka dimeru mieściły się w przedziale: (-37.2%; 41.3%).

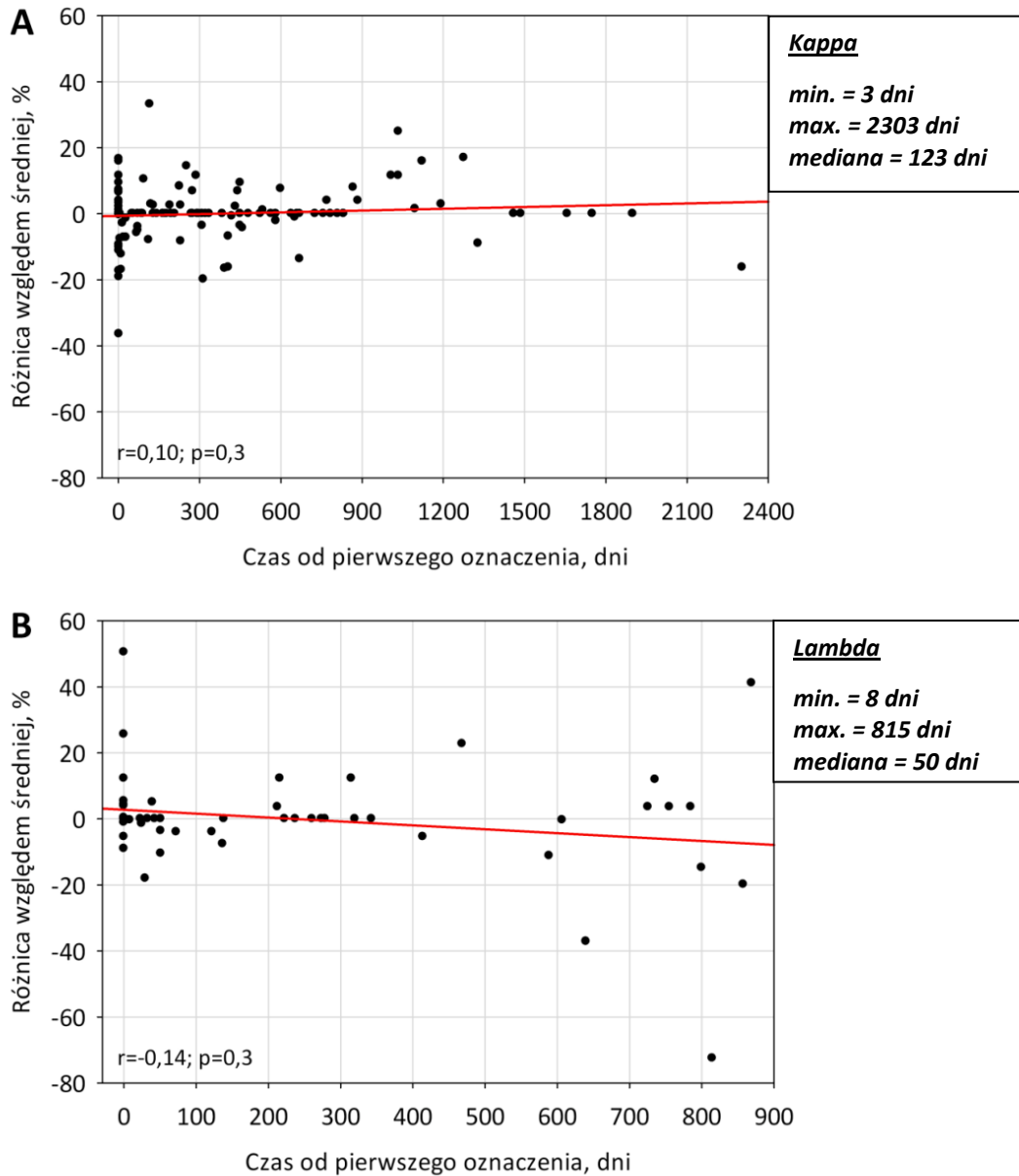


Ryc. 14 Histogramy rozkładu względnych różnic wartości odsetka monomeru kappa (A) oraz dimeru lambda (B).

Obok ogólnej charakterystyki zróżnicowania wartości odsetkowych monomeru kappa oraz dimeru lambda dla pacjentów w trakcie trwania choroby, dokonano również porównania wyników kolejnych pomiarów dla każdego z pacjentów. Wartości odsetka monomeru kappa lub dimeru lambda uzyskane w kolejnych pomiarach porównywano nieparametrycznym testem Wilcozona. Wykazano, że wyniki kolejnych oznaczeń nie różniły

się istotnie wobec poprzednich oznaczeń ($p=0.6$ dla monomerów kappa i $p=0.6$ dla dimeru lambda). Można stwierdzić, że profil odsetka dimeru lambda lub monomeru kappa nie zmienia się w czasie i jest cechą charakterystyczną dla poszczególnych chorych.

Rozdziały elektroforetyczne łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną, których obrazy zostały wykorzystane do analizy profilu dimeru/monomeru były wykonane w różnych odstępach czasowych. Za punkt odniesienia (dni = 0) uznano czas, w którym pierwszy raz wykonano rozdział elektroforetyczny moczu pacjenta. Minimalny czas, jaki upłynął od wykonania poprzedniego rozdziału elektroforetycznego białek moczu u pacjentów z FLC typu kappa wynosił 3 dni, maksymalny zaś 2303 dni (mediana = 123 dni). Dla łańcuchów lekkich typu lambda kolejne analizy były wykonywane w odstępach czasowych: min = 8; max = 869 dni (mediana = 50 dni). Na ryc. 15 przedstawiono wykres obrazujący zmienność w czasie trwania choroby odsetka monomeru kappa (A) oraz dimeru lambda (B) u pacjentów z gammapatią monoklonalną. Analiza statystyczna danych za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana wykazała brak istotnej korelacji między czasem wykonania oznaczenia, a względną różnicą wartości odsetkowych monomeru kappa lub dimeru lambda w grupie badanej. Przedstawione wyniki wzmacniają spostrzeżenie, że odsetek monomeru lub dimeru FLC jest cechą charakterystyczną dla konkretnego pacjenta i nie zmienia się w czasie.

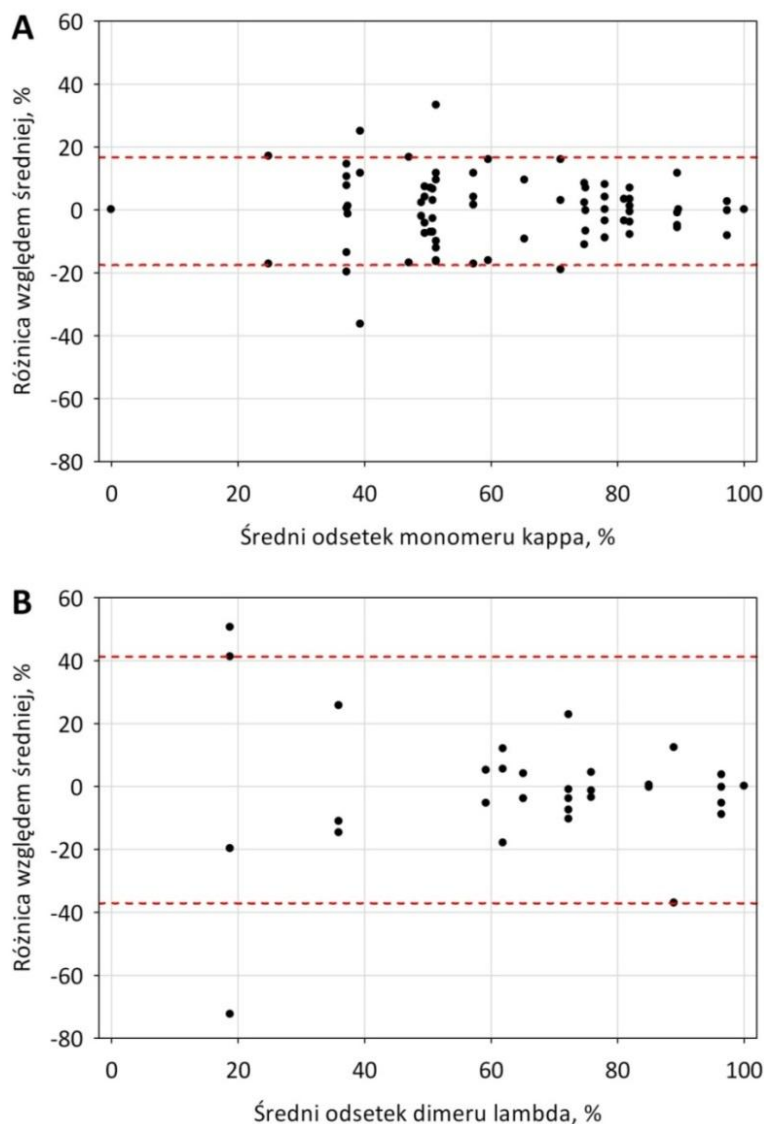


Ryc. 15 (A) Wykres prezentujący zmienność odsetka monomeru łańcuchów lekkich kappa u pacjentów z gammapatią monoklonalną w czasie trwania choroby. Poszczególne punkty przedstawiają względne różnice wartości odsetkowych monomeru kappa.

(B) Wykres prezentujący zmienność odsetka dimeru łańcuchów lekkich lambda u pacjentów z gammapatią monoklonalną w czasie trwania choroby. Poszczególne punkty przedstawiają względne różnice wartości odsetkowych dimeru lambda

Na dole rycin podano współczynnik korelacji rang Spearmana (r) oraz poziom istotności (p). Z prawej strony rycin podano dane dotyczące odstępów czasowych (dni), w jakich były wykonywane kolejne pomiary.

Ocena wzrokowa wyników elektroforezy SDS-PAGE wskazywała, że zróżnicowanie odsetka dimeru lub monomeru łańcuchów lekkich jest wyższe w przypadkach, gdy stężenie FLC w moczu chorego jest niskie (intensywność barwy niebieskiej prążka łańcuchów lekkich w tych przypadkach jest niewielka, dane nieprzedstawione). Za pomocą korelacji rang Spearmana zbadano, czy względne różnice wartości odsetka monomeru kappa oraz dimeru lambda zależą od wartości średniej odsetka monomeru kappa lub dimeru lambda. Wykazano brak istotnej statystycznie zależności. Ryc. 16 przedstawia wykres zależności względnych różnic wartości odsetka monomeru kappa (A) oraz względnych różnic wartości dimeru lambda (B) w zależności od wartości średniej odpowiednio monomeru kappa oraz dimeru lambda u konkretnego pacjenta.



Ryc. 16 (A) Wykres przedstawiający zależność zróżnicowania wartości odsetka monomeru kappa od średniej wartości odsetka monomeru kappa u pacjentów z gammopatią monoklonalną. Do obliczenia zróżnicowania odsetka monomeru kappa wykorzystano następujące równanie: $[(x_k - \bar{x}_k) / \bar{x}_k] * 100\%$, gdzie:

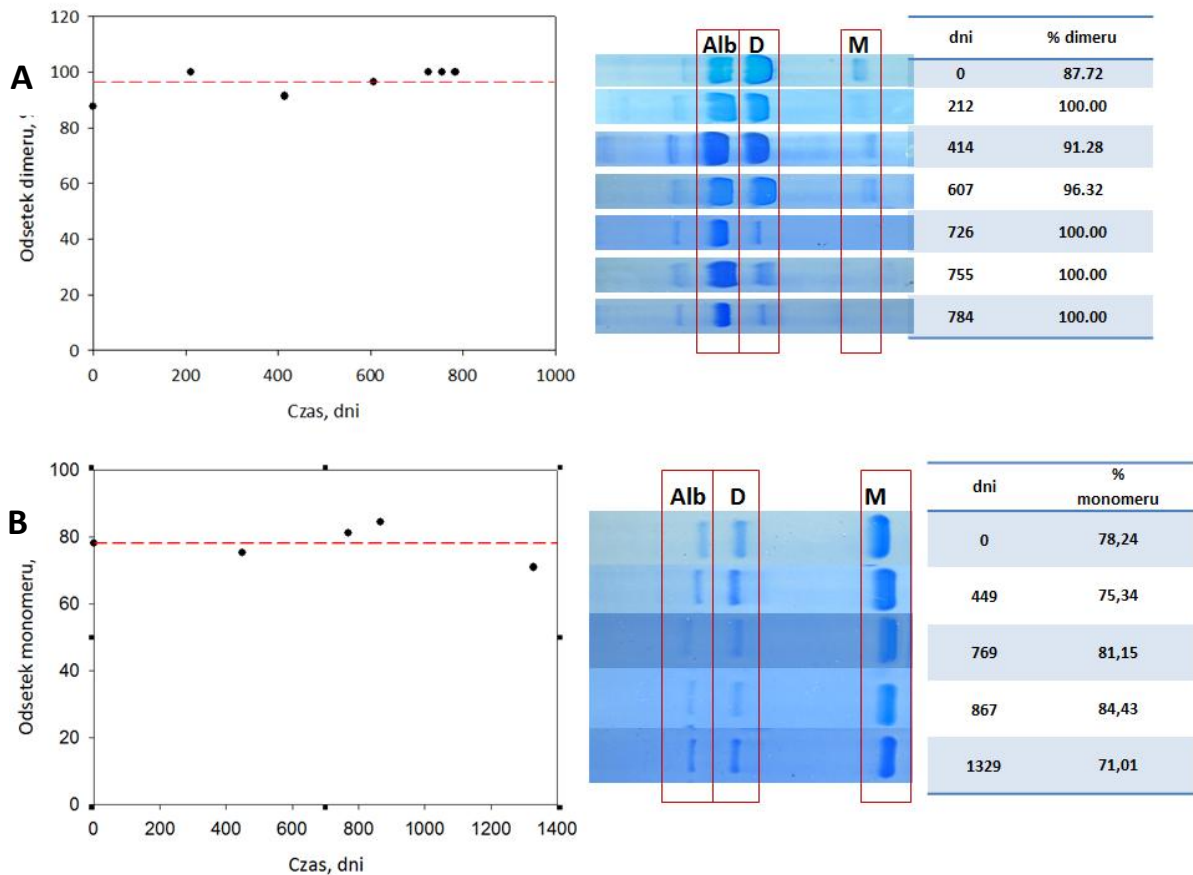
x_k - pojedynczy wynik odsetka monomeru kappa; \bar{x}_k - średnia ze wszystkich wyników odsetka monomeru kappa uzyskanych u konkretnego pacjenta.

(B) Wykres przedstawiający zależność zróżnicowania wartości odsetka dimeru lambda od średniej wartości odsetka dimeru lambda u pacjentów z gammopatią monoklonalną. Obliczeń zróżnicowania odsetka dimeru lambda dokonano wg. następującego wzoru: $[(x_l - \bar{x}_l) / \bar{x}_l] * 100\%$, gdzie:

x_l - pojedynczy wynik odsetka dimeru lambda; \bar{x}_l - średnia ze wszystkich wyników odsetka dimeru lambda uzyskanych u konkretnego pacjenta.

Za pomocą kreskowanych linii na wykresie zaznaczono wartości 2.5 oraz 97.5 percentyla względnych różnic wartości odsetka monomeru kappa oraz dimeru lambda.

Na ryc. 17 zestawiono obrazy rozdzielń elektroforetycznych białek moczu wybranych pacjentów z gammopatią monoklonalną oraz wykresy zależności wartości odsetkowych dimeru lambda (A) oraz monomeru kappa (B) od czasu. Na rycinie można zauważyć, że łańcuchy lekkie lambda występują głównie w formie dimeru, a łańcuchy lekkie kappa w formie dimeru oraz monomeru, jednak forma monomeryczna jest formą dominującą. Wartości odsetka dimeru FLC typu lambda oraz odsetka monomeru FLC typu kappa wybranych pacjentów wahają się w niewielkich granicach (SD = 5.06 dla odsetka dimeru FLC typu lambda oraz SD = 5.18 dla odsetka monomeru FLC typu kappa).



Ryc. 17 Zestawienie obrazów rozdzielń elektroforetycznych moczu wybranych pacjentów z gammopatią monoklonalną związaną z wydzielaniem do moczu łańcuchów lekkich lambda (A) oraz kappa (B). Rozdziały przeprowadzono w systemie elektroforezy SDS-PAGE (12.5% żel poliakrylamidowy, warunki nieredukujące). Na żelach zaznaczono strefy lokalizacji albuminy (Alb), dimeru łańcuchów lekkich (D) oraz monomeru łańcuchów lekkich (M). Z lewej strony ryciny w formie wykresu przedstawiono zależność odsetka dimeru lub monomeru łańcuchów lekkich od czasu. Linią przerywaną zaznaczono wartość średnią odsetka dimeru lub monomeru dla danego pacjenta. Dla pacjenta z łańcuchami lekkimi kappa średnia odsetka monomeru wynosiła 78.03; odchylenie standardowe = 5.18. Dla pacjenta z łańcuchami lekkimi lambda średnia odsetka dimeru wynosiła 96.47; odchylenie standardowe = 5.06.

4.3 Analiza oligomerycznych form łańcuchów lekkich przy użyciu wysokosprawnej chromatografii wykluczenia (SE HPLC - size exclusion high performance liquid chromatography)

Analizę występowania form oligomerycznych łańcuchów lekkich immunoglobulin u pacjentów z gammapatią monoklonalną za pomocą wysokosprawnej chromatografii wykluczenia przeprowadzono na grupie 53 pacjentów (31 z łańcuchami lekkimi typu kappa, 22 z łańcuchami lekkimi typu lambda). Do analizy wybrano materiały pochodzące od pacjentów, dla których w rozdziałach moczu w systemie elektroforezy SDS-PAGE główną frakcją białkową była frakcja zlokalizowana w strefie dimeru oraz (lub) monomeru łańcuchów lekkich. W niektórych przypadkach obserwowano niewielkiej intensywności prążki albuminy lub innych białek. Mocze wybranych pacjentów zostały poddane procedurze oczyszczania łańcuchów lekkich, co dodatkowo minimalizowało wpływ innych białek na wynik analizy, ułatwiając interpretację rozdziałów chromatograficznych.

Wyniki rozdziałów zostały podzielone na trzy grupy. Podziału na grupy dokonano porównując wyniki rozdziałów chromatograficznych oraz elektroforezy SDS-PAGE badanych próbek:

Grupa 1 – w elektroforezie SDS-PAGE występowały jedynie prążki pochodzące od łańcuchów lekkich immunoglobulin, a w rozdziałach chromatograficznych występowały jedynie frakcje o czasach retencji właściwych dla łańcuchów lekkich (dimer, monomer). Obrazy elektroforezy SDS-PAGE były zgodne z wynikami rozdziałów chromatograficznych (ryc. 18).

Grupa 2 – w elektroforezie SDS-PAGE występowały jedynie prążki pochodzące od łańcuchów lekkich immunoglobulin, natomiast w rozdziałach chromatograficznych występowały frakcje o czasach retencji odpowiadających łańcuchom lekkim immunoglobulin (dimer, monomer) oraz frakcje o niższych czasach retencji odpowiadające białkom o wyższych masach cząsteczkowych. Zaobserwowano brak zgodności między obrazami elektroforezy SDS-PAGE oraz wynikami rozdziałów chromatograficznych (ryc. 19Ryc. 19).

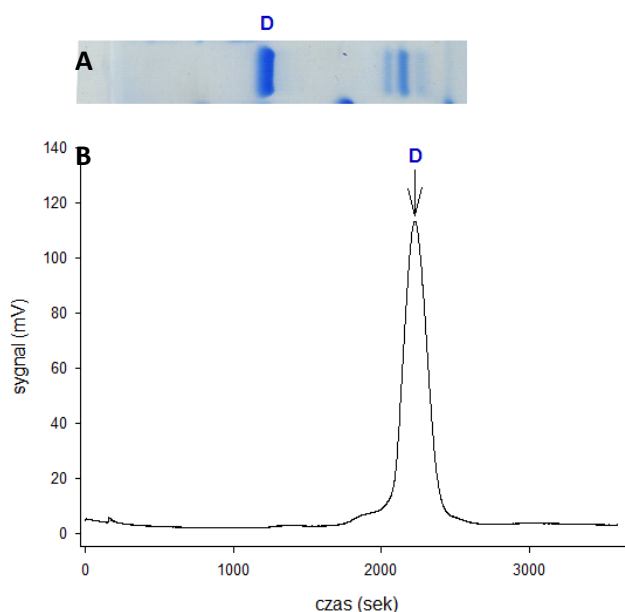
Grupa 3 – w elektroforezie SDS-PAGE obok prążków pochodzących od łańcuchów lekkich immunoglobulin zaobserwowano występowanie prążków pochodzących od albuminy oraz białek o wyższych masach cząsteczkowych. W rozdziałach chromatograficznych występowały frakcje o czasach retencji odpowiadających łańcuchom lekkim (dimer, monomer) oraz frakcje o niższych czasach retencji odpowiadające białkom o wyższych masach cząsteczkowych. Przyczyna pojawienia się w rozdziałach chromatograficznych frakcji białkowych odpowiadających białkom o wyższych masach cząsteczkowych była trudna do interpretacji. Frakcje o wyższych masach cząsteczkowych mogły odpowiadać zarówno oligomerom łańcuchów lekkich jak i białkom takim jak: albumina, transferyna, immunoglobuliny (ryc. 20).

W grupie 1 znalazło się 20 rozdziałów (20/53 = 37.74%). 9 przypadków odpowiadało łańcuchom lekkim o typie kappa, a 11 odpowiadało łańcuchom o typie lambda. Brak obecności frakcji o niższych czasach retencji (wyższej masie cząsteczkowej)

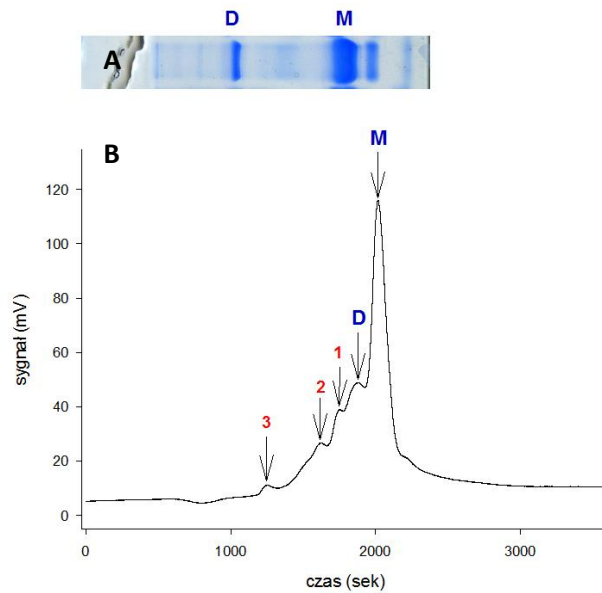
w rozdzielach chromatograficznych dowodzi, że w warunkach prowadzonego rozdzielu (izotoniczny bufor PBS, pH 7.4) wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin nie występowały w formie niekowalencyjnych oligomerów.

W grupie 2 znalazło się 20 rozdzielów (20/53 = 37.74%). 10 przypadków odpowiadało łańcuchom lekkim o typie kappa, pozostałe 10 przypadków odpowiadało łańcuchom o typie lambda. Występowanie frakcji o niższych czasach retencji (wyższej masie cząsteczkowej) w rozdzielach chromatograficznych dowodzi, że w warunkach prowadzonego rozdzielu (izotoniczny bufor PBS, pH 7.4) wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin tworzyły niekowalencyjne oligomery.

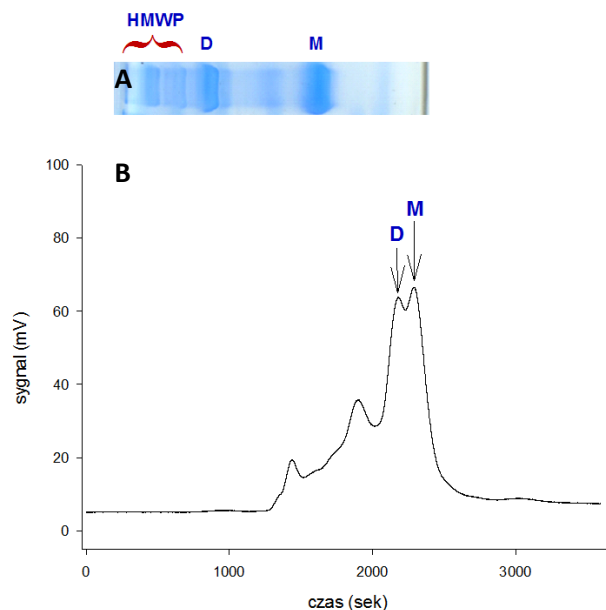
W grupie 3 znalazło się 13 rozdzielów (13/53 = 24.53%). 12 przypadków odpowiadało łańcuchom lekkim o typie kappa. 1 przypadek w tej grupie odpowiadał łańcuchom o typie lambda. Występowanie frakcji o niższych czasach retencji w rozdzielach chromatograficznych nie pozwala wykluczyć obecności wyższych niż dimer niekowalencyjnych form łańcuchów lekkich. Jednak obecność prążków o wyższych masach cząsteczkowych w elektroforezie SDS - PAGE uniemożliwia jednoznaczną interpretację wyników. Wyniki analizy zbiorczo zostały przedstawione na ryc. 21.



Ryc. 18 Wybrany rozdział chromatograficzny pacjenta zaklasyfikowanego do grupy 1. W rozdziale elektroforetycznym (A) widoczny prążek lokalizujący się w strefie dimeru łańcucha lekkiego immunoglobulin (D). Brak prążków w strefie białek wysokocząsteczkowych (na lewo od prążka dimeru). Wynik jest spójny z obrazem rozdzielu chromatograficznego (B). Nie zaobserwowano występowania oligomerycznych form łańcuchów lekkich.



Ryc. 19 Wybrany rozdział chromatograficzny pacjenta zaklasyfikowanego do grupy 2. W rozdziale elektroforetycznym (A) widoczne są dwa główne prążki: D – dimer FLC, M – monomer FLC, brak natomiast prążków w strefie białek wysokocząsteczkowych (na lewo od prążka dimeru). W rozdziale chromatograficznym (B) widoczne są dodatkowe piki o niższych czasach retencji (wyższych masach cząsteczkowych) od piku dimeru. 1 – tetramer FLC (88kDa); 2 – oktamer FLC (166 kDa); 3 – pik zlokalizowany w strefie objętości pustej kolumny.



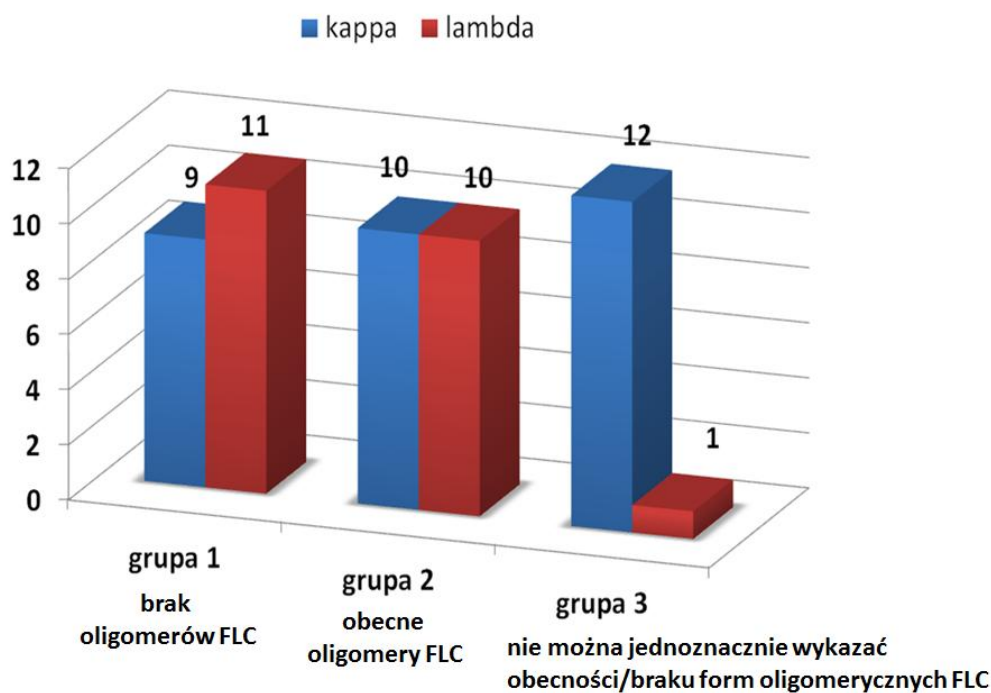
Ryc. 20 Wybrany rozdział chromatograficzny pacjenta zaklasyfikowanego do grupy 3. W rozdziale elektroforetycznym (A) obok prążków dimeru (D) oraz monomeru (M) widoczne są również prążki odpowiadające białkom o wyższych od dimeru masach cząsteczkowych (*HMWP* – ang. *high molecular weight protein* - albumina, transferyna, immunoglobuliny). W rozdziale chromatograficznym (B) obok piku dimeru FLC (D) oraz monomeru FLC (M) widoczne są dodatkowe piki o niższych czasach retencji, odpowiadające białkom wysokocząsteczkowym. Na podstawie wyniku chromatogramu nie można jednoznacznie zdefiniować pochodzenia pików.

Do dalszej analizy włączono jedynie pacjentów z grupy 1 oraz 2, ponieważ w tych grupach możliwe było jednoznaczne rozstrzygnięcie problemu obecności oligomerycznych form FLC.

Przy pomocy testu Manna-Whitney'a porównywano wartości odsetków kowalencyjnych dimerów FLC w grupach łańcuchów (oba typy FLC) tworzących formy oligomeryczne (n=20) oraz nie wykazujących tendencji do oligomeryzacji (n=19). Odsetek dimeru uzyskano z rozdziałów elektroforetycznych SDS-PAGE. Nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy odsetkami dimerów w obydwu grupach (p=0.36). Podobną analizę przeprowadzono także oddzielnie dla łańcuchów lekkich kappa (n=19) oraz lambda (n=21). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic (p=0.93) w wartościach odsetka dimeru pomiędzy łańcuchami lekkimi kappa tworzącymi formy oligomeryczne (n=10) i łańcuchami kappa nie tworzącymi form oligomerycznych (n=9). Również dla łańcuchów lambda nie wykazano statystycznie istotnych różnic (p=0.21) w wartościach odsetka dimeru pomiędzy grupą z oligomerami (n=10) i grupą, w której nie wykryto form oligomerycznych (n=11).

Podsumowując – spośród 53 próbek przebadanych pod kątem obecności/braku form oligomerycznych łańcuchów lekkich, wyniki rozdziałów 40 preparatów pozwoliły na jednoznaczną charakterystykę form cząsteczkowych (potwierdzenie/wykluczenie obecności oligomerów FLC). W 50% przypadków (20/40) nie stwierdzono występowania wolnych łańcuchów lekkich w formie innej niż monomer i (lub) kowalencyjny dimer. Dla pozostałych 50% badanych próbek (20/40) w oparciu o porównanie wyników dwóch technik separacji białek, można potwierdzić istnienie oligomerów FLC. Analizując pola powierzchni i wysokości pików pochodzących od niekowalencyjnych oligomerów łańcuchów lekkich w grupie 2 stwierdzono, że we wszystkich analizowanych przypadkach udział form oligomerycznych był niewielki.

W przypadkach(13/53), w których obraz z rozdziału elektroforetycznego w systemie SDS-PAGE ujawnił obecność białek o wyższych niż dimer FLC masach cząsteczkowych, bez analizy jakościowej składu poszczególnych frakcji chromatograficznych nie można jednoznacznie wykluczyć istnienia form oligomerycznych.



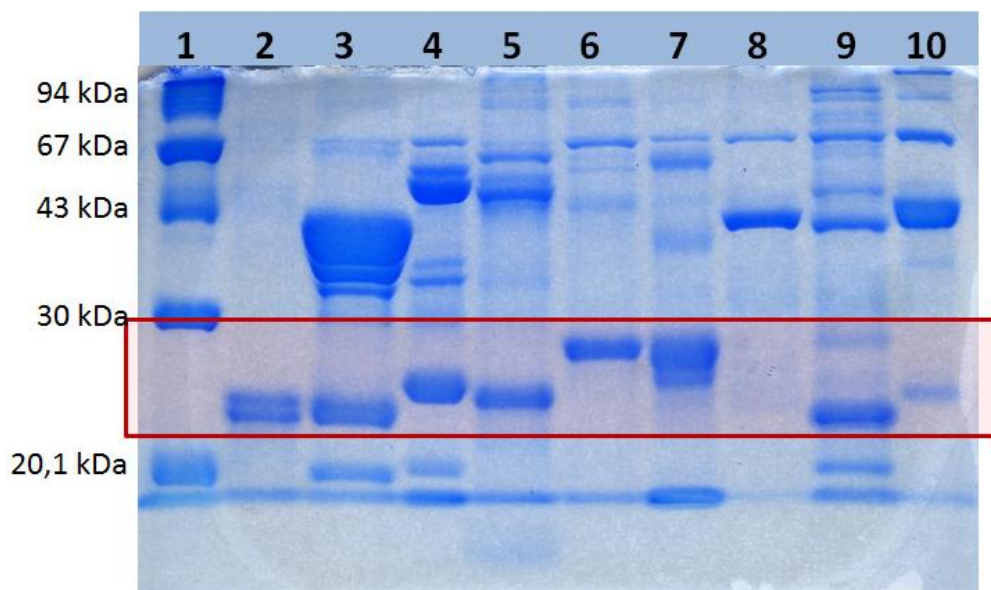
| | kappa | lambda |
|-------------------------|----------------|-----------------|
| Grupa 1 (n = 20) | n = 9 (17%) | n = 11 (18.9 %) |
| Grupa 2 (n = 20) | n = 10 (22.6%) | n = 10 (20.8%) |
| Grupa 3 (n = 13) | n = 12 (18.9%) | n = 1 (1.9%) |

Ryc. 21 Zestawienie liczebności grup, na jakie podzielono rozdziały chromatograficzne łańcuchów lekkich. Podziału na grupy dokonano porównując wyniki rozdziały chromatograficznych oraz elektroforezy SDS-PAGE badanych próbek. W grupie 1 zebrano przypadki, w których łańcuchy lekkie nie tworzyły form oligomerycznych. W grupie 2 oraz 3 zebrano przypadki, w których w rozdziałach chromatograficznych zaobserwowano występowanie pików odpowiadających białkom o masie cząsteczkowej > 44kDa. Jednak tylko dla łańcuchów zaklasyfikowanych do grupy 2 można było jednoznacznie wykazać obecność oligomerów FLC. W materiałach zaklasyfikowanych do grupy 3, także w rozdziałach elektroforetycznych zaobserwowano występowanie prążków pochodzących od białek o masach cząsteczkowych wyższych od dimeru łańcuchów lekkich. Dlatego nie można jednoznacznie wskazać obecności oligomerycznych form FLC jako przyczyny dodatkowych pików w rozdziałach chromatograficznych. W tabeli pod wykresem zestawiono dane liczbowe charakteryzujące poszczególne grupy (n - liczba rozdziały w grupie, % - odsetek grupy pacjentów włączonych do badania).

4.4 Zróźnicowanie mas cząsteczkowych monomeru oraz dimeru łańcuchów lekkich.

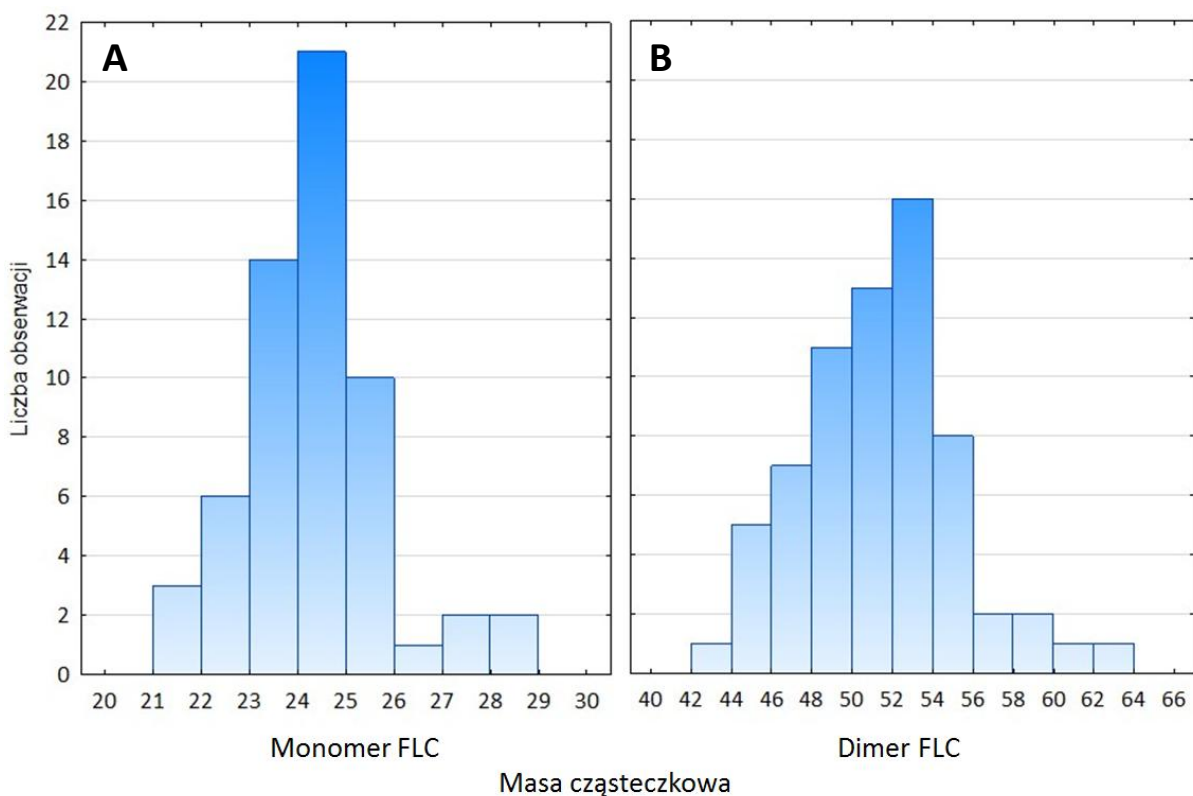
W celu oceny zróźnicowania mas cząsteczkowych dimeru oraz monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu pacjentów z gammadatią monoklonalną, przeprowadzono analizę względnej ruchliwości elektroforetycznej (Rf) frakcji monomeru i dimeru FLC na 12.5% żelu poliakrylamidowym (elektroforeza SDS-PAGE, warunki nieredukujące). Do analizy wybrano 74 rozdziały, które charakteryzowały się ostro wyodrębnionymi frakcjami białkowymi. W 52 przypadkach FLC występowały zarówno w formie dimerycznej jak i monomerycznej. W 15 przypadkach FLC występowały jedynie w formie dimerycznej, a w 7 przypadkach jedynie w formie monomerycznej. Do analizy włączono więc 67 prążków zlokalizowanych w strefie dimeru FLC oraz 59 prążków zlokalizowanych w strefie monomeru FLC. Łańcuchy lekkie kappa stanowiły 56.7% (n= 42), a łańcuchy lekkie lambda 43.3% (n=32) grupy badanej. Dla 47 rozdziałów, dla których obok prążków łańcuchów lekkich immunoglobulin zidentyfikowano prążek pochodzący od albuminy oszacowano również masę cząsteczkową albuminy. Zróźnicowanie masy cząsteczkowej albuminy określonej na podstawie zależności logarytmu masy cząsteczkowej białka od położenia prążka na żelu (Rf) wyznaczało zmienność związaną z metodą pomiaru.

Ryc. 22 przedstawia obraz przykładowego żelu poliakrylamidowego, na którym przeprowadzono rozdział materiału pochodzącego od 9 pacjentów z gammadatią monoklonalną i białkiem BJ w moczu. Różna lokalizacja prążków dimeru i monomeru FLC najbardziej zauważalna jest dla pacjentów na ścieżkach 4-7. W tych przypadkach masa cząsteczkowa formy monomerycznej mieści się w zakresie 24.8-29.2 kDa, a więc jest wyższa od opisywanej w piśmiennictwie masy 22 kDa [11]. Tylko 2 rozdziały z analizowanych ścieżek na żelu obok formy monomerycznej posiadają także formę dimeryczną – w obu przypadkach masa dimeru wynosi 54.3 kDa, jest więc również wyższa od opisywanej w literaturze masy 44kDa [11]. Spostrzeżenie to jest spójne z danymi dla całej analizowanej grupy. Średnie masy cząsteczkowych formy dimerycznej oraz monomerycznej FLC w analizowanej grupie wynosiły odpowiednio: 51.59 (+/- 3.94) kDa oraz 24.33 (+/- 1.49) kDa. Wyniki mas cząsteczkowych formy dimerycznej oraz monomerycznej FLC charakteryzowała stosunkowo wysoka zmienność. Współczynniki zmienności wynosiły: 7.64 % dla formy dimerycznej oraz 6.14% dla formy monomerycznej. 100% wyników masy cząsteczkowej formy dimerycznej mieściło się w zakresie 43.36 – 63.78 kDa, a dla formy monomerycznej w zakresie 21.23 – 28.74 kDa (dane zebrane w tabeli 7).



Ryc. 22 Rozdział elektroforetyczny łańcuchów lekkich immunoglobulin pochodzących z moczu wybranych pacjentów z gammapatią monoklonalną (ścieżki 2- 10). Rozdział przeprowadzono na 12.5% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS w środowisku buforu Tris-glicyna o pH 8.3, w warunkach nieredukujących. Na rycinie widoczne zróżnicowanie mas cząsteczkowych monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin (największe zróżnicowanie widoczne jest na ścieżkach 4-7). Obszar lokalizacji monomeru FLC (n= 8), wyróżniony za pomocą ramki, obejmuje masy cząsteczkowe 22.03 – 29.2 kDa (średnia = 24,74, CV = 10,6%). Ścieżka 1 - standard mas cząsteczkowych.

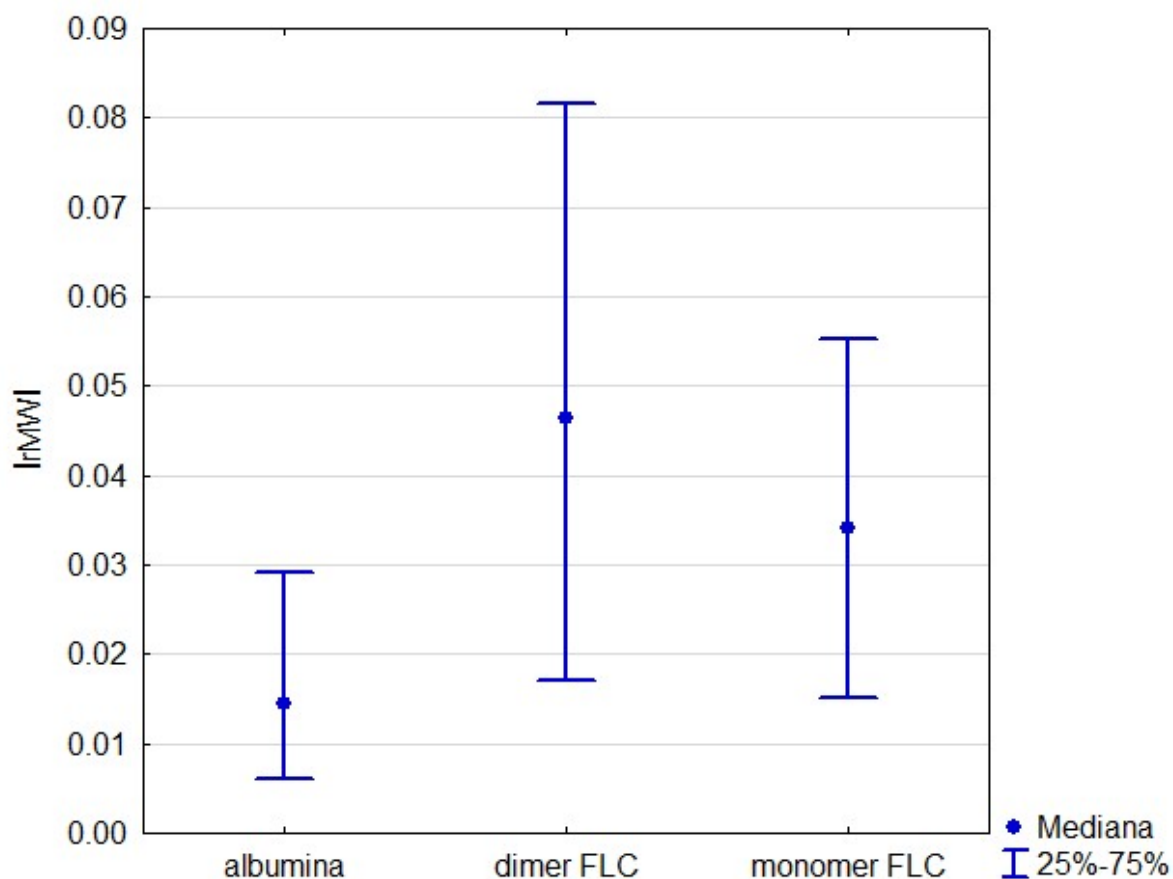
Analiza histogramu rozkładu masy cząsteczkowej dimeru FLC (ryc. 23) pokazuje, że najwięcej obserwacji (n=60; 89.6%) mieści się w szerokim zakresie 44-56 kDa, ze szczytem w przedziale 52-54 kDa (n=16). Można zaobserwować także pojedyncze wyniki o masach cząsteczkowych z przedziałów 42-44 kDa (n=1) oraz 56-64 kDa (n=6). Analizując histogram rozkładu masy cząsteczkowej monomeru FLC można stwierdzić, że najwięcej obserwacji mieści się w zakresie 23-26 kDa (n=51; 86.44 %) ze szczytem w przedziale 24-25 kDa (n=21). Pojedyncze wyniki lokują się w przedziałach: 21-22 kDa (n=3) oraz 26-29 kDa (n=5). Badanie normalności rozkładu mas cząsteczkowych formy monomerycznej oraz dimerycznej FLC za pomocą testu Shapiro- Wilka wykazało, że rozkłady te są zbliżone do rozkładu normalnego.



Ryc. 23 Histogramy rozkładów mas cząsteczkowych A – formy dimerycznej łańcuchów lekkich immunoglobulin, B – formy monomerycznej łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Tabela 7 Wybrane statystyki opisowe mas cząsteczkowych albuminy (białko stanowiące grupę kontrolną) oraz dimeru i monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin.

| MW [kDa] | albumina | Forma dimeryczna FLC | Forma monomeryczna FLC |
|-----------------------|--------------|----------------------|------------------------|
| Liczebność grupy (n) | 47 | 67 | 59 |
| Średnia, kDa | 67.17 | 51.59 | 24.33 |
| minimum-maksimum, kDa | 63.3 – 70.41 | 43.36 – 63.78 | 21.23 – 28.74 |
| SD, kDa | 1.64 | 3.94 | 1.49 |
| CV, % | 2.45 | 7.64 | 6.14 |



Ryc. 24 Wykres porównujący mediany względną masę cząsteczkową (rMW) trzech białek – albuminy (białko referencyjne), formy dimerycznej FLC oraz formy monomerycznej FLC. Za względną masę cząsteczkową przyjęto wyrażenie: $|(\text{średnia MW-pojedynczy wynik MW})/\text{średnia MW}|$. Zastosowanie wartości bezwzględnych miało na celu zniwelowanie wpływu znaku wartości liczbowych otrzymanych z wyrażenia na wyniki statystyk. Pionowe słupki oznaczają wartości górnego oraz dolnego kwantylu dla poszczególnych zmiennych.

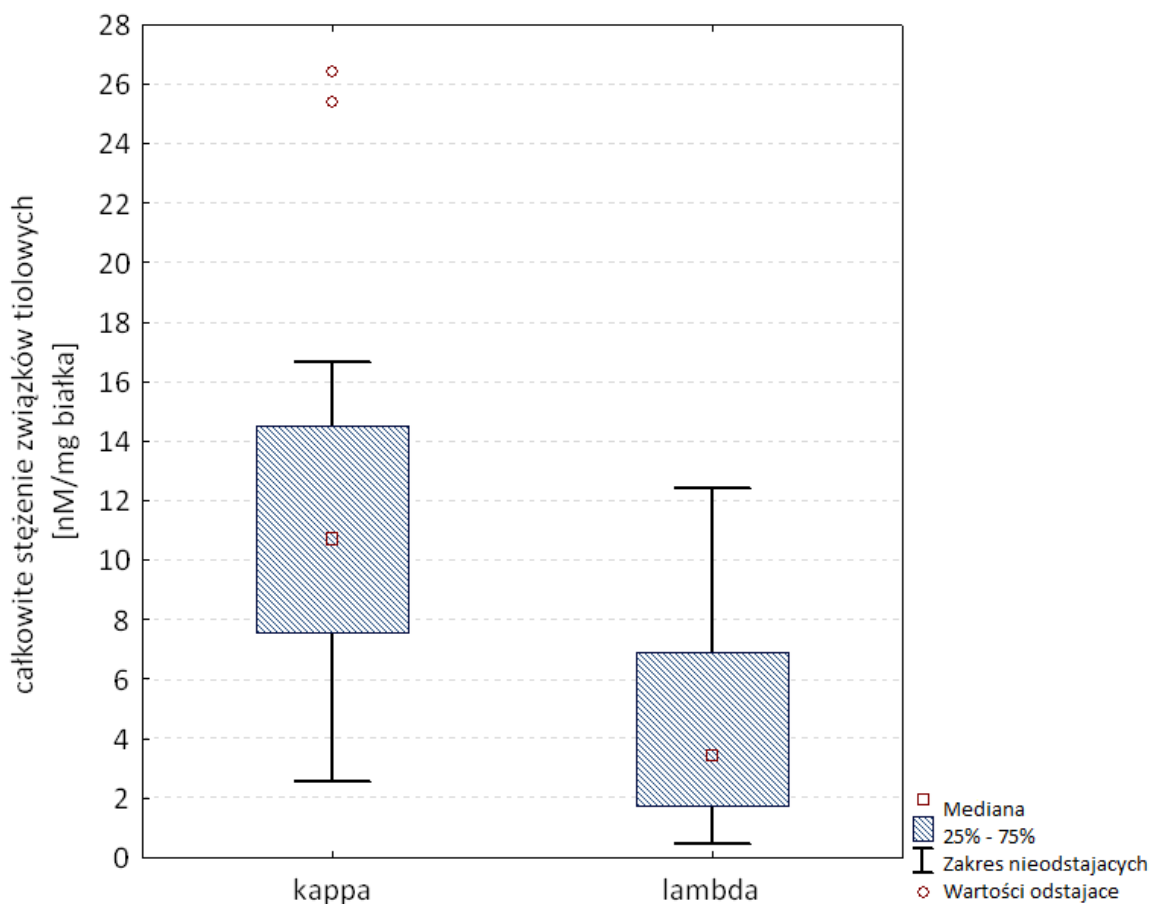
Aby wykazać, że zmienność mas cząsteczkowych dimeru i monomeru łańcuchów lekkich (CV = 7.64 % dla formy dimerycznej oraz 6.14% dla formy monomerycznej) jest spowodowana różnicami w strukturze tych białek (różna budowa fragmentów części zmiennej) porównano wartości miar rozproszenia tych zmiennych. Za miarę rozproszenia przyjęto wartość bezwzględną ilorazu różnicy średniej masy cząsteczkowej danego białka i pojedynczego wyniku oraz średniej masy cząsteczkowej: $|(\text{średnia MW-pojedynczy wynik MW})/\text{średnia MW}|$. Dla potrzeb niniejszej pracy porównywane wartości nazwano względną masą cząsteczkową (rMW – *relative molecular weight*) Analizie poddano monomery FLC, dimery FLC oraz albuminę (białko referencyjne). Do porównania trzech grup wyników zastosowano nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala – Wallisa. Analiza statystyczna wykazała istotność różnic pomiędzy medianami rMW w rozpatrywanych grupach

($H_{2,172} = 27.49$; $p < 0.0001$). Ryc. 24 przedstawia graficzną interpretację testu ANOVA, gdzie punkty wyznaczają wartości median rMW, natomiast pionowe słupki oznaczają wartości górnego i dolnego kwartyła dla poszczególnych zmiennych. Test ANOVA rang Kruskala - Wallisa pozwolił na odrzucenie hipotezy o równości median rMW albuminy, dimeru FLC oraz monomeru FLC, dlatego kolejnym krokiem było przeprowadzenie statystycznej analizy prowadzącej do wyjaśnienia, które wartości median istotnie różniły się między sobą. Analiza post-hoc wykazała istotność różnic pomiędzy medianami rMW dimeru FLC oraz albuminy ($p < 0.0001$), a także monomeru FLC oraz albuminy ($p < 0.0001$), przy jednoczesnym braku istotności różnicy między wartościami rMW formy dimerycznej i monomerycznej łańcuchów lekkich ($p = 0.41$). Dane te sugerują pomijalny wpływ zmienności otrzymanych wyników wyływającej z niedoskonałości i zmienności samej metody pomiarowej. Podkreślają również istniejące zróżnicowania mas cząsteczkowych zarówno dimerów jak i monomerów łańcuchów lekkich u różnych pacjentów z gammopatią monoklonalną spowodowane odmienną sekwencją aminokwasową tego białka.

4.5 Oznaczenie reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi immunoglobulin.

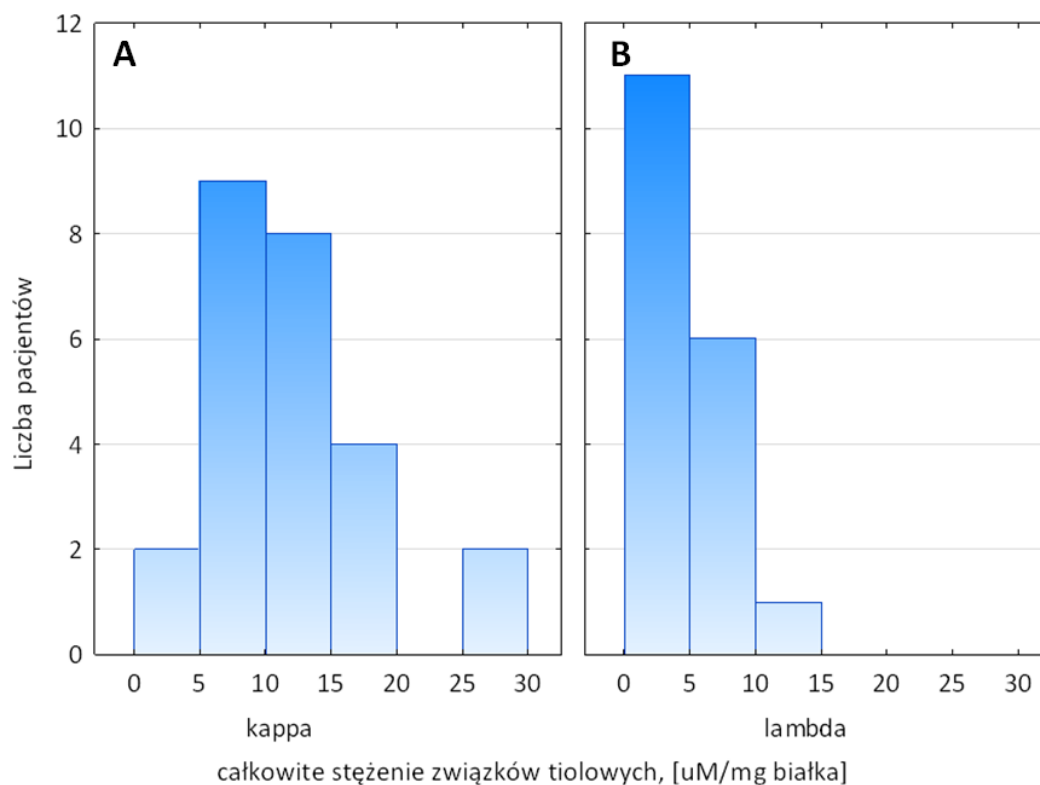
Do oznaczenia reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi immunoglobulin włączono mocze 43 pacjentów z gammopatią monoklonalną, u których stwierdzono obecność białka BJ. Aby wyeliminować wpływ obecnych w moczu wolnych związków tiolowych (stężenie wolnej cysteiny w moczu oznaczanej metodą HPLC z detekcją UV-Vis wynosi ok. 30 mM/mol kreatyniny [⁹⁷]), przeprowadzono izolację oraz dializę łańcuchów lekkich. Do badania włączono materiały, w których w elektroforetycznych rozdzielach SDS - PAGE nie stwierdzono obecności prążka albuminy. Cysteina w pozycji 34 łańcucha polipeptydowego albuminy nie jest zaangażowana w tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania disiarczkowego i jest miejscem przyłączenia drobnocząsteczkowych związków tiolowych [⁹³]. Stąd z grupy badanej wykluczono materiały, w których obecność albuminy mogłaby zawyżać wynik oznaczenia.

Całkowite stężenie reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi mieściło się w granicach 0.45 – 26.40 nM/mg białka. Badając stężenia reszt tiolowych dla dwóch typów łańcuchów wykazano, że stężenia reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami typu kappa są różne od stężeń reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi typu lambda (ryc. 25). Istotność różnic całkowitych stężeń reszt tiolowych w obu grupach została potwierdzona nieparametrycznym testem Manna-Whitney'a ($p < 0.0001$). Całkowite stężenie reszt tiolowych w grupie łańcuchów lekkich kappa mieściło się w zakresie: 2.53 – 26.40 nM/mg białka, z medianą wynoszącą 10.74 nM/mg białka. 50% obserwacji w tej grupie mieściło się w przedziale: 7.54 – 14.52 nM/mg białka. Dla łańcuchów lekkich lambda całkowite stężenie reszt tiolowych było niższe i mieściło się w zakresie: 0.45 – 12.41 nM/mg białka, z medianą wynoszącą 3.43 nM/mg białka. 50% obserwacji w tej grupie mieściło się w przedziale 1.75 - 6.90 nM/mg białka.



Ryc. 25 Porównanie całkowitego stężenia reszt tiolowych sprzężonych z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi kappa oraz lambda. Na wykresie zostały zaznaczone następujące statystyki opisowe: mediana, dolny, górny kwartył oraz zakres wartości nieodstających. Uwidoczniono również wartości odstające (obecne jedynie w grupie łańcuchów lekkich kappa).

Analiza histogramów rozkładu całkowitego stężenia reszt tiolowych w grupie monoklonalnych łańcuchów kappa oraz lambda (ryc. 26) potwierdziła obserwacje na temat odmienności w wartościach stężeń reszt tiolowych w grupie kappa oraz lambda. W przypadku łańcuchów lekkich lambda dla ponad 61% ($n=11$) obserwacji całkowite stężenie reszt tiolowych było <5 nM/mg białka, podczas gdy 68% ($n=17$) obserwacji dla łańcuchów lekkich kappa mieściło się w przedziale 5-15 nM/mg białka. U 11% ($n=2$) pacjentów z łańcuchami lambda stężenie reszt tiolowych wynosiło <1 nM/mg białka. Tak niskich stężeń reszt tiolowych nie obserwowano w grupie łańcuchów lekkich kappa. W 5.6% ($n=1$) przypadków z łańcuchami lekkimi lambda stężenie reszt tiolowych było >10 nM/mg białka, natomiast w grupie łańcuchów lekkich kappa 8% ($n=2$) przypadków charakteryzowało stężenie reszt tiolowych rzędu ok. 25 nM/mg białka (najwyższe stężenie reszt tiolowych w tej grupie).



Ryc. 26 Rozkłady całkowitych stężeń reszt tiolowych w grupie pacjentów z monoklonalnymi łańcuchami lekkich kappa (A) oraz lambda (B).

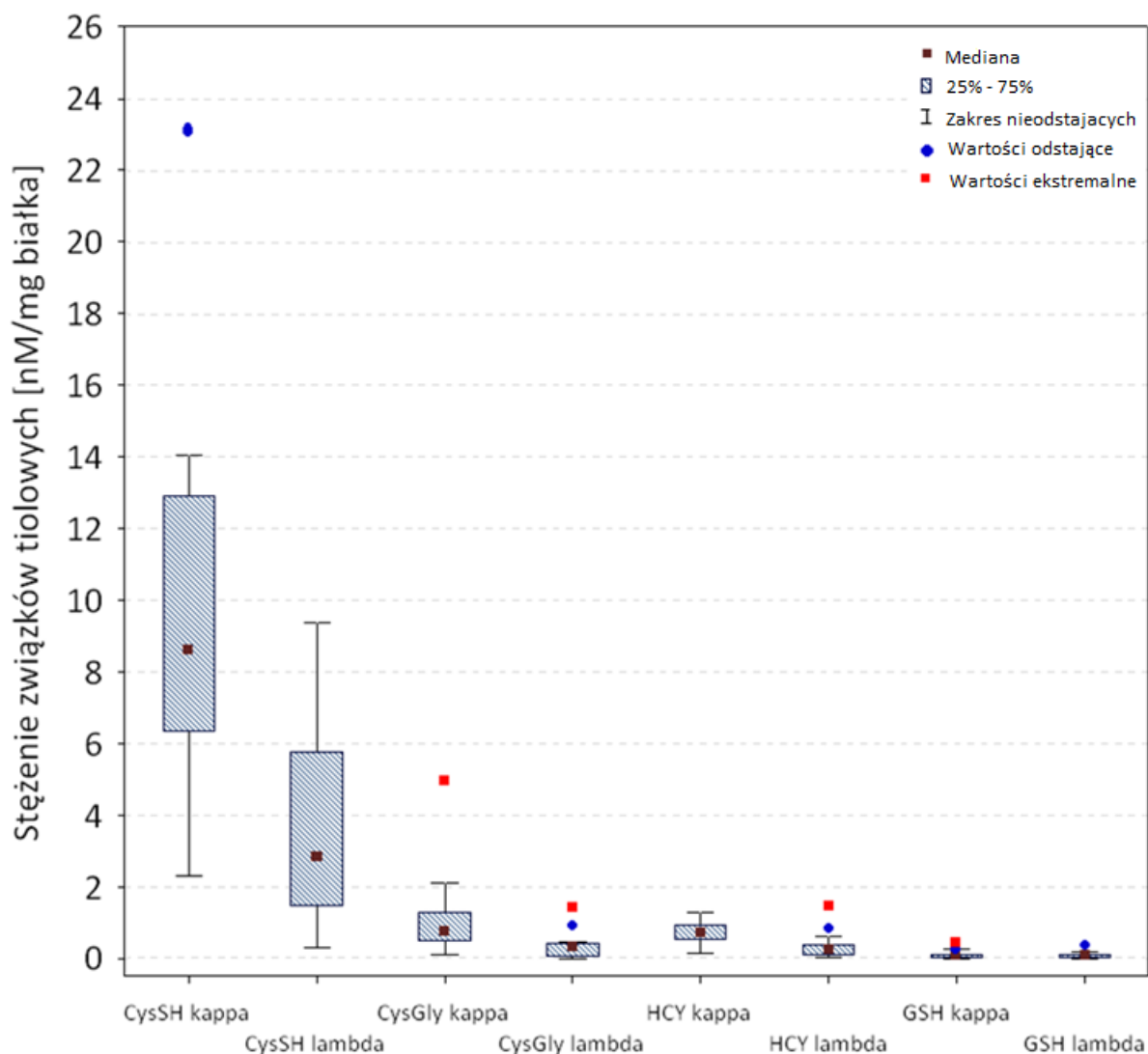
Dokonano również analizy stężeń czterech wybranych związków tiolowych. Częsteczki łańcuchów lekkich najczęściej tworzyły mieszane disiarczki z resztami cysteiny. Mediana stężenia sprzężonej z FLC cysteiny wynosiła 9.72 (2.29-23.13) nM/mg białka dla FLC kappa oraz 2.81 (0.28 - 9.39) nM/mg białka dla FLC lambda. Stężenia homocysteiny oraz cysteinylglicyny były zbliżone do siebie, ich mediany wynosiły odpowiednio: 0.71 (0.12-1.3) i 1.01 (0.09-4.95) nM/mg białka dla FLC kappa oraz 0.24 (0.04-1.48) i 0.27 (0.08-0.40) mM/mg białka dla FLC lambda. Stężenie glutationu było najniższe, z medianą 0.07 (0-0.43) nM/mg białka dla FLC kappa oraz 0.05 (0 – 0.35) nM/ mg białka dla FLC lambda (wyniki zebrano w tabeli 8).

Wykorzystując test Manna-Whitney'a wykazano istotne różnice w stężeniach cysteiny ($p < 0.0001$), cysteinylglicyny ($p = 0.0004$) oraz homocysteiny ($p = 0.0002$) między łańcuchami lekkimi kappa oraz lambda. Nie wykazano istotnej różnicy w stężeniu glutationu ($p = 0.6$). Brak znamiennej różnicy w stężeniach glutationu w grupie łańcuchów kappa oraz lambda można wytłumaczyć niewielkim udziałem reszt glutationowych w tworzeniu mieszanych disiarczków z cząsteczkami FLC. Stężenia glutationu były zbliżone do dolnej granicy czułości używanej metody pomiarowej. Różnice w stężeniach poszczególnych reszt tiolowych w grupie kappa oraz lambda przedstawiono na ryc. 27. Szczególnie ważne wydają się być

zaznaczone na rycinie wartości odstające oraz ekstremalne. W przypadkach ekstremalnych i odstających wysokie stężenia reszt tiolowych związanych z łańcuchami lekkimi były związane z wysokimi odsetkami monomerów FLC. Dla łańcuchów lekkich kappa najwyższe stężenia cysteiny (2 wartości odstające) związane są z przypadkami, gdzie odsetek monomeru wynosił 100%; najwyższe stężenie cysteinyloglicyny (1 wartość ekstremalna) dotyczyło przypadku, gdzie odsetek monomeru wynosił 50%; najwyższe stężenia glutationu (1 wartość odstająca oraz 1 wartość ekstremalna) dotyczyły przypadków z odsetkiem monomeru ok. 65% oraz 100%. W grupie łańcuchów lambda nietypowe wyniki dotyczyły 3 przypadków z odsetkami monomeru FLC: 47.1%, 41.7% oraz 27.73%. W dwóch pierwszych przypadkach zaobserwowano wysokie stężenia cysteinyloglicyny oraz homocysteiny, natomiast trzeci przypadek charakteryzowało wysokie stężenie glutationu.

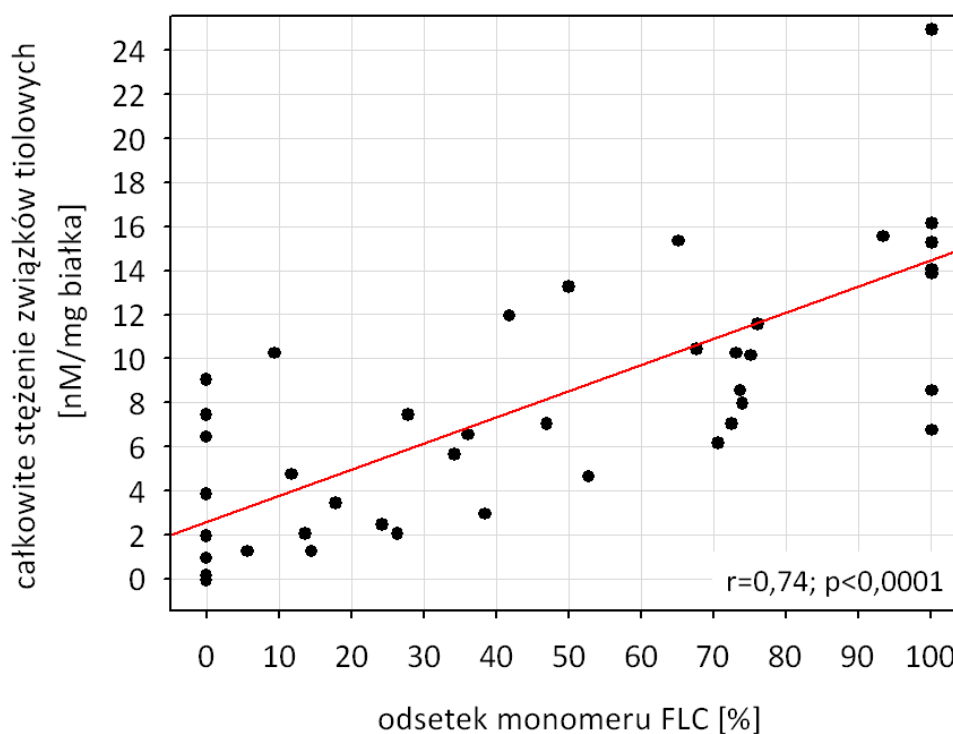
Tabela 8 Wybrane statystyki opisowe dla stężeń poszczególnych związków tiolowych związanych z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi.

| Związek tiolowy | | Mediana [nM/mg białka] | dolny-górny kwartyl [nM/mg białka] | minimum- maksimum [nM/mg białka] |
|--|---------------|---------------------------|--|--|
| Cysteina | kappa (n=25) | 9.72 | 6.34 – 12.9 | 2.29 – 23.13 |
| | lambda (n=18) | 2.81 | 1.46 – 5.75 | 0.28 – 9.39 |
| Cysteinyloglicyna | kappa (n=25) | 1.01 | 0.49 – 1.26 | 0.09 – 4.95 |
| | lambda (n=18) | 0.27 | 0.08 – 0.40 | 0 – 1.4 |
| Homocysteina | kappa (n=25) | 0.71 | 0.52 – 0.93 | 0.12 – 1.30 |
| | lambda (n=18) | 0.24 | 0.12 – 0.36 | 0.04 – 1.48 |
| Glutation | kappa (n=25) | 0.07 | 0.03 – 0.12 | 0 – 0.43 |
| | lambda (n=18) | 0.05 | 0.03 – 0.11 | 0 – 0.35 |
| Całkowite stężenie reszt tiolowych | kappa (n=25) | 10.74 | 7.54 – 14.52 | 2.53 – 26.40 |
| | lambda (n=18) | 3.43 | 1.75 – 6.90 | 0.45 – 12.41 |



Ryc. 27 Porównanie stężenia poszczególnych związków tiolowych dla monoklonalnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda. Porównywano wartości stężeń następujących związków tiolowych: cysteiny (CysSH), cysteinyloglicyny (CysGly), homocysteiny (HCY) oraz glutationu (GSH). Na wykresie zostały zaznaczone następujące statystyki opisowe: mediana, dolny, górny kwartył oraz zakres wartości nieodstających, uwidoczniono również wartości odstające oraz ekstremalne.

W kolejnym etapie analizy badano zależność między całkowitym stężeniem reszt tiolowych a odsetkiem monomeru monoklonalnych łańcuchów lekkich. Z wykorzystaniem współczynnika korelacji porządku rang Spearmana wykazano istotność wspomnianej zależności ($p < 0.0001$). Dodatkowo współczynnik korelacji 0.74 świadczy, że między tymi dwoma parametrami istnieje bardzo wysoka korelacja [⁹⁸] (ryc. 28).



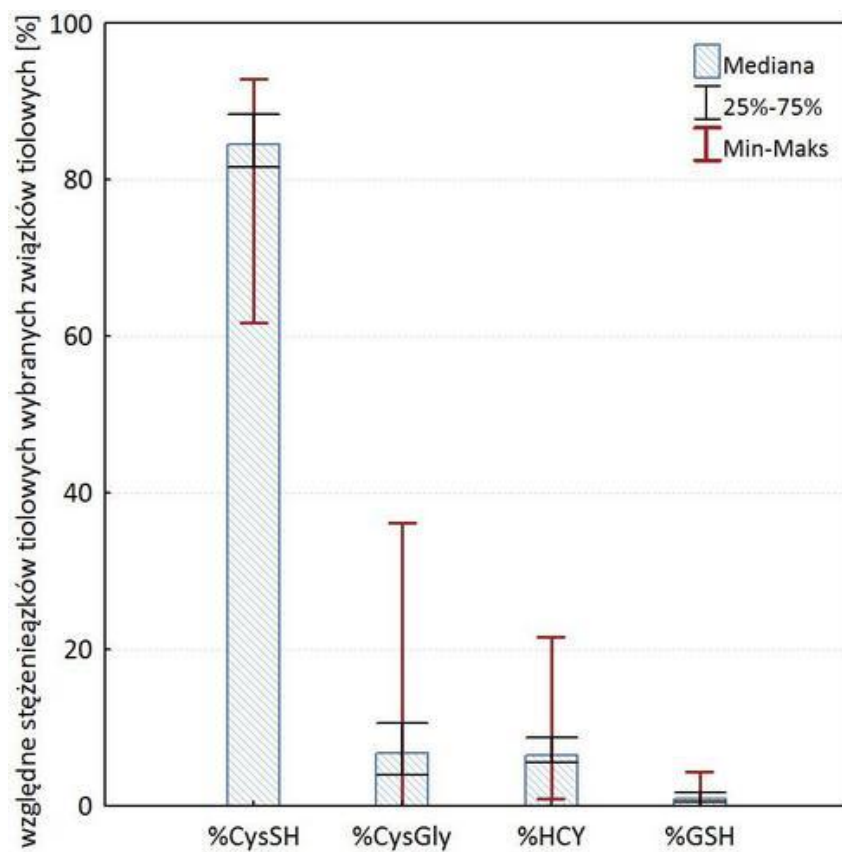
Ryc. 28 Zależność całkowitego stężenia reszt tiolowych względem odsetka monomeru monoklonalnych łańcuchów lekkich. Analiza korelacji rang Spearmana potwierdziła statystyczną istotność przedstawionej zależności. Na dole ryciny podano współczynnik korelacji rang Spearmana (r) oraz poziom istotności (p).

W celu analizy profilu stężeń reszt tiolowych obliczono względne stężenie poszczególnych związków tiolowych, wyrażone jako stosunek stężenia określonego związku tiolowego do sumy stężeń wszystkich oznaczanych tioli [%]. Ponieważ względne stężenia poszczególnych związków tiolowych nie mają rozkładów normalnych (test Shapiro-Wilka), wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz zakresu górny – dolny kwartył (tabela 9). Dla większości badanych preparatów monoklonalnych FLC profil względnych stężeń związków tiolowych przedstawiał się w podobny sposób. Głównym związkiem tiolowym była cysteina (mediana = 84.51%); względne stężenia cysteinyloglicyny oraz homocysteiny były zbliżone do siebie (mediany odpowiednio: 6.80%, 6.52%); natomiast względne stężenie glutationu było najniższe (mediana = 0.87%). Nie zaobserwowano różnic w profilu tiolowym pomiędzy łańcuchami lekkimi kappa oraz lambda, co potwierdzono nieparametrycznym testem Manna-Whitney’a. Różnice w profilach związków tiolowych dla poszczególnych pacjentów dotyczyły stężeń homocysteiny oraz cysteinyloglicyny. W 18 przypadkach stężenie cysteinyloglicyny sprzężonej z cząsteczką FLC było wyższe od stężenia homocysteiny. W kolejnych 18 przypadkach profil tiolowy był nieco odmienny – stężenie homocysteiny przewyższało stężenie cysteinyloglicyny. Pozostałe 6 przypadków dotyczyły profilu, gdzie stężenie homocysteiny i cysteinyloglicyny były takie same. Dla 6 przypadków (3 FLC kappa oraz 3 FLC lambda) stężenie glutationu było nieoznaczalne, natomiast w 1 przypadku nieoznaczalne było stężenie cysteinyloglicyny (FLC lambda). Największą zmiennością charakteryzowały się względne stężenia cysteinyloglicyny. 50% obserwacji znajdowało się w przedziale 4.0% – 10.57%.

Tabela 9 Wybrane statystyki opisowe względnego stężenia [%] poszczególnych związków tiolowych związanych z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi.

| Związek tiolowy | Mediana [%] | dolny-górny kwartył [%] | minimum-maksimum [%] |
|-------------------|-------------|-------------------------|----------------------|
| Cysteina | 84.51 | 81.64 – 88,41 | 61.74 – 92.83 |
| Cysteinyloglicyna | 6.80 | 4.0 – 10.57 | 0 – 36.19 |
| Homocysteina | 6.52 | 5.61 – 8.68 | 0.90 – 21.58 |
| Glutation | 0.87 | 0.48 – 1.7 | 0 – 4.44 |

Ryc. 29 przedstawia profil stężeń związków tiolowych sprzężonych z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi. Wyniki przedstawiono w postaci median względnych stężeń odpowiednich związków tiolowych. Na rycinie nie uwzględniono podziału na typ łańcucha lekkiego.



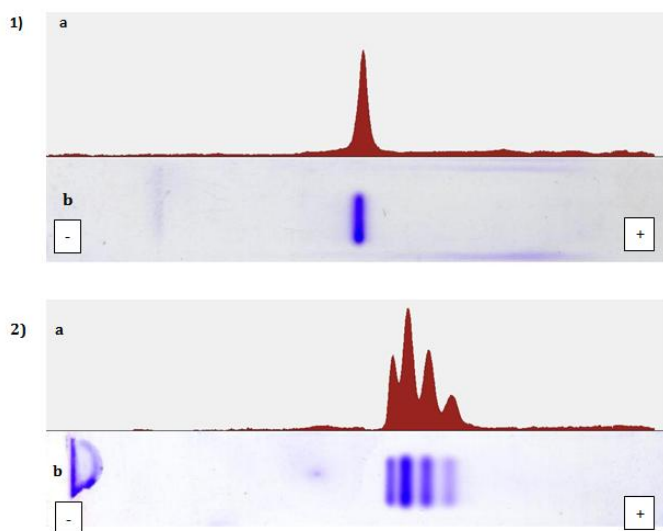
Ryc. 29 Profil względnych stężeń związków tiolowych związanych z łańcuchami lekkimi pacjentów z gamopatią monoklonalną. Na rycinie kolorem czarnym zaznaczono zakresy, w których mieści się 50% obserwacji (dolny-górny kwartył), a kolorem czerwonym rozstęp bezwzględnych wartości odpowiednich związków tiolowych (min. – max.).

4.6 Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin u pacjentów z gammopatią monoklonalną.

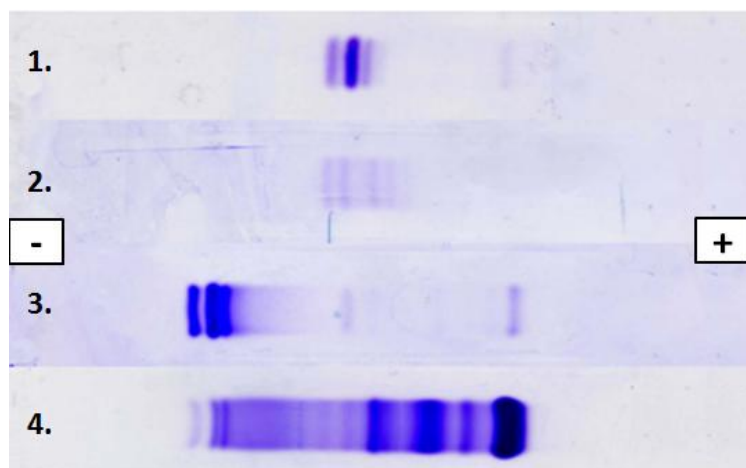
Używany w pracy termin „drabiny” łańcuchów lekkich lub „zjawisko drabin” dotyczy przypadków, gdy w rozdziale elektroforetycznym HRE zaobserwowano kilka (min. 3) odgraniczonych prążków (frakcji) białkowych w obszarze ruchliwości łańcuchów lekkich. Najczęstszym obrazem klasyfikowanym jako drabiny łańcuchów lekkich było występowanie 3-4 prążków białkowych pochodzących od FLC. W toku analizy zauważono, że występowanie drabin FLC jest zjawiskiem rzadkim. W rozdzielach elektroforetycznych wolne łańcuchy lekkie najczęściej migrują na żelu HR w postaci jednego niezróżnicowanego prążka. Aby lepiej zobrazować zjawisko występowania drabin FLC przeprowadzono analizę gęstości optycznej poszczególnych prążków (frakcji białkowych) wraz z wykreśleniem densytogramu przy użyciu autorskiego programu DensyGraf.

Ryc. 30 przedstawia porównanie rozdzielów elektroforetycznych oraz densytogramów najbardziej typowych FLC tworzących obraz drabin (2) oraz migrujących jako pojedyncza frakcja (1).

System elektroforezy HRE rozdziela białka przede wszystkim ze względu na różnice w ładunku. Łańcuchy lekkie immunoglobulin, jako białka o dużej heterogenności w strukturze pierwszorzędowej, charakteryzują się heterogennym ładunkiem elektrycznym. Ruchliwość FLC na żelach HR była bardzo zróżnicowana (ryc. 31).



Ryc. 30 Rozdziały elektroforetyczne (b) oraz densytogramy (a) łańcuchów lekkich immunoglobulin pochodzących z moczu pacjentów ze zdiagnozowaną gammopatią monoklonalną i obecnym białkiem Bence-Jonesa. Rozdział prowadzono w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej na żelu agarozowym (*HRE Electrophoresis* firmy *Ciba Corning Diagnostics*): 1) brak drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin – na obrazie widoczna pojedyncza strefa białkowa. 2) obraz drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin (preparat FLC κ_{470AD}) – widoczne cztery frakcje białkowe.



Ryc. 31 Rozdział elektroforetyczny łańcuchów lekkich immunoglobulin wybranych pacjentów z gammopatią monoklonalną w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej (HRE). We wszystkich przypadkach widoczne jest zjawisko drabin łańcuchów lekkich. Na ścieżkach 1-3 zaaplikowano mocz pacjentów, na ścieżce 4 zaaplikowano surowicę pacjenta. Drabiny łańcuchów lekkich charakteryzuje zróżnicowana ruchliwość elektroforetyczna. Zjawisko drabin w pewnych przypadkach udaje się udokumentować również w surowicy.

Dla potrzeb niniejszej pracy została wykonana elektroforeza wysokorozdzielcza (HRE) moczu 165 pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa. U 24 (14.5%) pacjentów zaobserwowano występowanie w obrazie elektroforetycznym HRE obrazu drabin FLC. U pozostałych 141 (85.5%) pacjentów łańcuchy lekkie immunoglobulin stanowiły jednorodną frakcję. Analiza typu łańcuchów lekkich przy użyciu automatycznego analizatora BEHRING Nephelometer II oraz za pomocą immunofiksacji wykazała, że w 20 przypadkach (83.33% drabin) drabiny utworzone były przez łańcuchy lekkie typu kappa. Pozostałe 4 przypadki (16.66% drabin) reprezentowane były przez łańcuchy lekkie typu lambda.

W celu wyjaśnienia zjawiska występowania i warunków powstawania wielu rozdzielanych elektroforetycznie form cząsteczkowych FLC przeprowadzono kilka grup eksperymentów używając głównie oczyszczonego preparatu łańcuchów lekkich typu kappa (κ _470AD) otrzymanego z moczu pacjenta z rozpoznaną chorobą łańcuchów lekkich. Przesłankami, które zadecydowały o wyborze materiału do dalszych badań były:

- ✓ stwierdzenie w moczu pacjenta obrazu drabin uzyskanego w trakcie elektroforetycznego rozdziału niezagęszczonej próbki moczu,
- ✓ możliwość uzyskania stosunkowo dużej ilości materiału do badań (dobowe wydalanie łańcuchów lekkich w tym przypadku wynosiło 40g).

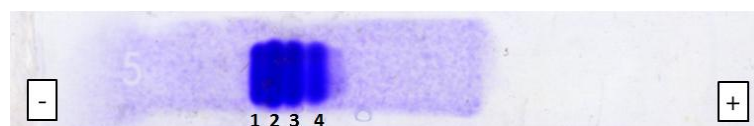
Zjawisko drabin dla łańcuchów lekkich κ 470AD przedstawiał się jako obraz dobrze rozdzielonych 4 frakcji białkowych o różnej gęstości optycznej. Dla potrzeb niniejszej pracy, poszczególnym frakcjom nadano kolejny numer, stosując konwencję, w której frakcją nr 1 nazywany jest prążek zlokalizowany najbliżej elektrody ujemnej. Procentowa zawartość

białka w poszczególnych frakcjach wyliczona na podstawie gęstości optycznej frakcji została przedstawiona w tabeli 10. Frakcja 2 jest frakcją o największej procentowej zawartości białka (40.03%), natomiast frakcję 4 charakteryzuje najmniejsza procentowa zawartość białka (13.93%). Przeprowadzono także analizę zmienności procentowej zawartości białka w poszczególnych frakcjach bazując na obrazie 5 powtórzeń rozdziału łańcuchów κ 470AD. Współczynniki zmienności wynosiły: dla frakcji 1 – 12.5%; dla frakcji 2 – 3.9%; dla frakcji 3 – 5.2% oraz dla frakcji 4 – 12.5%.

Tabela 10 Procentowy rozkład poszczególnych frakcji dla łańcuchów lekkich immunoglobulin tworzących obraz drabin (κ 470AD). Frakcją 1 nazywany jest prążek (frakcja białkowa) zlokalizowany najbliżej elektrody ujemnej.

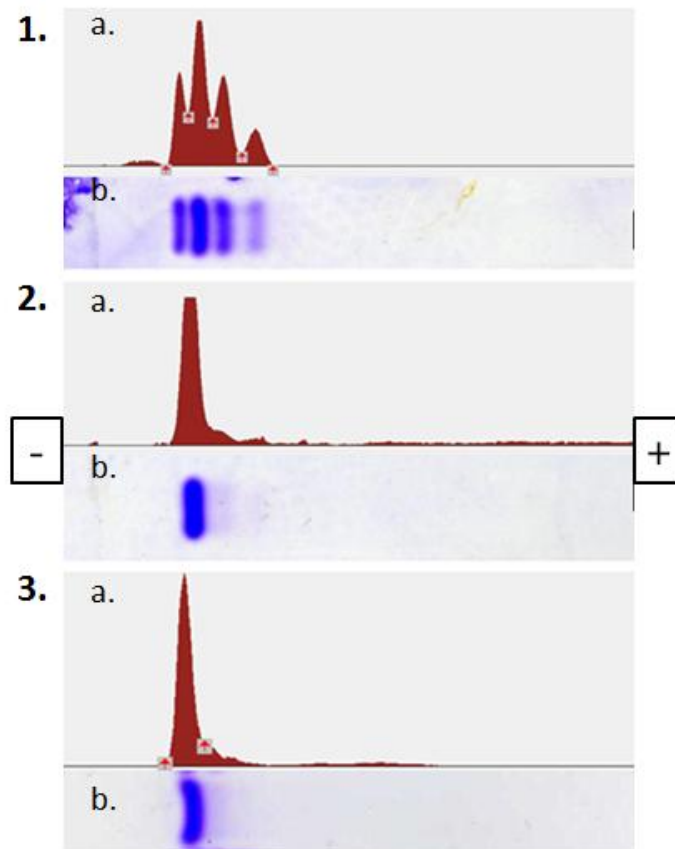
| Frakcja | Wartość [%] |
|-----------|-------------|
| Frakcja 1 | 18.63 |
| Frakcja 2 | 40.03 |
| Frakcja 3 | 27.41 |
| Frakcja 4 | 13.93 |

W celu zbadania, czy w obszarze migracji FLC znajdują się inne białka, które przyczyniają się do powstania obrazu drabin, po wykonaniu rozdziału łańcuchów κ 470AD w systemie HRE przeprowadzono wizualizację prążków przy użyciu monoklonalnych przeciwciał anty- κ . Wszystkie z czterech frakcji białkowych tworzących drabinę zostały uwidocznione na żelu, co dowodzi, że rozdzielane elektroforetycznie frakcje białkowe tworzące drabinę są różnymi formami cząsteczkowymi łańcuchów lekkich (ryc. 32).



Ryc. 32 Rozdział łańcuchów lekkich κ 470AD w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej firmy *Ciba Corning Diagnostics*, do wizualizacji których zostały użyte monoklonalne przeciwciała anty- κ (*Sebia*). Po inkubacji z przeciwciałami anty- κ oraz usunięciu ich nadmiaru żel został wybarwiony za pomocą kwaśnego fioletu. Zabarwieniu uległy wszystkie cztery prążki, co dowodzi, że w obszarze występowania prążków nazywany „drabinami FLC” nie migrują inne białka. Za powstanie drabiny odpowiedzialne są wyłącznie prążki białkowe pochodzące od łańcuchów lekkich immunoglobulin.

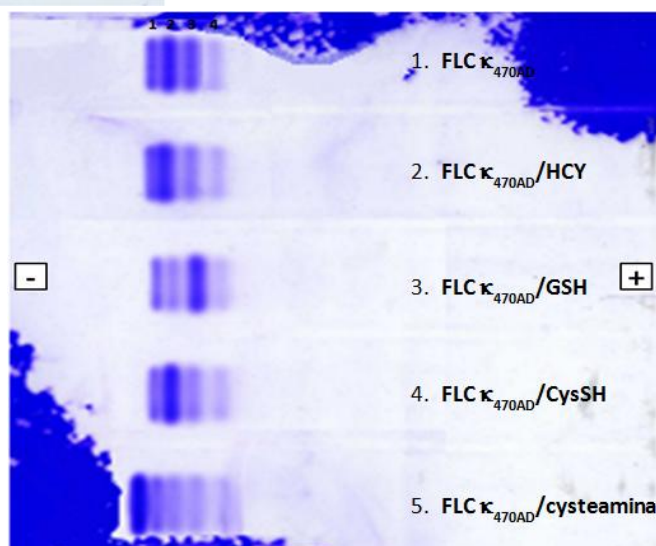
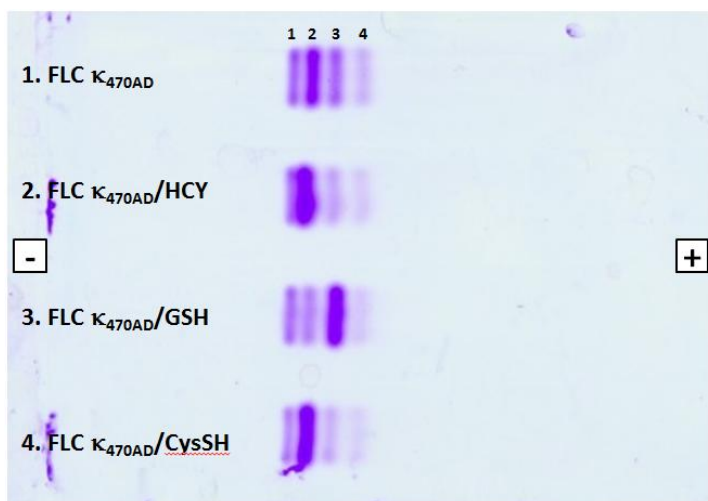
Przeprowadzono również kilka eksperymentów z udziałem związków o charakterze silnych reduktorów jak: tris (2-carboxyl) fosfina (TCEP) oraz ditiotreititol (DTT). Ditiotreititol jest jednym z najbardziej popularnych reduktorów, często używanym do redukcji wiązań disiarczkowych lub zapobiegania utlenieniu wolnych grup sulfhydrylowych. Jednak wobec łatwości, z jaką DTT jest utleniany przez tlen zawarty w powietrzu, w wielu pracach zostaje on zastąpiony przez inne związki redukujące jak np. TCEP [99]. Roztwór FLC κ 470AD o stężeniu 10g/l inkubowano z 0.1mM roztworem DTT oraz 0.25M roztworem TCEP (t = 30 min., T = 25° C). Zredukowane próbki zaaplikowano na żel HRE wobec natywnych łańcuchów κ 470AD i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Wynik eksperymentu został przedstawiony na ryc. 33. Pod działaniem zastosowanych związków redukujących obraz rozdziału FLC κ 470AD uległ zmianie. Cztery frakcje białkowe zostały przekształcone w jednorodną frakcję lokującą się w obszarze migracji frakcji 2 drabiny. Wyniki doświadczenia sugerują udział związków tiolowych w powstawaniu zjawiska drabin łańcuchów lekkich.



Ryc. 33 Rozdziały elektroforetyczne (a) oraz densytometry rozdziałów (b) łańcuchów lekkich kappa (κ 470AD) w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej (HRE) firmy *Ciba Corning Diagnostics*. Łańcuchy lekkie immunoglobulin κ 470AD (10g/l) (1) zostały poddane działaniu reduktorów: 1mM r-r DTT (2) oraz 0.25M TCEP (3). Przekształcenie czterech frakcji białkowych w pojedynczą frakcję białkową, sugeruje udział związków tiolowych w tworzeniu drabiny łańcuchów lekkich.

Kolejna grupa eksperymentów związana była z badaniem wpływu na zjawisko drabin inkubacji łańcuchów κ470AD ze związkami tiolowymi. W tym celu roztwór κ470AD o stężeniu 10 g/l inkubowano z 1mM roztworami homocysteiny, glutationu, cysteiny oraz cysteaminy. Po 12h inkubacji w temperaturze pokojowej materiał zaaplikowano na żel HRE i wykonano elektroforezę. Ryc. 34 przedstawia wyniki dwóch eksperymentów przeprowadzonych w różnym czasie. Pod wpływem inkubacji ze związkami tiolowymi nastąpiła zmiana procentowej zawartości białka w poszczególnych frakcjach. Procentowy rozkład poszczególnych frakcji przed oraz po inkubacji z odpowiednimi związkami tiolowymi został przedstawiony w tabeli 11. Zwracają uwagę najbardziej znamienne przesunięcia w wartościach procentowych frakcji 2 oraz 3 dla cysteiny, homocysteiny oraz glutationu oraz odmienny sposób migracji łańcuchów κ470AD po inkubacji z cysteaminą. Profile procentowej zawartości białka w poszczególnych frakcjach dla łańcuchów lekkich inkubowanych z homocysteiną i cysteiną wydają się być bardzo podobne. Fakt ten można tłumaczyć zbliżoną strukturą chemiczną obu związków tiolowych (homocysteina od cysteiny różni się jedynie dodatkową grupą $-CH_2-$). Inkorporacja homocysteiny jak i cysteiny do jednej z molekularnych form łańcuchów lekkich tworzących drabinę wywiera podobny wpływ na ładunek elektryczny białka. W obu tych przypadkach procentowa zawartość białka we frakcji 2 wzrosła, natomiast zmalała procentowa zawartość białka we frakcji 3 (w stosunku do wartości dla natywnych łańcuchów). Procentowe zawartości białka we frakcjach 1 oraz 4 również zmalały, jednakże zmiana nie przekraczała wyliczonego wcześniej współczynnika zmienności dla procentowej zawartości białka w tych frakcjach. W przypadku preparatu inkubowanego z glutationem można zaobserwować, że najbardziej intensywna jest frakcja 3. Frakcja 1 charakteryzuje się podobną gęstością optyczną, co frakcja 1 łańcuchów natywnych. Frakcja 2 natomiast ma najniższą gęstość optyczną spośród odpowiadających jej frakcji w rozdziałach łańcuchów natywnych oraz inkubowanych z pozostałymi związkami tiolowymi. Frakcję 4 charakteryzuje najmniejsza zmienność (mieszczące się w granicach współczynnika zmienności) dla rozdziałów preparatu κ470AD inkubowanego, bądź nie z wyszczególnionymi powyżej związkami tiolowymi. Aby podkreślić wpływ związków tiolowych na powstanie drabiny FLC wykonano eksperyment z użyciem cysteaminy. W tym przypadku drabina uległa znacznym przekształceniom. Gęstość optyczna frakcji 1-4 znacznie się zmniejszyła, chociaż lokalizacja na żelu prążków tworzących te frakcje pozostała niezmienną. Pojawiła się natomiast nowa frakcja białkowa, zlokalizowana najbliżej elektrody ujemnej (nazwana dla potrzeb pracy frakcją 0) charakteryzująca się największą gęstością optyczną (procentowa zawartość białka we frakcji 0 = 54.33%). Spośród używanych w eksperymencie związków tiolowych cysteamina jest więc najbardziej reaktywna w reakcji substytucji związków tiolowych w preparacie łańcuchów lekkich κ470AD. Na ryc. 35 porównano procentową zawartość białka w każdej z 4 frakcji białkowych tworzących drabinę łańcuchów κ470AD. Aby zwrócić uwagę na różnice w budowie, a co za tym idzie różnice we wpływie, jaki poszczególne związki tiolowe wywierają na ładunek form cząsteczkowych FLC, do których są inkorporowane, u góry ryciny umieszczono ich wzory półstrukturalne.

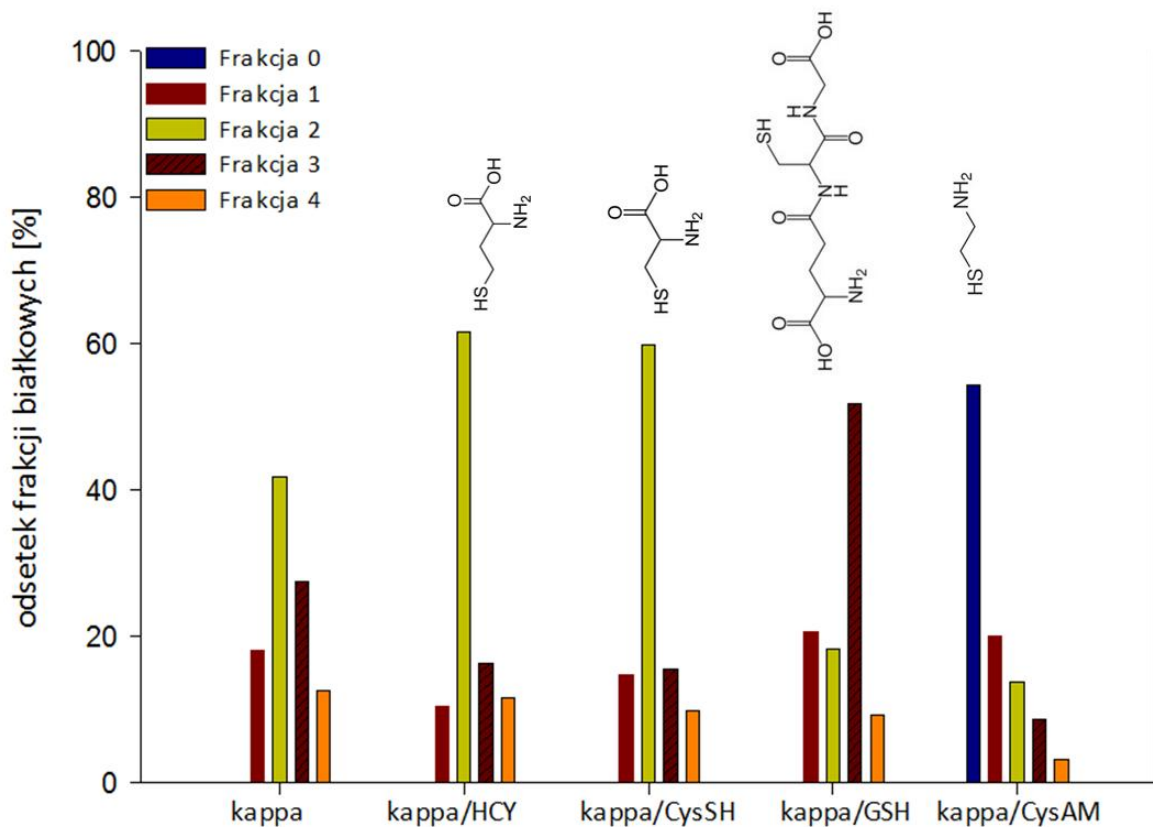
Podsumowując, można stwierdzić, że FLC podlegają substytucji związku tiolowego (FLC-SS-H + RSH → FLC-SS-R1 + XSH). Proces ten ma wpływ na zjawisko drabin łańcuchów lekkich obserwowany w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej.



Ryc. 34 Rycina obrazująca wpływ związków tiolowych na rozkład frakcji białkowych łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazujących zjawisko drabin. Łańcuchy lekkie κ_{470AD} o stężeniu 10g/l przed elektroforezą były inkubowane (25°C, 12h) z roztworami związków tiolowych (końcowe stężenie 1 mM): 1 – natywne κ_{470AD} ; 2 - κ_{470AD} inkubowane z roztworem homocysteiny (HCY); 3 - κ_{470AD} inkubowane z roztworem glutationu (GSH); 4 - κ_{470AD} inkubowane z roztworem cysteiny (CysSH); 5 - κ_{470AD} inkubowane z roztworem cysteaminy. Zwraca uwagę pojawienie się dodatkowej frakcji na ścieżce 5 (inkubacja z cysteaminą)
(elektroforeza wysokorozdzielcza na firmy Ciba Corning Diagnostics)

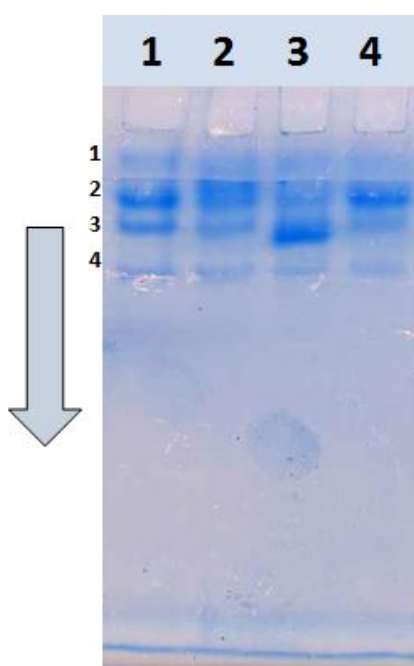
Tabela 11 Procentowy rozkład poszczególnych frakcji białkowych łańcuchów lekkich immunoglobulin κ_{470AD} , tworzących obraz drabin (HRE, *Ciba Corning Diagnostics*). W tabeli przedstawiono zmiany wartości procentowej poszczególnych frakcji białkowych po inkubacji ze związkami tiolowymi. Zwracają uwagę najbardziej znamienne przesunięcia w wartościach procentowych frakcji 2 oraz 3, a także pojawienie się nowej frakcji białkowej w eksperymencie z udziałem cysteaminy.

| Frakcja | Wartość [%] | | | | |
|-----------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| | $\kappa_{470 AD}$ | $\kappa_{470 AD/HCY}$ | $\kappa_{470 AD/GSH}$ | $\kappa_{470 AD/Cys}$ | $\kappa_{470 AD/CysAM}$ |
| Frakcja 0 | - | - | - | - | 54.33 |
| Frakcja 1 | 18.18 | 10.41 | 20.69 | 14.86 | 20 |
| Frakcja 2 | 41.82 | 61.54 | 18.24 | 59.84 | 13.70 |
| Frakcja 3 | 27.46 | 16.38 | 51.83 | 15.5 | 8.78 |
| Frakcja 4 | 12.54 | 11.68 | 9.23 | 9.8 | 3.18 |



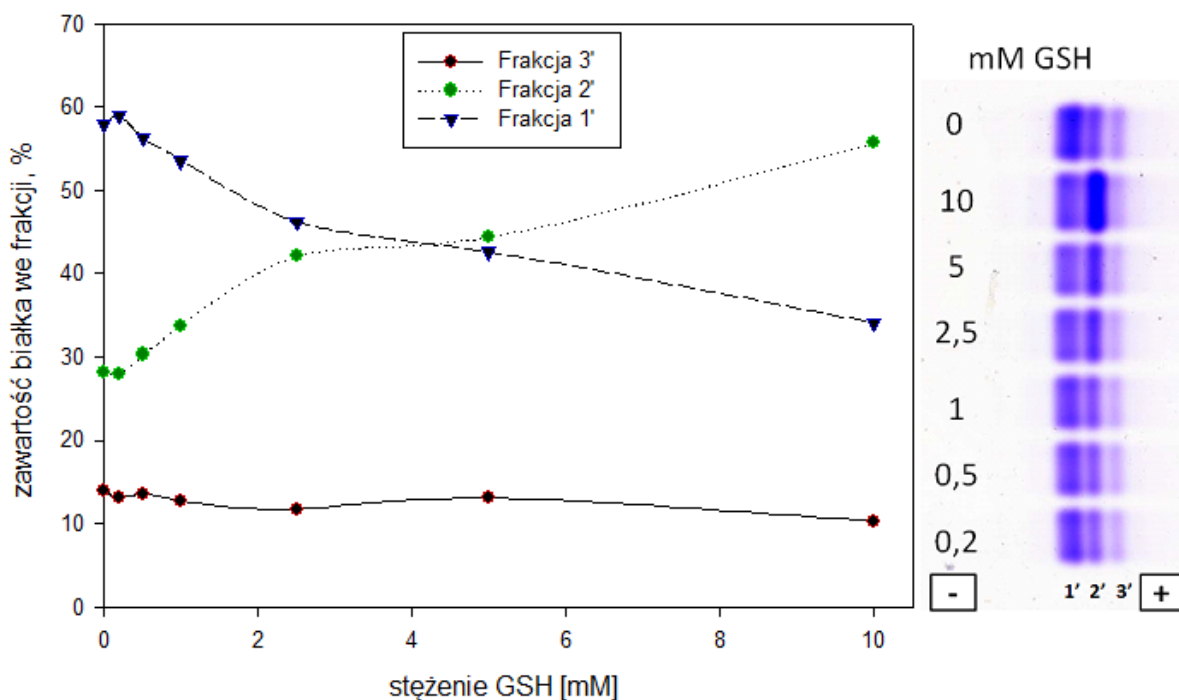
Ryc. 35 Wykres przedstawiający procentową zawartość białka w każdym z 4/5 prążków (frakcji) powstałych po rozdziale w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej (HRE) FLC κ_{470AD} (10g/l) natywnych oraz FLC κ_{470AD} (10g/l) po inkubacji (25°C, 12h) z roztworami (1mM) następujących związków tiolowych: homocysteina (HCY), cysteina (CysSH), glutation (GSH) oraz cysteamina (CysAM). Rycina podkreśla podobne profile odsetkowych zawartości frakcji białkowych dla łańcuchów κ_{470AD} inkubowanych z homocysteiną i cysteiną oraz najbardziej odmienny profil powstały po inkubacji FLC κ_{470AD} z glutationem oraz cysteaminą. Na górze ryciny przedstawiono wzory strukturalne odpowiednich związków tiolowych.

W systemie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym bez dodatku detergentu w warunkach niedenaturujących łańcuchy κ 470AD również migrują jako 4 frakcje. Pod wpływem inkubacji preparatu ze związkami tiolowymi (cysteina, homocysteina oraz glutation) można zauważyć zmiany procentowej zawartości białka w poszczególnych frakcjach. Kierunek zmian odpowiada obserwowanemu w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej (ryc. 36). W obu systemach elektroforetycznych kluczowym dla rozdziału białek jest ich ładunek elektryczny, stąd wyniki potwierdzają obserwację o istnieniu kilku form cząsteczkowych FLC κ 470AD w warunkach prowadzenia eksperymentu (pH 7.4 oraz pH 8.3), które różnią się ładunkiem elektrycznym oraz wzmacnia tezę o udziale związków tiolowych tworzących drabinę łańcuchów lekkich



Ryc. 36 Rozdział elektroforetyczny łańcuchów lekkich κ 470AD w systemie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym bez dodatku detergentu. 1 - natywne FLC κ 470AD; 2 - FLC κ 470AD + HCY; 3 - FLC κ 470AD + GSH; 4 - FLC κ 470AD + CysSH. Także w tym systemie elektroforetycznym łańcuchy κ 470AD rozdzielają się na 4 frakcje białkowe, których procentowa zawartość białka zmienia się pod wpływem działania związków tiolowych. Strzałką zaznaczono kierunek migracji białek.

Aby zobrazować wpływ stężenia związku tiolowego na proces przekształcania poszczególnych frakcji białkowych drabiny FLC, przeprowadzono eksperyment, w którym łańcuchy lekkie κ 470AD inkubowano ze wzrastającym stężeniem glutationu. Dla celów tego doświadczenia wybrano glutation, ze względu na najbardziej zauważalne przesunięcia w wartościach procentowych frakcji 2 i 3. Preparat κ 470AD (10g/l) był inkubowany z 0.2; 0.5; 1; 2.5; 5; 10 mM roztworami glutationu, a następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (HRE, Sebia). W systemie HRE firmy Sebia rozdział elektroforetyczny prowadzony był w buforze o pH 8.3, a więc bardziej alkalicznym w stosunku do buforu systemu firmy Corning (pH 7.4) stosowanego w poprzednich eksperymentach. Zmiana środowiska rozdziału spowodowała zmianę wzoru migracji prążków w drabinie łańcuchów κ 470AD. Frakcje 1 oraz 2 (Corning) w systemie Sebia migrują jako jedna frakcja 1', stąd zmiana nazewnictwa kolejnych frakcji białkowych: 3 (Corning) \rightarrow 2' (Sebia); 4 (Corning) \rightarrow 3' (Sebia). Wynik doświadczenia został zaprezentowany na ryc. 37. Na wykresie przedstawiającym zmiany procentowej zawartości białka dla poszczególnych frakcji od stężenia glutationu można zauważyć najbardziej znamienne przesunięcia dla frakcji 1' oraz 2'. Linie przedstawiające zależność odsetka frakcji 1' i 2' od wzrastającego stężenia glutationu stanowią swoje odbicia lustrzane. Wraz ze wzrastającym stężeniem glutationu wzrasta odsetek frakcji 2', a maleje odsetek frakcji 1'. Dla stężenia glutationu 5mM frakcje 1' oraz 2' osiągają zbliżone wartości procentowe. Dla wartości stężeń glutationu powyżej 5mM gęstość optyczna frakcji 2' jest większa od gęstości optycznej frakcji 1', co stanowi odwrócenie kolejności procentowej zawartości białka we frakcjach tworzących drabinę κ 470AD dla łańcuchów natywnych. Wzrost stężenia glutationu nie wpływa natomiast na zmianę procentowej zawartości białka dla frakcji 3' (12.64 +/- 1.24%).



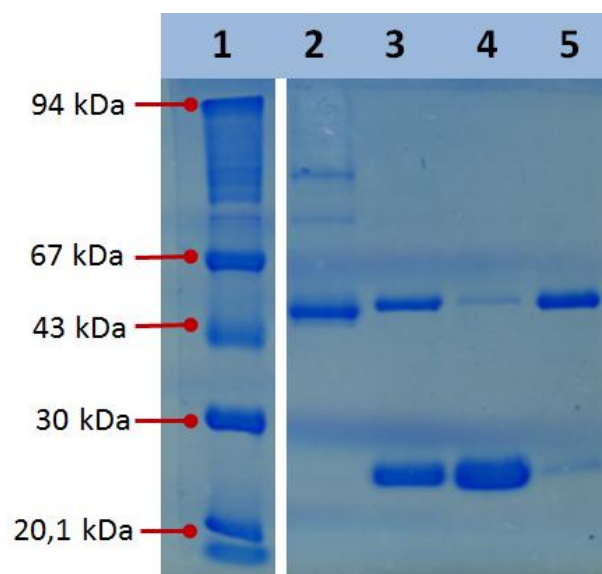
Ryc. 37 Wykres przedstawiający zależność odsetka frakcji 1'-3' powstałych w wyniku rozdziału FLC κ_{470AD} w systemie HRE firmy *Sebia* od stężenia glutationu. Łańcuchy lekkie κ_{470AD} o stężeniu 10 g/l inkubowano (25°C, 12h) z 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 mM roztworem glutationu, a następnie wykonano rozdzielanie elektroforetyczne. Na wykresie widoczne są niewielkie zmiany w procentowej zawartości białka dla frakcji 3' (12,64 +/- 1,24%) oraz znaczące zmiany w procentowej zawartości białka dla frakcji 1' (49,89 +/- 9,26%) oraz 2' (37,47 +/- 10,33%). Wraz ze wzrastającym stężeniem glutationu wzrasta odsetek frakcji 2', a maleje odsetek frakcji 1' (linie przedstawiające zależność odsetka frakcji 1' i 2' od wzrastającego stężenia glutationu stanowią swoje odbicia lustrzane). Z prawej strony wykresu znajduje się obraz rozdzielców FLC κ_{470AD} inkubowanych z odpowiednim stężeniem glutationu. Na rycinie zaznaczono katodę (-) oraz anodę (+). W systemie firmy *Sebia* łańcuchy lekkie κ_{470AD} rozdzielają się na 3 frakcje. Widoczne w systemie *Ciba Corning Diagnostics* frakcje 1 i 2 tutaj migrują jako jedna frakcja nazwana frakcją 1'.

Jednym z kluczowych eksperymentów mających na celu wyjaśnienie zjawiska drabin FLC było uzyskanie frakcji dimeru oraz monomeru κ_{470AD} przy pomocy preparatywnego rozdzielania w systemie wysokosprawnej chromatografii wykluczenia (ryc. 10). Wykonując rozdzielanie uzyskanych frakcji w systemie elektroforezy SDS-PAGE potwierdzono czystość preparatów (rozdzielenie monomeru i dimeru). W rozdzielaniu elektroforetycznym SDS-PAGE frakcja dimeru z preparatywnej chromatografii lokalizowała się w obszarze odpowiadającej białku o MW wynoszącej 48,2 kDa, a frakcja monomerowa w obszarze odpowiadającej białku o MW wynoszącej 22,7 kDa (ryc. 39). Jest to spójne z empirycznie zbadanym we wcześniejszym doświadczeniu zakresem mas cząsteczkowych dimeru oraz monomeru FLC. W kolejnym etapie został wykonany rozdzielanie elektroforetyczne formy dimerycznej oraz monomerycznej FLC w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej. Aby poprawić

rozdzielczość frakcji 1', wydłużono czas wykonania elektroforezy (w stosunku do propozycji producenta; $t=26$ min. vs 18 min.). Stosując tak zmodyfikowaną procedurę na powrót uzyskano obraz 4 dobrze odgraniczonych prążków tworzących drabinę łańcuchów $\kappa 470AD$. W tej części pracy udało się zidentyfikować formę dimeryczną oraz formę monomeryczną w obrazie drabin. Ryc. 38 przedstawia rozdział elektroforetyczny frakcji dimerycznej (ścieżka 2) oraz monomerycznej (ścieżka 3) łańcuchów $\kappa 470AD$ wykonany w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej wobec łańcuchów nie poddanych preparatywnemu rozdziałowi (ścieżka 1). Frakcja 1 drabiny okazała się być frakcją dimeryczną FLC. Jak widać forma dimeryczna łańcuchów $\kappa 470AD$ daje obraz jednorodnego prążka w systemie HRE, można więc stwierdzić, że jest formą jednorodną pod względem ładunku elektrycznego. Forma monomeryczna łańcuchów $\kappa 470AD$ natomiast rozdziela się na 3 dobrze odgraniczone prążki, które w systemie HRE (Ciba Corning) stanowią frakcję 2, 3 i 4 drabiny. Za powstawanie drabiny FLC odpowiada przede wszystkim forma monomeryczna, na którą składa się kilka form cząsteczkowych FLC. Istnienie różnych form cząsteczkowych monomeru FLC $\kappa 470AD$ można wytłumaczyć faktem przyłączenia się różnych związków tiolowych do grupy sulfhydrylowej cysteiny zlokalizowanej w pozycji 214 łańcucha polipeptydowego FLC. Fakt istnienia silnej korelacji pomiędzy całkowitym stężeniem reszt tiolowych oznaczonych w preparatach FLC, a odsetkiem formy monomerycznej w danej cząsteczce FLC (ryc. 28), wzmacnia słuszność tej hipotezy. W przypadku używanego w doświadczeniach preparatu łańcuchów $\kappa 470AD$ za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej udało się zidentyfikować związane z cząsteczką FLC związki tiolowe takie jak cysteina i cysteinyloglicyna. Można przypuszczać, że przyłączenie cysteiny oraz cysteinyloglicyny do cząsteczki monomeru FLC $\kappa 470AD$ spowodowało wyodrębnienie się w elektroforezie HRE frakcji 2 oraz 3 składających się na drabinę. Forma dimeryczna FLC powstaje na skutek utworzenia wiązania disiarczkowego utworzonego pomiędzy grupami sulfhydrylowymi cysteiny 214 dwóch cząsteczek monomeru. Brak możliwości przyłączenia wolnej grupy tiolowej do formy dimerycznej skutkuje jednorodnością prążka w obrazie HRE. Pozostaje jeszcze pytanie o genezę istnienia frakcji 4 w obrazie drabin. Być może jest to forma cząsteczkowa monomeru FLC, do której na skutek modyfikacji posttranslacyjnej została przyłączony inny związek niż cząsteczka tiolu. Związki tiolowe zostały wykryte także w preparatach, które w elektroforezie wysokorozdzielczej migrują jako pojedynczy prążek. Stąd wniosek, iż u podłoża zjawiska drabin leży jeszcze dodatkowy mechanizm, być może związany ze strukturą pierwszorzędową łańcuchów.



Ryc. 38 Rozdział elektroforetyczny łańcuchów lekkich κ_{470AD} w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej (HRE) firmy *Sebia*. W celu lepszego rozdziału frakcji 1 w tym systemie, oryginalną procedurę zmodyfikowano wydłużając czas rozdziału. Na ścieżki 2-3 żelu zaaplikowano materiał otrzymany w wyniku preparatywnego rozdziału dimeru oraz monomeru łańcuchów lekkich κ_{470AD} , tworzących drabinę. 1 - łańcuchy lekkie κ_{470AD} nie poddane preparatywnemu rozdziałowi (forma dimeryczna oraz monomeryczna FLC); 2 - forma dimeryczna FLC κ_{470AD} ; 3 - forma monomeryczna FLC κ_{470AD} . Jak widać na rycinie, za powstawanie drabiny odpowiedzialna jest przede wszystkim forma monomeryczna.

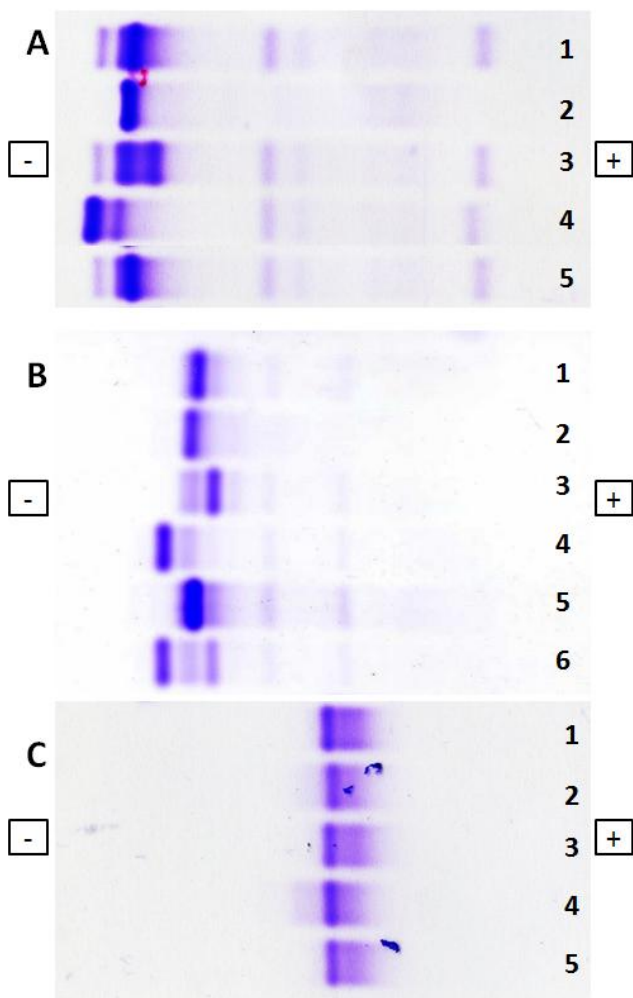


Ryc. 39 Rozdział elektroforetyczny wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w systemie elektroforezy SDS_PAGE z użyciem buforu Tris-glicyna pH 8.3 w warunkach nieredukujących na 12.5% żelu poliakrylamidowym. 1-standard mas cząsteczkowych (*Sigma Marker, low range*); 2- FLC λ_{70292} (1g/L); 3- FLC κ_{470AD} (1g/L); 4 - frakcja monomeru łańcuchów κ_{470AD} ; 5 - frakcja dimeru łańcuchów κ_{470AD} . Materiał zaaplikowany na ścieżki 4 oraz 5 otrzymano w wyniku preparatywnego rozdziału łańcuchów κ_{470AD} w izokratycznym systemie chromatografii wykluczenia (HPLC SE).

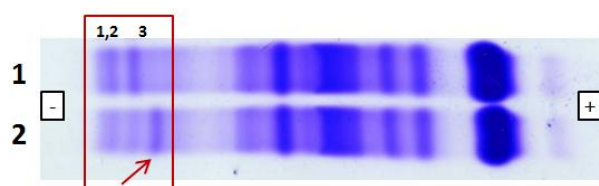
Ostatnim etapem cyklu doświadczeń związanych ze zjawiskiem drabin FLC było porównanie wyników doświadczeń prowadzonych z udziałem łańcuchów κ470AD z wybranymi innymi preparatami wolnych łańcuchów lekkich. Ryc. 40 przedstawia przykładowe rozdziały elektroforetyczne w systemie HRE łańcuchów lekkich z moczu wybranych pacjentów z gammopatią monoklonalną. Wybrano materiał zawierający łańcuchy lekkie typu kappa tworzące obraz drabin FLC (A) oraz migrujące w postaci jednorodnego prążka (B), a także łańcuchy lekkie typu lambda nietworzące drabiny (C). Wyniki eksperymentu są spójne z poprzednimi. Pod wpływem związku o charakterze reduktora (TCEP) obraz drabin ulega przekształceniu do pojedynczej frakcji białkowej (ryc. 40-A, ścieżka 1). Inkubacja z różnymi związkami tiolowymi zmienia lokalizację poszczególnych prążków tworzących obraz drabin na żelu. Inkorporacja glutationu do cząsteczki FLC powoduje powstanie frakcji zlokalizowanej najbliżej elektrody dodatniej, frakcja białkowa związana z cysteaminą lokalizuje się zaś najbliżej elektrody ujemnej. Inkorporacja cysteiny natomiast w tym przypadku nie wywiera zauważalnego wpływu na lokalizację oraz intensywność frakcji białkowych drabiny. Interesujący jest fakt, iż w przypadku, gdy łańcuchy lekkie natywne na żelu HR nie migrowały w postaci kilku prążków, inkubacja z pojedynczym związkiem tiolowym wywoływała zmianę położenia (glutation, cysteamina) lub nie wpływała na lokalizację (cysteina) prążka na żelu. Natomiast inkubacja z mieszaniną związków tiolowych powodowała powstanie drabiny, przy czym frakcją o największej intensywności była frakcja związana ze związkiem tiolowym o najwyższym pK_a grupy sulfhydrylowej (cysteamina, ryc. 40-B, ścieżka 6). Jednak próby wywołanie zmiany lokalizacji prążka FLC lub drabiny FLC były nieskuteczne w przypadku łańcuchów lekkich lambda nietworzących obraz drabin. Warto nadmienić, że wybrane do eksperymentu łańcuchy lekkie typu kappa charakteryzowały się niskim odsetkiem dimeru (<50%), natomiast odsetek dimeru dla łańcuchów lekkich typu lambda wynosił 100%. Próbę zmiany profilu procentowej zawartości białka w poszczególnych frakcjach drabiny lub zmianę lokalizacji frakcji białkowych drabiny wykonano również na próbce surowicy (ryc. 41). W tym przypadku inkubacja z glutationem spowodowała zmniejszenie intensywności 3 frakcji białkowej drabiny natywnej oraz pojawienie się najbardziej intensywnej frakcji białkowej zlokalizowanej najbliżej elektrody dodatniej.

Wśród badanych materiałów odkryto również występowanie zjawiska drabin łańcuchów lekkich w rozdziałach białek surowicy (ryc. 31-4 oraz ryc. 41). Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin nie są często wykrywane w surowicy. Wysoki klirens FLC powoduje, że zwykle ich stężenia we krwi są niższe od stężeń w moczu. Zróżnicowana ruchliwość elektroforetyczna natomiast sprawia, że w rozdziałach elektroforetycznych obecność łańcuchów lekkich immunoglobulin może być maskowana przez inne białka obecne w surowicy w wyższym stężeniu i lokalizujące się w podobnym obszarze na żelu elektroforetycznym. Podczas badań nad niniejszą pracą w dwóch przypadkach udało się zaobserwować zjawiska drabin w surowicy pacjentów. Rozdział elektroforetyczny białek surowicy pacjentów z gammopatią monoklonalną należących do grupy badanej nie był

włączony w planowane eksperymenty, stąd dostępność materiału była ograniczona. Jednak fakt istnienia zjawiska drabin także w surowicy stoi w opozycji do teorii, że zjawisko drabin jest artefaktem związanym z wpływem matrycy, jaką jest moczu (pH oraz siła jonowa moczu).

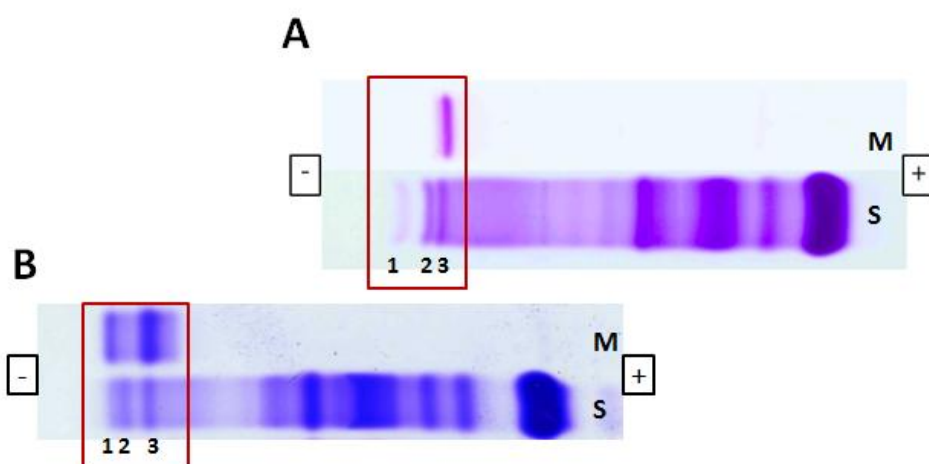


Ryc. 40 Obraz rozdziałów elektroforetycznych w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej moczu pacjentów z gammadopatią monoklonalną oraz białkomoczem Bence-Jonesa. Łańcuchy lekkie (5mg/ml) przed aplikacją na żel inkubowano (25°C, 12h) z odpowiednimi reagentami: 1 – natywne FLC; 2 – FLC poddane redukcji za pomocą TCEP (25 mM); 3 – FLC inkubowane z roztworem glutationu (1mM); 4 – FLC inkubowane z roztworem cysteaminy (1mM); 5 – FLC inkubowane z roztworem cysteiny (1mM); 6 – FLC inkubowane z mieszaniną glutationu oraz cysteaminy (0,5 mM). Materiał A – FLC typu kappa tworzące obraz drabin; B - FLC typu kappa nie tworzące obrazu drabin; C - FLC typu lambda. W przypadku łańcuchów lekkich kappa pod wpływem działania związków tiolowych udało się wywołać zmiany w ruchliwości elektroforetycznej frakcji białkowych lub uzyskać obraz drabin. Nie zaobserwowano takiego efektu dla łańcuchów lekkich typu lambda.



Ryc. 41 Obraz rozdziałów elektroforetycznych w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej surowicy pacjenta z chorobą łańcuchów lekkich. Czerwoną ramką zaznaczono obszar migracji FLC – widoczny charakterystyczny obraz drabin (3 prążki). Ścieżka 1 – surowica pacjenta; ścieżka 2 – przed aplikacją na żel surowica była inkubowana z glutationem (1,7 mM). Widoczna zmiana ruchliwości frakcji białkowych – można zauważyć pojawienie się dodatkowej frakcji położonej najbliżej elektrody dodatniej.

Łańcuchy lekkie, które w surowicy tworzą obraz drabin, nie zawsze tworzą obraz drabin w moczu. Na ryc. 42 przedstawiono wyniki rozdziału elektroforetycznego surowicy oraz moczu dwóch pacjentów. W jednym przypadku, pomimo obecności w surowicy drabiny, nie zaobserwowano tego zjawiska w rozdziale moczu. W drugim przypadku natomiast obraz drabin można było zauważyć zarówno w rozdziale surowicy jak i moczu. Chociaż w obu przypadkach na drabinę FLC składają się 3 frakcje białkowe, ruchliwość elektroforetyczna oraz intensywność poszczególnych prążków tworzących zjawisko drabin były różne dla rozdziału surowicy oraz moczu. Sugeruje to wpływ samego procesu wydalania FLC z surowicy do moczu na powstanie zjawiska drabin.



Ryc. 42 Obraz rozdziałów elektroforetycznych w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej surowicy (S) oraz moczu (M) pacjentów z chorobą łańcuchów lekkich, u których można zaobserwować zjawisko drabin. Czerwoną ramką zaznaczono obszar migracji FLC. Rycina A – obraz drabin jest widoczny w surowicy pacjenta, w moczu FLC migrują jako pojedynczy prążek; rycina B - obraz drabin można zauważyć zarówno w surowicy jak i w moczu, chociaż ruchliwość elektroforetyczna oraz intensywność poszczególnych frakcji białkowych tworzących obraz drabin w surowicy oraz moczu jest odmienna.

Podsumowując, za występowanie zjawiska drabin monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin odpowiada heterogenna tiolacja cysteiny 214 monomeru łańcucha. Poszczególne frakcje składowe drabiny można wzajemnie przekształcać stosując reduktory lub drobnocząsteczkowe związki tiolowe.

5 Dyskusja

Postęp badań nad łańcuchami lekkimi koncentruje się na problemie ich użyteczności w wykrywaniu, prognozowaniu i monitorowaniu leczenia dyskrazji plazmocytowych. Trzeba jednak pamiętać, że wolne łańcuchy lekkie nie są obojętnym dla organizmu markerem diagnostycznym. Ich obecność i specyficzne własności biologiczne i fizykochemiczne mogą być przyczyną rozwoju powikłań w przebiegu chorób z grupy gammapatii monoklonalnych. Powikłania te często stanowią główną manifestację choroby i mogą prowadzić do śmierci pacjenta. Podstawowym mechanizmem patogenności FLC jest zdolność do tworzenia depozytów białkowych o różnorodnej strukturze. Uważa się, że niektóre formy FLC są także cytotoksyczne.

Pewną trudność w praktyce klinicznej stanowi brak narzędzi diagnostycznych, którymi można by u konkretnego pacjenta ocenić ryzyko powstawania depozytów białkowych. Z doświadczeń własnych oraz dyskusji z lekarzami wynika, że istnieje pewna grupa chorych z gammapatią monoklonalną, którzy pomimo wydalania przez wiele lat kilkunastu gramów wolnych łańcuchów lekkich na dobę, nie mają objawów uszkodzenia nerek i innych narządów. Spotykani są jednak także inni chorzy - wydalający z moczem kilkadziesiąt/kilkaset miligramów wolnych łańcuchów lekkich na dobę i umierający w ciągu zaledwie kilku miesięcy w wyniku uszkodzenia narządów (serca, nerek) przez depozyty białkowe. Informacje na temat tropizmu narządowego i toksyczności wolnych łańcuchów lekkich są niekompletne, a badania dotyczyły zwykle pojedynczych chorych. Toksyczność FLC zależy od typu łańcucha (kappa, lambda), od budowy części zmiennej i stałej, a także zdolności do tworzenia oligomerów i agregatów z innymi białkami. Wykazano, że u różnych chorych toksyczność łańcuchów lekkich jest bardzo zróżnicowana. Wydaje się, że to właśnie struktura łańcuchów lekkich odgrywa kluczową rolę w toksyczności białka. Kiedy łańcuchy lekkie pochodzące od indywidualnych pacjentów podawano myszom, zwierzęta rozwijały tę samą formę uszkodzenia nerek (nefropatia wałeczkowa, choroba depozytów łańcuchów lekkich) co chorzy, choć nie u wszystkich zwierząt obserwowano zmiany chorobowe [^{100,101}]. Nie ma obecnie testu, który odpowiedziałby na pytanie, czy u chorego, u którego stwierdza się obecność monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich, dojdzie do powstania depozytów białkowych i jaki będzie ich charakter oraz lokalizacja narządowa. Wszelkie testy diagnostyczne pozwalające na wykrycie chorób związanych z odkładaniem się agregatów białkowych mają swoje zastosowanie do tkanek już zajętych przez proces chorobowy. Nierzadko do zdiagnozowania choroby dochodzi dopiero *post mortem*. Mimo że temat powstawania depozytów białkowych jest ważny z klinicznego punktu widzenia, badania podstawowe opisujące własności fizykochemiczne tej grupy białek są stosunkowo nieliczne. Większość podstawowych prac dotyczących molekularnych form FLC powstała w latach 70-tych i 80 - tych XX wieku.

5.1 Monomery i kowalencyjne dimery wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin.

W publikacjach naukowych pojawia się informacja, że FLC występują w formie monomeru, kowalencyjnego dimeru, niekowalencyjnie zasocjowanego dimeru, oraz tetrameru [^{102,103}]. Dimery łańcuchów lekkich immunoglobulin są utworzone z dwóch identycznych cząsteczek monomerycznych łańcuchów typu kappa lub lambda. Tworzenie dimerycznej formy łańcuchów lekkich odbywa się poprzez utworzenie wiązania disiarczkowego (kowalencyjne dimery) oraz poprzez dwa typy oddziaływań niekowalencyjnych: mostki wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe. Niekowalencyjna dimeryzacja łańcuchów lekkich kappa lub lambda jest związana z obecnością określonych reszt aminokwasowych, głównie w regionie zrębowym części zmiennej. Konserwatywne reszty tyrozyny w pozycji 36, glutaminy w pozycji 38 oraz tyrozyny w pozycji 87, biorą udział w formowaniu międzycząsteczkowego mostka wodorowego. Leucyna w pozycji 46 oraz fenyloalanina 98 umożliwiają dimeryzację łańcuchów lekkich immunoglobulin poprzez oddziaływania hydrofobowe. Sekwencja aminokwasowa regionów CDR również wpływa na proces dimeryzacji FLC [¹⁰⁴]. Analizując 17 cząsteczek łańcuchów lekkich podtypu kappa1 obliczono ich stałe dimeryzacji (K_D). Znaczne różnice (> 100-krotne) w wartościach K_D wykazały istotny wpływ aminokwasów tworzących regiony hiperzmiennie na tendencję FLC do tworzenia dimerów. Porównując wartości K_D łańcuchów typu kappa oraz lambda zauważono, że łańcuchy lekkie typu lambda charakteryzują wyższe wartości K_D [³⁸]. Jednak różnice strukturalne odpowiedzialne za odmienności we wzajemnych interakcjach monomerów konkretnych cząsteczek łańcuchów lekkich nie są jeszcze do końca poznane.

Łańcuchom lekkim typu kappa zwykle przypisywane jest występowanie w formie monomeru oraz dimeru połączonego wiązaniem niekowalencyjnym. Dimer utworzony z dwóch monomerycznych, połączonych kowalencyjnym wiązaniem form FLC, miałby być natomiast formą charakterystyczną dla łańcuchów lekkich typu lambda. W pracy Berggård i wsp. wspomnianą tezę wzmocniono przez analizę trzeciorzędowej struktury cząsteczek oraz sekwencji aminokwasowej monomerów i dimerów FLC. Sekwencję aminokwasową monomerów oraz niekowalencyjnych dimerów charakteryzowała wysoka homologia. W badaniach z przeciwciałami anty- κ potwierdzono, że obie te formy należą do typu kappa łańcuchów lekkich. FLC występujące w formie kowalencyjnego dimeru charakteryzowały się nieco odmienną sekwencją aminokwasową i reagowały z przeciwciałami anty- λ [¹⁰²]. Przedstawione dane tylko częściowo zgodne są z wynikami niniejszej pracy. Forma monomeryczna w przeprowadzonych eksperymentach dominowała w grupie z łańcuchami lekkimi kappa. Analizując częstość występowania kowalencyjnych dimerów metodą SDS elektroforezy, w grupie łańcuchów lekkich typu kappa wykazano, że w 73% (68/93) formą dominującą była forma monomeryczna, której w 63% (43/68) towarzyszył słabszy prążek pochodzący od formy dimerycznej. W rozdzielach elektroforetycznych SDS-PAGE z użyciem buforu Tris-glicyna o pH 8.3 cząsteczki białek połączone poprzez oddziaływania

niekowalencyjne ulegają dysocjacji. Dlatego można stwierdzić, iż widoczne na żelach poliakrylamidowych prążki lokalizujące się w obszarze dimeru FLC są utworzone z monomerów spiętych wiązaniem kowalencyjnym. Potwierdzają to wyniki eksperymentów z użyciem związków o charakterze reduktorów (DTT, TCEP), które rozcinają wiązanie disiarczkowe utworzone przez C-terminalne reszty cysteinyłowe. W wyniku działania reduktorów forma dimeryczna łańcuchów kappa ulegała przekształceniu do formy monomerycznej (wyniki własne, nieprzedstawione).

Obecność niekowalencyjnych dimerów w preparatach z łańcuchami lekkimi typu kappa badano za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii wykluczenia. Warunki rozdziału (środowisko izotonicznego buforu fosforanowego o fizjologicznym pH) nie zaburzały oddziaływań niekowalencyjnych między cząsteczkami białek, stąd możliwość wykrycia niekowalencyjnych form łańcuchów lekkich w rozdzielanych preparatach. Do analizy wybrano preparaty, w których łańcuchy lekkie kappa w systemie elektroforezy SDS-PAGE migrowały jako pojedynczy prążek lokujący się w obszarze monomeru FLC. W rozdzielach chromatograficznych nie odnotowano występowania dodatkowych pików dimerów FLC (wyniki własne, nieprzedstawione). Można stwierdzić, że dominującą formą łańcuchów lekkich kappa jest monomer, któremu może towarzyszyć kowalencyjny dimer. Wyniki te są odmienne od obserwacji otrzymanych przez Berggård i Petersona [102]. Autorzy ci stwierdzili występowanie łańcuchów kappa w formie monomeru i niekowalencyjnego dimeru. W swojej pracy wykorzystywali do badań prawidłowe, odpowiednio zagęszczone mocze zdrowych ochotników oraz mocze od pacjentów z białkomoczem cewkowych w przebiegu choroby Willsona. W niniejszej pracy bazowano na materiale od pacjentów z gammapatią monoklonalną, co może być przyczyną przedstawionych różnic w otrzymanych wynikach. Udowodniono, że stężenie, struktura monomerycznej lub dimerycznej formy wolnych łańcuchów lekkich oraz tendencja do tworzenia dimerów FLC w warunkach patologicznych mogą ulegać zmianom [38].

Obszerna analiza własności fizykochemicznych monoklonalnych FLC pochodzących z moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną została przeprowadzona w pracy Diemerta i wsp. [105]. Analiza profili form molekularnych za pomocą elektroforezy SDS-PAGE wykazała, że w grupie chorych, u których dominującą formą łańcucha lekkiego były dimery, przeważały łańcuchy typu lambda ($\kappa:\lambda=0.71$). Natomiast u chorych, u których dominowały monomery, przeważały łańcuchy lekkie typu kappa ($\kappa:\lambda=1.2$). We wspomnianej pracy, forma cząsteczkowa, w jakiej łańcuchy lekkie występowały u badanych chorych, korelowana była z ich nefrotoksycznością. Wykazano, że uszkodzenie nerek częściej było związane z występowaniem łańcuchów lekkich typu lambda. Dowiedziono również, że w grupie chorych z zaburzeniem funkcji nerek, odsetek dimeru był wyraźnie wyższy. Nasuwa się wobec tego pytanie, czy o nefrotoksyczności łańcuchów lekkich decyduje typ łańcucha (kappa czy lambda), czy też może jest ona związana z występowaniem łańcuchów w formie cząsteczkowej innej niż monomer. Częściej obserwowana nefrotoksyczność łańcuchów lekkich lambda być może jest konsekwencją faktu, że ich podstawową formą cząsteczkową

jest kowalencyjny dimer. Aby potwierdzić przytoczoną tezę, przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczące odsetka dimeru w grupie łańcuchów lekkich lambda oraz kappa należałoby rozszerzyć o dane na temat stanu klinicznego pacjentów. Wyniki dotyczące różnic między łańcuchami kappa oraz lambda w kontekście ich występowania w formie monomeru i/lub dimeru są natomiast spójne z cytowanym piśmiennictwem. W niniejszej pracy przedstawiono po raz pierwszy tak obszerną analizę odsetkowej zawartości dimeru oraz monomeru dla dwóch typów łańcuchów lekkich. Osiągnięciem tej pracy jest również spostrzeżenie, że odsetek dimeru oraz monomeru FLC jest cechą charakterystyczną dla konkretnego chorego i nie zmienia się w czasie. Przeprowadzono analizę zmienności w czasie odsetka dimeru łańcuchów lekkich lambda oraz odsetka monomeru łańcuchów lekkich kappa. Zmienność tą wyrażono w postaci różnicy pojedynczego wyniku i wartości średniej ze wszystkich pomiarów u chorego odpowiedniej formy FLC, podzielonej przez wartość średnią odpowiedniej formy FLC. U konkretnego chorego zmienność odsetka monomeru kappa lub odsetka dimeru lambda była niewielka. 50% względnych różnic odsetka monomeru łańcuchów kappa mieściło się w wąskich granicach: (-0.2%; 2.3%), natomiast 50% względnych różnic odsetka dimeru dla łańcuchów lambda mieściło się w zakresie: (-3.4%; 3.6%). Profile odsetkowe u pacjentów były stabilne w czasie i nie zależały od wartości średniej odsetka dimeru lub monomeru.

Analiza danych z piśmiennictwa oraz wyniki eksperymentów przeprowadzonych w tej pracy, ukazały zależność między profilami odsetkowymi FLC oraz procesem tiolacji końcowej reszty cysteinyłowej 214 za pomocą drobnocząsteczkowych związków tiolowych. Zagadnienie to jest szeroko dyskutowane w kolejnych rozdziałach pracy.

Niezmienny mimo upływu czasu, a co za tym idzie - stanu klinicznego chorych, procentowy stosunek monomeru do dimeru, świadczy o tym, że jest on determinowany na etapie syntezy/wydzielania wolnych łańcuchów. Gdyby formowanie dimeru odbywało się po wydzieleniu łańcuchów na zewnątrz – np. we krwi lub moczu, należałoby oczekiwać większej zmienności w czasie odsetka dimeru lub monomeru FLC. Zmiany stanu klinicznego pacjenta, filtracji kłębuszkowej, a co za tym idzie - stężenia drobnocząsteczkowych związków tiolowych we krwi oraz moczu, są dość częste w grupie chorych z gammopatią monoklonalną. Prawdopodobnie istnieje związek pomiędzy preferowaną formą cząsteczkową FLC (dimer lub monomer) wydzielaną przez komórki plazmatyczne, a wewnątrzkomórkowym statusem tiolowym komórek nowotworowych. Istnieją doniesienia, że metabolizm związków tiolowych (korelująca z nim zmiana ekspresji γ -glutamylotranspeptydazy) może być zaburzony w komórkach nowotworowych i jest bezpośrednio powiązany z opornością na niektóre leki [^{106,107,108,109}].

Dyskutując niewątpliwy związek pomiędzy chorobami nowotworowymi a stresem oksydacyjnym zwraca się uwagę na potrzebę opracowania bardziej selektywnych markerów tego stresu. Markery takie nie powinny być oznaczane we krwi wyznacznikiem ogólnego stresu oksydacyjnego, lecz powinny być miernikiem stresu w wybranej populacji komórkowej [¹¹⁰]. Należy także wyjaśnić rolę stresu oksydacyjnego w procesie tworzenia

poprawnej konformacji wolnych łańcuchów lekkich. To właśnie procesy związane z zaburzeniami w syntezie poprawnie uformowanego białka mogą być jednym z sygnałów do apoptozy komórki. Stanowią także podstawę działania niektórych leków stosowanych w leczeniu szpiczaka mnogiego [111,112]. Wyniki niniejszej pracy wskazują na potrzebę dalszych badań mogących wyjaśnić powiązania między wewnątrzkomórkowym potencjałem oksydacyjnym a wzajemnymi proporcjami dimer/monomer w nowotworowych klonach komórek plazmatycznych. Brak jest do tej pory jakichkolwiek prac poruszających ten temat.

W niniejszej pracy wykazano, że stosunek dimer/monomer może się mieścić w szerokich granicach i że jest dla danego pacjenta niezmienny w czasie. Istnieje potrzeba zbadania wieloparametrowej korelacji pomiędzy procentowym udziałem poszczególnych form cząsteczkowych łańcuchów lekkich, stanem klinicznym pacjenta a wrażliwością nowotworu na działanie wybranych grup leków. W pierwszej kolejności należałoby przeprowadzić analizę stosunku dimer/monomer dla pacjentów, u których złogi amyloidowe tworzone są przez łańcuchy lekkie typu kappa (25% wszystkich przypadków AL amyloidozy). Być może są to przede wszystkim przypadki z wysokim odsetkiem dimeru FLC.

W ostatnim czasie zmodyfikowane zostało spojrzenie na rolę mostków disiarczkowych w strukturze białek. Podkreśla się istnienie dwóch podtypów wiązań S-S. Jedne z nich stanowią wiązania o charakterze strukturalnym, podczas gdy inne stanowią pulę wiązań o charakterze funkcjonalnym [113]. Znany pogląd, że mostki disiarczkowe stabilizują cząsteczki białek został wzbogacony o spostrzeżenie, że wiązania disiarczkowe mają czasem niewielki wkład w stabilizację cząstek. Może się również zdarzyć, że utworzenie wiązania disiarczkowego spowoduje destabilizację cząsteczki białka. W pracy Kaplana i wsp. zauważono, że we krwi pacjentów z amyloidozą AL oraz szpiczakiem mnogim, występują formy dimeryczne łańcuchów lekkich, które utworzone są przez proteolitycznie zmienione fragmenty monomerów FLC. Proteoliza form monomerycznych FLC może doprowadzić do powstawania form dimerycznych spiętych wiązaniem disiarczkowym o nietypowej dla FLC lokalizacji. Autorzy sugerują destabilizujący wpływ takiego mostka disiarczkowego na cząsteczkę dimeru FLC [114]. Mutacje punktowe, które mogą doprowadzić do zmian konformacyjnych w cząsteczkach łańcuchów lekkich są kolejnym znanym czynnikiem prowadzącym do zapoczątkowania procesu tworzenia agregatów z łańcuchów lekkich. Czynnikiem ten może także spowodować zmianę charakteru wiązania disiarczkowego. Stąd pytanie o rolę dimerów kowalencyjnych w patogenezie AL amyloidozy.

Tworzenie wiązań disiarczkowych ma miejsce wewnątrzkomórkowo przy udziale oksydoreduktaz, których aktywność zależy od wewnątrzkomórkowego potencjału redoks. W chorobach należących do grupy gammapatii monoklonalnych markery stresu oksydacyjnego są podwyższone [110]. W warunkach stresu oksydacyjnego równowaga między tworzeniem wiązania S-S a zredukowanymi resztami SH jest zachwiana, co może być przyczyną zwiększonej tendencji FLC do dimeryzacji. Gdy zaburzenie komórkowego potencjału redoks współlistnieje z nieprawidłową degradacją i wewnątrzkomórkową kumulacją nieprawidłowo sfałdowanych białek oraz produktów ich częściowej proteolizy,

utworzenie wiązań disiarczkowych może utrwalić strukturę częściowo sfałdowanego białka oraz umożliwić wydalenie takiego białka na zewnątrz komórek plazmatycznych. U pacjentów z AL amyloidozą zaobserwowano podwyższony poziom kowalencyjnych dimerów FLC w stosunku do grupy chorych na chorobę depozytów białkowych z łańcuchów lekkich [71]. Stąd przypuszczenie, że tworzenie kowalencyjnych dimerów może być jednym z czynników przyczyniających się do powstawania złogów białkowych o uporządkowanej strukturze. Być może tworzenie kowalencyjnego, spiętego wiązaniem disiarczkowym dimeru, w sprzyjających warunkach jest wstępnym etapem tworzenia włókien fibrylarnych.

Analiza sekwencji aminokwasowej łańcuchów lekkich immunoglobulin tworzących złogi białkowe oraz lokalizacji narządowej tych złogów, wykazała istnienie pewnych zależności między podtypem łańcuchów lekkich wywołujących chorobę oraz rodzajem zajętego organu. I tak np. amyloidoza z zajęciem nerek jest często związana z podgrupą V λ VI, podczas gdy w złogach wyizolowanych z serca czy tkanek miękkich zidentyfikowano podgrupę V λ II oraz V λ III [59]. Wiadomo, że forma dimeryczna łańcuchów lekkich może oddziaływać z antygenami. Badania nad krystaliczną strukturą dimerów FLC (badaniami objęto 2 klony FLC typu kappa od pacjentów z AL amyloidozą oraz 1 klon FLC typu kappa od pacjenta z zespołem Fanconiego) wskazują, że siła wiązania monomer FLC - monomer FLC jest podobna do siły wiązania monomeru FLC z monomerem łańcucha ciężkiego (HLC – *ang. heavy light chain*) [115]. Stąd hipoteza, że formy dimeryczne FLC działają jak miniprzeciwciała i odkładają się w narządach posiadających epitopy, z którymi mogą wchodzić w interakcję. Działając jak miniprzeciwciało dimer FLC może wiązać się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i inicjować proces tworzenia włókien amyloidowych. Dodatkowo wykazano, że wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin wyizolowane z moczu chorego ze szpiczakiem mnogim wchodzi w interakcję z limfocytami B. Tego typu interakcja może działać immunosupresyjnie pogarszając stan i rokowanie pacjenta [38]. Cytowane wyniki z piśmiennictwa stanowią kolejny argument przemawiający za hipotezą o znaczeniu procesu dimeryzacji łańcuchów lekkich dla formowania złogów białkowych w tkankach. Badanie procesu dimeryzacji może stać się punktem wyjścia do wyjaśnienia, dlaczego łańcuchy lekkie lambda trzy razy częściej w stosunku do łańcuchów kappa tworzą włókna fibrylarne w populacji chorych z amyloidozą AL [38]. Okazuje się, że jeśli zawęzi się badaną grupę pacjentów ze złogami narządowymi utworzonymi przez FLC do chorych, u których złogi amyloidowe odkładają się w nerkach, przypadki depozytów z łańcuchów lambda są jeszcze częstsze. Stosunek liczby przypadków amyloidozy z łańcuchów lambda do liczby przypadków amyloidozy z łańcuchów lekkich kappa wynosi 12:1. Dimer łańcuchów lekkich, który jest białkiem o masie cząsteczkowej ok. 44 kDa, jest wolniej usuwany z krwi niż monomer (22 kDa). Biorąc pod uwagę powyższe informacje, sformułowano hipotezę, że wolniejsze usuwanie przez nerki form multimerycznych łańcuchów lekkich może prowadzić do ich akumulacji oraz odkładania w tkankach.

Wczesne badania nad znaczeniem dimeryzacji wolnych łańcuchów lekkich wykazały, iż we krwi chorych ze szpiczakiem mnogim obserwuje się wyższy indeks dimer/monomer

w porównaniu do krwi osób zdrowych (poliklonalne FLC). Jak dotąd nie prowadzono badań, w których obok analizy wpływu typu łańcuchów lekkich na czas przeżycia pacjentów i występowanie powikłań w przebiegu gammapatii monoklonalnych, badano by odsetek dimeru FLC jako czynnik prognostyczny. Ogólnie wiadomo, że występowanie łańcuchów lekkich kappa jest lepszym czynnikiem rokowniczym dla pacjentów. W niniejszej pracy zaobserwowano krótszy czas pomiędzy pierwszym i ostatnim pomiarem odsetka dimeru dla FLC lambda w odniesieniu do FLC kappa (mediany wynoszą odpowiednio: 50 vs 525 dni), co jest być może związane z krótszym czasem przeżycia pacjentów z FLC lambda. Zgodnie z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy odsetek dimeru w grupie łańcuchów lekkich kappa mieści się w bardzo szerokich granicach (0–100%). Jak dotąd nie ma przeprowadzonych na szeroką skalę badań, które określałyby czy choroby z grupy gammapatii monoklonalnych przebiegają inaczej wśród pacjentów z niskim odsetkiem dimeru i pacjentów, u których FLC występują przede wszystkim w formie dimerycznej. Merlini i wsp. na niewielkiej grupie pacjentów (n=5) badali przypadki amyloidozy AL związanej z występowaniem łańcuchów lekkich typu kappa [116]. U pacjentów z amyloidozą AL typu kappa wykazano, że wolne łańcuchy lekkie występowały głównie w formie dimerycznej.

Występowaniem wolnych łańcuchów lekkich typu lambda głównie w formie dimeru a łańcuchów lekkich kappa w formie monomeru tłumaczy się różne wartości klirensu nerkowego obu typów łańcuchów, a co za tym idzie odmienne zakresy wartości referencyjnych dla testu FreeLite w surowicy oraz moczu [25].

Odsetek dimeru FLC może mieć również wpływ na wynik ilościowego oznaczenia łańcuchów lekkich metodą nefelometryczną. Zhong i wsp. [117] odnotowali rozbieżności w wynikach ilościowego oznaczania łańcuchów związane z występowaniem FLC w formie dimerycznej. U części pacjentów z formą dimeryczną FLC zaobserwowano zaniżenie wyniku oznaczenia po redukcji z użyciem β -merkaptoetanolu w odniesieniu do wyników z próbki wyjściowej. Autorzy zaistniałe zjawisko tłumaczyli silniejszą reakcją z odczynnikami anti-FLC oraz tworzeniem większych, silniej rozpraszających wiązkę światła, kompleksów antygen-przeciwciała w przypadku formy dimerycznej łańcuchów. Również grupa Merliniego zasugerowała, że produkowane przez firmę Binding Site poliklonalne przeciwciała anti- κ i anti- λ , wykorzystywane w nefelometrycznym oznaczeniu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy oraz moczu, mają większe powinowactwo do dimerycznej formy FLC [116]. Przeciwciała anti- κ oraz anti- λ firmy Binding Site wykorzystano do izolacji FLC z surowicy pacjentów z amyloidozą. Zaobserwowano mniejszą wydajność izolacji w przypadku FLC kappa w stosunku do FLC lambda. Dodatkowo analiza profilu form molekularnych obu typów łańcuchów ujawniła przewagę formy dimerycznej nad monomeryczną dla obu typów FLC. Autorzy pracy zasugerowali, że użyte do izolacji poliklonalne przeciwciała łączyły się przede wszystkim z formą dimeryczną monoklonalnych FLC. Jednak wobec doniesień o znaczeniu procesu dimeryzacji dla tworzenia włókien fibrylarnych, nie można wykluczyć, że przewaga formy dimerycznej nad monomeryczną w przypadku łańcuchów kappa jest następstwem prowadzenia eksperymentu na materiale od pacjentów z AL amyloidozą.

Analiza amyloidogennych łańcuchów lekkich immunoglobulin wykazała obecność mutacji w rejonie tworzącym powierzchnię oddziaływania monomer - monomer. Uważa się, że tego typu mutacje mogą wpływać na oddziaływania między monomerycznymi cząsteczkami łańcuchów lekkich, prowadząc do nieprawidłowego formowania dimerów, a w konsekwencji przyczyniają się do tworzenia złogów amyloidowych [^{118,119}].

Okazuje się, że dimery łańcuchów lekkich również odgrywają pewną rolę w patologii chorób innych niż gammapatie monoklonalne. W płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów ze stwardnieniem rozsianym odnotowano zaburzony stosunek dimeru do monomeru łańcuchów lekkich lambda w odniesieniu do osób z innymi chorobami układu nerwowego [³⁸].

Być może analiza stosunku dimer/monomer FLC stanie się nowym parametrem prognostycznym dla rozwoju amyloidozy oraz dysfunkcji nerek w przebiegu gammapatii monoklonalnych oraz znajdzie zastosowanie w diagnostyce różnicowej chorób przebiegających z wewnątrzoponową syntezą immunoglobulin. Dalsza analiza stosunku dimeru i monomeru łańcuchów lekkich w materiałach innych niż surowica oraz mocz może doprowadzić do powstania nowego parametru diagnostycznego, przydatnego w diagnostyce pacjentów cierpiących na schorzenia inne niż gammapatie monoklonalne.

5.2 Niekowalencyjne, oligomeryczne formy łańcuchów lekkich.

Wczesne badania nad różnymi formami molekularnymi obecnymi w moczu chorych ze szpiczakiem mnogim oraz w moczu osób zdrowych, ujawniły obecność form monomerycznych, dimerycznych oraz wyższych polimerów utworzonych przez łańcuchy lekkie w obu grupach badanych [102]. Również we krwi chorych na szpiczaka mnogiego, obok form dimerycznych wykazano także obecność form tetramerycznych i wyższych polimerów z łańcuchów lekkich powstałych na skutek asocjacji form dimerycznych [120]. Nowsze doniesienia na temat występowania FLC w postaci form o masie cząsteczkowej wyższej niż dimer, sugerują większą nefrotoksyczność oligomerycznych form FLC oraz wpływ obecności polimerów FLC na zmniejszoną skuteczność hemodializy [121]. Upośledzenie czynności nerek jest częstym powikłaniem gammapatii monoklonalnych. W badaniach Leung i wsp. [122] udowodniono, że poprawa funkcji nerek u pacjentów z nefropatią wałeczkową wiąże się ze spadkiem stężenia FLC w surowicy o >50%. Obecność wyższych polimerów FLC może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w przebiegu gammapatii monoklonalnych. Obecność polimerycznych form łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy lub moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną do tej pory była badana u pojedynczych chorych lub na grupach o niewielkich liczebnościach. Dlatego brak jest jednoznacznych danych na temat częstości występowania zjawiska oligomeryzacji FLC.

W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia na temat różnych form występowania polimerów FLC. Najczęściej powstają one na skutek asocjacji dimerów FLC, chociaż znany jest przypadek tetrameru FLC zbudowanego z czterech niekowalencyjnie połączonych monomerów [123]. W jednej z prac powstałych w czołowej placówce zajmującej się leczeniem szpiczaka mnogiego w Stanach Zjednoczonych (Mayo Clinic), opisano przypadek pacjenta, w którego surowicy metodami chromatografii kolumnowej wykazano istnienie homogennej frakcji o masie cząsteczkowej 140 kDa składającej się z łańcuchów lekkich typu lambda [103]. W chromatogramie nie widać było natomiast frakcji, których masy cząsteczkowe (ok. 50 kDa lub ok. 25 kDa) mogłyby sugerować obecność dimeru lub monomeru FLC. Łańcuchy lekkie lambda we krwi badanego pacjenta występowały wyłącznie w postaci homogennego heksameru zbudowanego z połączonych oddziaływaniami niekowalencyjnymi trzech kowalencyjnych dimerów (3x2). Stężenie wolnych łańcuchów lambda było bardzo wysokie. W analizie chromatograficznej pik pochodzący od FLC był bardziej intensywny od piku albuminy. W moczu pacjenta stężenie FLC było niewielkie (rzędu kilkunastu miligramów na dobę), co tłumaczono ograniczoną filtracją kłębuszkową agregatów FLC.

W niniejszej pracy nie badano obecności form molekularnych FLC we krwi. Badanym materiałem były łańcuchy lekkie immunoglobulin wyizolowane z moczu chorych z gammapatią monoklonalną. Badając występowanie wyższych oligomerów FLC posłużono się techniką chromatografii kolumnowej stosując warunki buforowe (pH, siła jonowa) zbliżone do warunków fizjologicznych. W 50% badanej grupy (20/40), dla której możliwe było jednoznaczne rozstrzygnięcie problemu obecności oligomerycznych form FLC, wykryto formy łańcuchów lekkich o masie cząsteczkowej wyższej niż masa dimeru. Frakcje

chromatograficzne pochodzące od form oligomerycznych miały niewielką intensywność i zawsze towarzyszyły dominującym frakcjom dimeru i (lub) monomeru. Nie natrafiono na ani jeden przypadek, w którym udział form oligomerycznych byłby tak wysoki (w odniesieniu do pozostałych pików białkowych obecnych w materiale badanym) jak w pracy Kyle'a i wsp. [103]. Spostrzeżenie to jest spójne z wynikami badań Bergen i wsp. [124], gdzie tetrameryczna forma łańcuchów lekkich lambda z moczu chorego ze szpiczakiem mnogim współistniała z dimerem oraz fragmentem monomeru lambda i stanowiła niewielki odsetek wszystkich form cząsteczkowych FLC wykrytych w materiale. Być może przyczyną rozbieżności między przytoczonymi wynikami jest odmienny materiał biologiczny (surowica/mocz) użyty w eksperymentach. Byłoby to spójne z teorią o ograniczonej filtracji nerkowej form oligomerycznych. Doświadczenie własne z rutynowego laboratorium diagnostycznego wykonującego badania diagnostyczne w podejrzeniu gammapatii monoklonalnej u pacjentów z rejonu Małopolski wskazuje jednak, że bardzo intensywne frakcje białkowe złożone wyłącznie z wolnych łańcuchów lekkich w surowicy obserwuje się rzadko. Wskazuje to na niewielką częstość występowania form oligomerycznych we krwi pacjentów z gammapatią monoklonalną.

W grupie pacjentów, u których wykryto formy łańcuchów lekkich o masach cząsteczkowych większych niż dimer, stosunek łańcuchów lekkich kappa do lambda wynosił 1:1. Informacja ta stoi w opozycji do danych z piśmiennictwa o większej tendencji łańcuchów lekkich lambda do tworzenia form oligomerycznych. W piśmiennictwie można również znaleźć informację o roli dimerów i wyższych form oligomerycznych łańcuchów lekkich w patogenezie chorób związanych z tworzeniem agregatów z łańcuchów lekkich [53,103,118]. Jednak w niniejszej pracy nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy odsetkami kowalencyjnych dimerów FLC w grupach łańcuchów tworzących formy oligomeryczne oraz ni wykazujących tendencji do oligomeryzacji. Nie wykazano także statystycznie istotnych różnic, gdy porównywano odsetki dimeru łańcuchów lekkich kappa lub lambda tworzących formy oligomeryczne oraz nietworzących form oligomerycznych. Można wywnioskować, że stosunek formy dimerycznej do formy monomerycznej łańcuchów lekkich nie wpływa na tworzenie niekowalencyjnych oligomerów, co również jest informacją sprzeczną z danymi piśmiennictwa [124,125]. Należy jednak podkreślić, że badania nad formami oligomerycznymi FLC wyższymi niż dimery dotyczyły niewielkich grup pacjentów. W większości eksperymenty prowadzone były na próbkach materiału pochodzących od pojedynczych chorych. Jest to częściowo uzasadnione faktem, że odpowiedni materiał biologiczny jest trudnodostępny. Zachorowalność na szpiczaka mnogiego w populacji światowej jest rzędu 50 zachorowań/rok/milion. Dlatego wyniki eksperymentów w cytowanych pracach opisują raczej właściwości FLC u indywidualnych chorych. Stąd przeprowadzona w niniejszej pracy analiza obecności form oligomerycznych u pacjentów z gammapatią monoklonalną na grupie 40 osób może stanowić cenne uzupełnienie istniejącej wiedzy na temat oligomerycznych form łańcuchów lekkich obecnych w moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną.

W niniejszej pracy wykazano brak zależności między typem łańcucha lekkiego a tendencją do tworzenia form oligomerycznych. Nie wykryto także zależności pomiędzy odsetkiem dimeru łańcuchów lekkich a tendencją do tworzenia form oligomerycznych, co może sugerować nieprawdziwość tezy o udziale polimerów FLC w patomechanizmie chorób związanych z tworzeniem depozytów białkowych. W ekstraktach z tkanek zajętych procesem chorobowym w przebiegu amyloidozy AL wykazano występowanie łańcuchów lekkich w formie dimerycznej oraz oligomerycznej [38]. Prawdopodobnie oligomery FLC tworzą się bezpośrednio w tkankach, a krążące we krwi lub tworzące się w moczu formy multimeryczne mają niewielkie znaczenie dla odkładania się złogów fibrylarnych. Jednak wciąż obecność form multimerycznych może być niezależnym czynnikiem związanym z większym prawdopodobieństwem uszkodzenia nerek.

Opisując formy cząsteczkowe, które mogą tworzyć łańcuchy lekkie immunoglobulin, należy jeszcze wspomnieć o kowalencyjnych oligomerach. W pracy Bergen i wsp [124] w moczu pacjenta z białkomoczem Bence-Jonesa wykryto obecność tetrameru FLC zbudowanego z dwóch cząsteczek kowalencyjnego dimeru. Redukcja z użyciem DTT przekształcała tetramer w monomer FLC oraz dimer FLC. Można więc wywnioskować, że cząsteczki dimeru tworzące tetramer były połączone wiązaniem kowalencyjnym innym niż wiązanie disiarczkowe. Autorzy nie próbowali wyjaśnić charakteru wiązania. Zauważyli natomiast, że wykryty kowalencyjny tetramer nie tworzył się spontanicznie z dimerów podczas przechowywania materiału oraz nie ulegał spontanicznemu rozpadowi na dimer i monomer. Tak więc w warunkach eksperymentu (50mM octan amonu; pH 6.8) zarówno wiązanie disiarczkowe jak i kowalencyjne wiązanie o innym charakterze było stabilne. Wiadomo, że powstawanie wiązań disiarczkowych między cząsteczkami monomerów FLC jest procesem zachodzącym wewnątrzkomórkowo przy udziale komórkowych oksydoreduktaz. Najprawdopodobniej powstawanie kowalencyjnego wiązania między cząsteczkami dimerów FLC o charakterze innym niż wiązanie disiarczkowe jest również procesem związanym z aktywnością enzymatyczną. Interesujące byłoby poznanie mechanizmów tworzenia, czynników sprzyjających powstawaniu tego typu struktur oraz charakteru wiązań kowalencyjnych łączących cząsteczki dimerów. W cytowanej pracy nie ma informacji na temat typu łańcuchów lekkich tworzących kowalencyjny tetramer. Biorąc pod uwagę fakt, że składowymi tetrameru były cząsteczki dimeru, można domniemywać, że były to łańcuchy typu lambda.

W niniejszej pracy nie udokumentowano obecności form oligomerycznych połączonych wiązaniem kowalencyjnym. Kowalencyjne formy oligomeryczne utworzone przez łańcuchy lekkie powinny zostać uwidocznione zarówno w rozdzielach chromatograficznych jak i w elektroforezie SDS-PAGE. Dlatego nie można wykluczyć ich obecności w materiałach zaklasyfikowanych do grupy C, w których zarówno na żelach SDS - PAGE jak i w rozdzielach chromatograficznych odnotowano obecność białek o wyższych masach cząsteczkowych. Jednak w tej pracy nie prowadzono badań z użyciem przeciwciał anty FLC, które pozwoliłyby na jednoznaczne określenie pochodzenia pików czy prążków

o MW > 44kDa. Dlatego z badania zależności tendencji do tworzenia oligomerów od typu FLC i występowania łańcuchów w formie dimeru wykluczono 13 pacjentów zaklasyfikowanych do grupy C. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy można by rozwinąć o zagadnienie, czy i w jaki sposób tworzenie niekowalencyjnych i kowalencyjnych oligomerów FLC wpływa na przebieg choroby i stan pacjentów oraz w jakich jednostkach chorobowych z grupy gammapatii monoklonalnych oligomery pojawiają się najczęściej.

Występowanie FLC w formie niekowalencyjnych oligomerów może mieć również znaczenie w codziennej pracy laboratoriów diagnostycznych. Służący do wykrywania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy czy moczu, oparty o technologię lateksową, test FREELITE, jest bardzo kapryśny. Istnieją doniesienia o znacznych (sięgających kilkaset procent) błędach w ilościowym oznaczaniu FLC [^{126,127}]. Te niespójności analityczne tłumaczone są przez większość autorów jako zaburzenia reakcji antygen przeciwciało spowodowane agregacją łańcuchów lekkich (występowaniem oligomerów). W pracy autorstwa Kyle'a i wsp. [¹⁰³] u pacjenta, u którego FLC występowały w formie heksamerów zauważono zawyżenie wyników nefelometrycznego oznaczenia stężenia FLC. Sięgające kilkaset procent błędy w oznaczeniu autorzy tłumaczyli silniejszym oddziaływaniem wykorzystywanych w teście poliklonalnych przeciwciał anty FLC z heksamerami wolnych łańcuchów lekkich, w stosunku do oddziaływań z łańcuchami nietworzącymi oligomerów. Ilościowe oznaczanie FLC jest uznanym parametrem służącym do wykrywania, prognozowania i monitorowania chorób z grupy gammapatii monoklonalnych [^{128,129}], stąd badania nad występowaniem oligomerów FLC w materiałach biologicznych mogą mieć konkretne zastosowanie diagnostyczne. Mogą być pomocne w ocenie wiarygodności testu FREELITE u konkretnego pacjenta. Jednak doświadczenia związane ze współpracą z Zakładem Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie sugerują, że nie zawsze niespójności analityczne w oznaczeniach stężenia wolnych łańcuchów lekkich metodą nefelometryczną są związane z oligomeryzacją FLC. Obserwowano kilkukrotne zawyżenia wyników oznaczania FLC w próbkach, w których nie udawało się wykryć obecności oligomerów metodami chromatografii cieczowej (wyniki nieopublikowane). Być może wspomniane przypadki są związane z faktem, że poliklonalne anty FLC stosowane w testach nefelometrycznych oddziałują silniej także z formą dimeryczną FLC [¹¹⁶]. Dlatego wyznaczenie odsetka dimeru razem z badaniem oligomeryzacji FLC może wnieść nowe informacje do oceny stanu pacjenta i prognozowania przebiegu choroby.

5.3 *Zróźnicowanie mas cząsteczkowych łańcuchów lekkich immunoglobulin.*

Klinicyści zajmujący się problemem chorób z grupy gammapatii monoklonalnych zwracają uwagę na ogromne zróźnicowanie chorób z tej grupy. Wspomniana różnorodność obejmuje różnice w objawach między indywidualnymi chorymi, odmienny przebieg choroby i konieczność zindywidualizowania leczenia. Można spotkać się z opinią, że każdy pacjent cierpi na nieco inną chorobę. Ogromne zróźnicowanie symptomów oraz przebiegu choroby ma m. in. związek z heterogennością monoklonalnych immunoglobulin lub ich fragmentów, które biorą udział w patogenezie choroby. Właściwości fizykochemiczne takie jak: struktura pierwszorzędowa białka, punkt izoelektryczny, stabilność termodynamiczna (a więc skłonność do agregacji) monoklonalnych immunoglobulin czy wolnych łańcuchów lekkich wpływają na czas przeżycia chorego oraz przebieg choroby [74,75,80,100]. Według autorki niniejszej pracy kolejnym istotnym parametrem mogącym mieć wpływ na przebieg choroby jest odsetek dimeru lub monomeru wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Masa cząsteczkowa dimeru oraz monomeru łańcuchów lekkich wg danych z piśmiennictwa naukowego wynosi odpowiednio ok. 44 kDa oraz ok. 22 kDa. W niniejszej pracy analizowano masę cząsteczkową łańcuchów lekkich z użyciem elektroforezy SDS-PAGE. Średnie masy cząsteczkowej formy dimerycznej oraz monomerycznej FLC w analizowanej grupie wynosiły odpowiednio: 51.59 (+/- 3.94) kDa oraz 24.33 (+/- 1.49) kDa. Wartości mas cząsteczkowych mieściły się w szerokich granicach: 43.36 – 63.78 kDa dla dimeru oraz 21.23 – 28.74 kDa dla monomeru.

Zagadnieniem mas cząsteczkowych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin zajmowali się także inni badacze. W pracy Bergen i wsp. [124] metodą spektrometrii masowej dokonano analizy masy cząsteczkowej wolnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda wyizolowanych z surowicy pacjentów z AL amyloidozą. W próbkach od pacjentów z łańcuchami kappa główny pik odpowiadał masie cząsteczkowej monomeru FLC (średnia = 23.55 kDa). Masy cząsteczkowe analizowanych FLC różniły się między sobą w dość wąskich granicach: 23.45 – 23.62 kDa dla monomeru kappa ($\Delta = 175$ Da). Zmienność podobnego rzędu charakteryzowała także łańcuchy lekkie lambda, które występowały głównie w postaci dimeru. Duże rozbieżności między danymi z piśmiennictwa, a otrzymanymi w niniejszej pracy można tłumaczyć przede wszystkim różnymi metodami użytymi do pomiaru. Siarczan dodecyłu sodu jest anionowym detergentem, który łącząc się z cząsteczką białka powoduje utratę drugorzędowej, trzeciorzędowej i czwartorzędowej struktury tego białka. Jest to warunkiem wymaganym do uzyskania liniowej zależności względnej ruchliwości elektroforetycznej od logarytmu masy cząsteczkowej analizowanej cząsteczki. Dokładność wyznaczenia masy cząsteczkowej za pomocą tej metody zależy także od samego białka [130]. Charakter aminokwasów tworzących strukturę pierwszorzędową, punkt izoelektryczny, obecność i charakter bocznych łańcuchów aminokwasowych mają wpływ na wiązanie się detergentu z białkiem. Dlatego technika elektroforezy SDS-PAGE nie umożliwia wyznaczenia mas cząsteczkowych białek z dużą precyzją. Wyznaczona zmienność pomiaru masy cząsteczkowej techniką elektroforezy SDS-PAGE wg. Goetz i wsp. [130] wahała

się w granicach 1.6–3.9%, w zależności od białka. Wyniki te są spójne z otrzymanymi w niniejszej pracy, gdzie współczynnik zmienności masy cząsteczkowej albuminy wynoszący 2.45% potraktowano jako wyznacznik zmienności metody wyznaczania masy cząsteczkowej. Wyższe współczynniki zmienności dla łańcuchów lekkich (7.64% dla formy dimerycznej oraz 6.14% dla formy monomerycznej), świadczą o rzeczywistym zróżnicowaniu mas cząsteczkowych. Statystyczna analiza testem Kruskala-Wallisa oraz odpowiednim testem post-hoc wykazała istotne różnice między zmiennością mas cząsteczkowych dimeru FLC i albuminy (układ referencyjny) oraz monomeru FLC i albuminy. Przedstawiona w pracy zmienność mas cząsteczkowych FLC jest związana przede wszystkim z właściwościami samego białka. Można stwierdzić, że istnieją dwie główne przyczyny dużej zmienności MW dimeru i monomeru FLC uzyskanych w niniejszej pracy. Z jednej strony jest to struktura pierwszorzędowa, która na skutek obecności regionów zmiennych i hipermiennych generuje różnice mas cząsteczkowych łańcuchów pochodzących od różnych klonów komórek plazmatycznych. Z drugiej zaś strony, różnice w strukturze pierwszorzędowej oraz posttranslacyjne modyfikacje wpływają na różne oddziaływanie cząstek SDS z FLC o odmiennym składzie aminokwasowym. Zjawisko to zwiększa zmienność otrzymanych wyników poprzez wpływ na ładunek cząstki migrującej w żelu i jej względną ruchliwość.

Jedną z możliwych przyczyn odmiennej zmienności mas cząsteczkowych zmierzonych przy użyciu spektrometrii masowej przez Bergen i wsp. [124] oraz wyników uzyskanych w niniejszej pracy są różnice w grupach badanych. Bergen i wsp. bazowali na grupie pacjentów z amyloidozą AL. Wobec doniesień o istnieniu charakterystycznych fragmentów struktury pierwszorzędowej amyloidogennych łańcuchów lekkich [70], można przypuszczać, że FLC obecne u chorych na amyloidozę AL stanowią dość jednorodną pod względem właściwości fizykochemicznych grupę białek. W niniejszej pracy doświadczenia prowadzone były na łańcuchach lekkich uzyskanych od pacjentów z różnymi typami schorzeń z grupy gammapatii monoklonalnych, stąd większa zmienność wyników oznaczeń mas cząsteczkowych.

Analizując wartości mas cząsteczkowych formy dimerycznej i monomerycznej FLC można zauważyć, że przeważająca liczba wyników mieściła się w przedziałach o wyższych wartościach od najczęściej spotykanej w piśmiennictwie wartości 22 kDa dla monomeru oraz 44 kDa dla dimeru. Najwięcej obserwacji mieściło się w zakresach: 24-25 kDa (monomer) oraz 52-54 kDa (dimer). Pojedyncze przypadki o masach cząsteczkowych z zakresów: 21-22 kDa (monomer; n=1) oraz 42-44 kDa (dimer; n=3) można wytłumaczyć proteolityczną fragmentacją cząsteczek łańcuchów. W piśmiennictwie spotyka się doniesienia o obecności fragmentów FLC powstających na skutek proteolitycznej fragmentacji natywnej cząsteczki u chorych z gammapatią monoklonalną. Przypuszcza się również, że proteolityczna fragmentacja łańcuchów lekkich przyczynia się do utraty stabilności tego białka, a w konsekwencji do agregacji [69]. W pracy Bergen i wsp. [124] masa cząsteczkowa dimeru lambda oznaczona techniką spektrometrii masowej była mniejsza od teoretycznej, stanowiącej dwukrotną wartość masy cząsteczkowej monomeru. Autorzy zasugerowali,

że jednostką strukturalną dimerów FLC w materiałach pochodzących od pacjentów z AL amyloidozą może być fragment monomeru powstały na skutek proteolizy cząstki natywnej.

Obecność fragmentów natywnych cząsteczek łańcuchów lekkich immunoglobulin może także mieć odzwierciedlenie w niespójnościach wyników ilościowych związanych z nefelometrycznym oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich w surowicy lub moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną. Proteolityczna fragmentacja cząsteczek wolnych łańcuchów lekkich może prowadzić do uzyskania przez białko różnej od natywnej struktury trzeciorzędowej. W konsekwencji może dojść do utraty dostępności pewnych epitopów dla poliklonalnych łańcuchów anty- κ oraz anty- λ [38]. Analiza względnej ruchliwości FLC na żelach SDS-PAGE może być pomocna w interpretacji niespójnych wyników oznaczania FLC testem FREELITE.

Czynnikami wpływającymi na zmienność mas cząsteczkowych FLC mogą być również inne niż fragmentacja proteolityczna modyfikacje posttranslacyjne. W pracy Merliniego i wsp. [116] zauważono, że elektroforetyczna ruchliwość wolnych łańcuchów lekkich uzyskanych z surowicy pacjentów z AL amyloidozą (n=15; typ: lambda, n=5; typ: kappa) oraz pacjenta ze szpiczakiem mnogim (n=1; typ kappa) różni się nieznacznie między pacjentami. Z wykorzystaniem tandemowego spektrometru mas wykonano analizę posttranslacyjnych modyfikacji. W regionie zmiennym FLC wykryto obecność różnych pochodnych tryptofanu, powstałych na skutek jego oksydacji (hydroksytryptofan, N-formylkinurenina, kinurenina). Wykazano również modyfikację cysteiny w pozycji 214 poprzez przyłączenie drobnocząsteczkowej cysteiny oraz proteolityczną modyfikację N-końca łańcuchów. Zaobserwowano również glikozylacja cząsteczek FLC [124]. Utlenienie tryptofanu w łańcuchu polipeptydowym części zmiennej łańcuchów lekkich, S-cysteinyłacja czy glikozylacja nie wpływają znacząco na teoretycznie wyznaczoną wartość masy cząsteczkowej łańcuchów. Mogą jednak wpłynąć na łączenie się anionowego detergentu z białkiem, a zatem na wartość MW uzyskaną empirycznie za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Wiadomo także, że częściowo sfałdowane cząsteczki w elektroforezie SDS-PAGE migrują nieco wolniej od ich form natywnych [131]. Wyznaczona na podstawie rozdzielów w systemie SDS-PAGE masa cząsteczkowa dla częściowo sfałdowanych struktur jest większa od spodziewanej. Zarówno modyfikacje posttranslacyjne [132] jak i nieprawidłowy proces fałdowania cząsteczek łańcuchów lekkich immunoglobulin [14,80] mogą powodować destabilizację cząsteczek FLC i zapoczątkować proces amyloidogenezy. Być może analiza względnej ruchliwości łańcuchów lekkich w elektroforezie SDS-PAGE, ze szczególnym zwróceniem uwagi na przypadki łańcuchów o ruchliwości znacznie odbiegającej od spodziewanej, mogłaby stać się wstępnym etapem do wytypowania klonu łańcuchów potencjalnie amyloidogennych. Potwierdzenie tej hipotezy wymagające poszerzenia analizy mas cząsteczkowych FLC o badania nad ich strukturą trzeciorzędową oraz analizę jednostek chorobowych pacjentów, od których uzyskano preparaty łańcuchów lekkich, wykraczało poza założony zakres niniejszej pracy.

5.4 Związki tiolowe sprzężone z łańcuchami lekkimi immunoglobulin.

W pierwszorzędowej strukturze łańcuchów lekkich immunoglobulin (kappa oraz lambda) znajduje się 5 reszt cysteinyowych – w pozycjach: 23, 88, 134, 194 oraz 214. Między Cys23–Cys88 oraz Cys134–Cys194 utworzone są dwa wewnątrzcząsteczkowe wiązania disiarczkowe stabilizujące strukturę białka [¹³³]. Cys214 łańcuchów lekkich w kompletnej cząsteczce immunoglobuliny zaangażowana jest w tworzenie wiązania disiarczkowego z łańcuchem ciężkim. W przypadku wolnej cząsteczki łańcucha lekkiego, Cys214 może być zaangażowana w tworzeniu dimerów FLC. Gdy cząsteczka pozostaje w formie monomerycznej, do Cys214 zostaje przyłączona reszta cysteinyowa lub reszta innego drobnocząsteczkowego związku tiolowego [¹⁹]. Informacje na temat posttranslacyjnych modyfikacji Cys214 nie są liczne. Istnieją pojedyncze doniesienia, w których udokumentowana została obecność związku tiolowego sprzężonego z Cys214 [^{21,133,134,125}]. W dostępnych pracach dotyczących modyfikacji cysteiny 214 łańcuchów lekkich badania prowadzone były na pojedynczych klonach łańcuchów, w większości przypadków należących do typu kappa. W niniejszej pracy po raz pierwszy podjęto badania S-tiolacji na grupie o liczebności n=42. Do badań włączono FLC zarówno typu kappa jak i lambda wyizolowane z moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną. Zgodnie z wiedzą autorki, są to pierwsze badania nad zagadnieniem związków tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi immunoglobulin, prowadzone na grupie o takiej liczebności oraz obejmujące oba typy łańcuchów lekkich.

Wyniki badań przedstawione w pracy wskazują, że łańcuchy lekkie immunoglobulin są intensywnie tiolowane. Końcowa reszta Cys214 jest całkowicie zablokowana. Za pomocą reakcji z DTNB nie udało się wykryć obecności wolnych grup sulfhydrylowych (badania własne, nieprzedstawione). Całkowite stężenie reszt tiolowych w badanej grupie mieściło się w zakresie: 0.45-26.4 nM/mg białka. Wyniki oznaczania stężeń reszt tiolowych sprzężonych z cząsteczkami łańcuchów lekkich immunoglobulin, zgodnie z wiedzą autorki, są pierwszymi doniesieniami na ten temat. Jak dotąd prace nad post-translacyjną modyfikacją wolnej reszty SH w cząsteczkach FLC miały charakter jedynie jakościowy. Wskazywały na obecność tioli sprzężonych z cząsteczkami FLC oraz definiowały miejsce przyłączenia reszty tiolowej.

W niniejszej pracy opisywano obecność reszt tiolowych sprzężonych z cząsteczkami FLC zarówno w przypadku łańcuchów typu kappa jak i lambda, choć stężenia w obu tych grupach różniły się znamienne. Mediana całkowitego stężenia reszt tiolowych w grupie łańcuchów lekkich kappa wynosiła 10.74 nM/mg białka. Wartości stężeń mieściły się w zakresie: 2.53 – 26.4 nM/mg białka. Dla łańcuchów lekkich lambda mediana wynosiła 3.43 nM/mg białka, natomiast zakres stężeń całkowitych reszt tiolowych wynosił: 0.45 - 12.41 nM/mg białka. Szeroki zakres stężeń całkowitych reszt tiolowych sprzężonych z cząsteczkami FLC typu kappa można tłumaczyć szerokim zakresem odsetka monomeru, jaki charakteryzował podgrupę z łańcuchami typu kappa. Odsetek monomeru, wśród 25 FLC typu kappa poddanych analizie stężeń reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami, wahał się w granicach: 0-100%. Jednak dla 80% badanej podgrupy (n=20) odsetek monomeru

przyjmował wartości $\geq 50\%$. Wykazano korelację pomiędzy stężeniem całkowitym reszt tiolowych sprzężonych z cząsteczkami FLC a odsetkiem monomeru FLC. W ten sposób potwierdzono hipotezę, że głównym miejscem przyłączenia związków tiolowych jest końcowa reszta Cys214.

Jak do tej pory nie do końca poznane są przyczyny modyfikacji wolnych reszt cysteinowych w cząsteczkach łańcuchów lekkich. Jedną z niezwykle istotnych funkcji cysteiny₂₁₄ jest udział w procesie wydzielania wolnych łańcuchów lekkich poza komórkę plazmatyczną. Nowo zsyntetyzowana cząsteczka łańcucha lekkiego wiąże się przejściowo z białkami macierzy retikulum endoplazmatycznego. Mechanizm ten ma na celu zatrzymanie we wnętrzu komórki niekompletnego białka. Tylko białko, w którym Cys₂₁₄ jest zaangażowana w tworzenie wiązania disiarczkowego może zostać wydzielone poza komórkę plazmatyczną. Dla łańcuchów lekkich istnieją trzy możliwości – przyłączenie do łańcucha ciężkiego, utworzenie dimeru lub połączenie grupy sulfhydrylowej Cys₂₁₄ z cząsteczką wolnego związku tiolowego. Okazuje się, że mutacja w genie kodującym sekwencję aminokwasową łańcuchów lekkich, prowadząca do utraty fragmentu białka zawierającego reszty cysteinylowe w pozycji 196 oraz 214, może stać u podstaw patogenezy szpiczaka niewydzielniczego [¹³⁵]. W tym przypadku cząsteczki wolnych łańcuchów lekkich nie są wydzielane na zewnątrz, zostają natomiast skierowane na drogę proteolizy. Wyjaśnienie szczegółowego mechanizmu modyfikacji Cys₂₁₄ oraz ustalenie czy proces ten ma znaczenie w patogenezie chorób z grupy gammapatii monoklonalnych wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Wśród otrzymanych w niniejszej pracy wyników związanych z ilościowym oznaczaniem reszt tiolowych sprzężonych z FLC bardzo ważna i zaskakująca jest informacja na temat reszt tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi typu lambda. Mediana stężeń całkowitych reszt tiolowych związanych z łańcuchami typu lambda jest trzykrotnie niższa od analogicznej wartości dla łańcuchów lekkich kappa. Uwzględniając zaangażowanie Cys 214 (najbardziej prawdopodobnego miejsca tiolacji w cząsteczce FLC) w tworzenie formy dimerycznej, która dla łańcuchów lekkich typu lambda jest podstawową formą molekularną, spodziewano się uzyskać stężenia tioli bliskie zeru. Również dane z piśmiennictwa podkreślają brak udokumentowanych przypadków cysteinylacji łańcuchów lekkich lambda w pozycji 214 [¹³⁴]. Część wysokich wyników stężeń reszt tiolowych w podgrupie łańcuchów lekkich lambda można wytłumaczyć wysokim odsetkiem monomeru. Dla 60% (3/5) wysokich (leżących powyżej wartości górnego kwartyla) wyników stężeń reszt tiolowych związanych z łańcuchami lekkimi lambda odsetek formy monomerycznej był znaczący. Stężenia reszt tiolowych: 12.41; 7.93 oraz 7.54 nM/mg białka były związane z wartościami monomeru odpowiednio: 41; 47; 28%. Stężenia reszt tiolowych w przytoczonych przypadkach są analogiczne dla wyników uzyskanych w grupie łańcuchów kappa, gdzie 50% obserwacji mieściło się w przedziale: 7.54-14.52 nM/mg białka. Uzasadnienie wysokich stężeń reszt tiolowych dla pozostałych 40% (2/5) przypadków leżących w przedziale powyżej wartości górnego kwartyla dla całkowitego stężenia reszt tiolowych sprzężonych z FLC jest trudne.

Dwa przypadki spektakularnych rozbieżności między wartością odsetka monomeru a całkowitym stężeniem reszt tiolowych dotyczyły cząsteczek występujących jedynie w formie kowalencyjnego dimeru (odsetek monomeru = 0%). Całkowite stężenie reszt tiolowych w tych przypadkach wynosiło: 7,9 oraz 6,9 nM/mg białka, a więc znaczne powyżej mediany w tej grupie wyników (3,43 nM/mg białka).

W piśmiennictwie znaleziono tylko jedno doniesienie, w którym opisywano wykrycie reszty tiolowej sprzężonej z cząsteczką FLC lambda. Merliniego i wsp. [¹¹⁶], działający w jednym z najprężniejszych ośrodków zajmujących się badaniami nad mechanizmem powstawania amyloidozy, wykorzystując tandemowy spektrometr mas wykryli S-cysteinylację w pozycji 194 w łańcuchach lekkich lambda. Łańcuchy lambda wyizolowane były z surowicy pacjentów z amyloidozą AL. Eksperyment prowadzony był w warunkach nieredukujących, S-cysteinylacja dotyczyła cząsteczki dimerycznej. W przytoczonej pracy wykazano, że tego typu modyfikacja nie jest rzadka dla amyloidogennych FLC. Została udokumentowana w 26,6% badanej grupy (4/15). Wykrycie S-cysteinylacji dimerycznej formy FLC lambda wydaje się być informacją zaskakującą. Cysteina w pozycji 194 w natywnej cząsteczce łańcuchów lekkich nie jest łatwo dostępna dla ataku nukleofilowego przez wolną grupę sulfhydrylową drobnocząsteczkowego związku tiolowego. Zaangażowana jest w tworzenie wewnątrzcząsteczkowej pętli zlokalizowanej w części stałej łańcuchów lekkich immunoglobulin (ryc. 4). Cysteinylacja w tej pozycji świadczy więc o rozerwaniu mostka disiarczkowego tworzącego wspomnianą pętlę i wyeksponowaniu cysteiny w pozycji 194, co z pewnością powoduje zmiany konformacyjne całego białka. Być może wysokie stężenia reszt tiolowych w cząsteczkach FLC lambda badanej grupy, w których udział formy monomerycznej jest niewielki, są związane z rozerwaniem wewnętrznej pętli w cząsteczce FLC i wyeksponowaniem grupy SH jednej z cystein, które w natywnej cząsteczce tworzą wiązania disiarczkowe. Zbadanie miejsca przyłączenia reszty tiolowej w dimerycznych cząsteczkach FLC lambda badanej grupy pacjentów może stać się kolejnym krokiem do wyjaśnienia tego zjawiska.

Znaleziona w piśmiennictwie naukowym informacja na temat rozerwania wewnątrzcząsteczkowego wiązania disiarczkowego w części stałej łańcucha lekkiego dotyczyła FLC typu lambda [¹¹⁶]. Istnieje możliwość, że tego typu modyfikacja może mieć również miejsce w cząsteczce łańcuchów typu kappa. W niniejszej pracy zaobserwowano rozbieżności między całkowitym stężeniem reszt tiolowych oraz odsetkiem monomeru FLC także dla łańcuchów typu kappa. Są to przypadki pojedyncze. W pierwszym z nich odsetek monomeru przyjmował wartość 9.2%, podczas gdy dla łańcuchów kappa odsetek monomeru z przedziału 0-10% charakteryzuje jedynie 5.38% przypadków (5/93). Tak niewielkiej wartości odsetka monomeru odpowiadało całkowite stężenie reszt tiolowych równe 10.8 nM/mg białka, a więc wartość niemal równa medianie stężenia tioli w tej grupie łańcuchów. Drugi przypadek związany jest z łańcuchami kappa występującymi jedynie w formie dimeru (odsetek monomeru = 0%), dla których całkowite stężenie reszt tiolowych wynosiło

9.5 nM/mg białka. Warto nadmienić, że w przedziale całkowitych stężeń reszt tiolowych o wartościach 5-15 nM/mg białka lokuje się aż 68% wyników dla łańcuchów typu kappa.

W piśmiennictwie można znaleźć informacje o kluczowym znaczeniu części stałej łańcucha lekkiego dla stabilności termodynamicznej całej cząsteczki FLC [73]. Doniesienia te pozwalają przypuszczać, że wszelkie modyfikacje powodujące utratę natywnej struktury części stałej łańcuchów lekkich, mogą przyczynić się do utraty termodynamicznej stabilności całej cząsteczki, a w konsekwencji tworzenia włókien amyloidowych. Merlini i wsp. [116], którzy opublikowali informację o cysteinylacji amyloidogennych łańcuchów lekkich lambda w pozycji 194 nie zajmowali się wyjaśnieniem przyczyn rozerwania wewnątrzcząsteczkowej pętli spiętej kowalencyjnym wiązaniem disiarczkowym. Być może we wnętrzu komórek plazmatycznych, które uległy transformacji nowotworowej, doszło do zachwiania wewnątrzkomórkowej równowagi redoks oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia drobnocząsteczkowych związków tiolowych. Skutkiem tego kowalencyjne wiązanie disiarczkowe uległo rozerwaniu, a do wyeksponowanej wolnej grupy sulfhydrylowej został przyłączony tiolowy związek drobnocząsteczkowy. Nie można jednak wykluczyć, że u początku opisanej zmiany konformacyjnej amyloidowych łańcuchów lekkich leżały mutacje punktowe uniemożliwiające utworzenie wiązania disiarczkowego między Cys134–Cys194, nie zaś zmiany w środowisku zewnętrznym. Wg. Gilberta [136] nawet niewielkie naruszenie natywnej struktury białka, jak np. rozerwanie jednego z wiązań disiarczkowych tworzących trzeciorzędową strukturę, może prowadzić do utraty termodynamicznej stabilności białka i zapoczątkować proces amyloidogenezy. Można wnioskować, że obecność reszt tiolowych sprzężonych z FLC lambda, u których odsetek dimeru bliski jest 100%, jest jednym ze wskaźników zmienionej konformacji cząsteczek łańcuchów lekkich lambda. Potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga jednak dalszych badań.

W procesie dojrzewania łańcuchów lekkich immunoglobulin częściowo sfałdowana cząsteczka wchodzi w interakcję z białkiem chaperonowym BiP poprzez wyeksponowane fragmenty hydrofobowe [15]. Rozerwanie tego typu połączenia jest ściśle związane z kształtowaniem się trzeciorzędowej struktury białka i tworzeniem kowalencyjnych wiązań disiarczkowych. Okres półtrwania kompleksu dojrzewającej cząsteczki FLC z białkiem BiP odpowiada czasowi tworzenia wewnątrzcząsteczkowych pętli stabilizowanych przez wiązania disiarczkowe [21]. Utworzenie wewnętrznych wiązań disiarczkowych generuje zmiany konformacyjne cząsteczki, które powodują ukrycie hydrofobowych fragmentów łańcucha polipeptydowego we wnętrzu struktury FLC. Jedną z teorii dotyczących patogenezy chorób związanych z odkładaniem się depozytów białkowych zwraca uwagę na rolę eksponowanych hydrofobowych reszt aminokwasowych w tworzeniu interakcji między częściowo sfałdowanymi białkami będącymi prekursorami złogów amyloidowych [14]. Można stwierdzić, że czynniki upośledzające tworzenie wewnętrznych mostków disiarczkowych mogą przyczynić się do nabrania przez cząsteczkę FLC cech amyloidogennych. Na podstawie powyższych informacji można również zasugerować podjęcie badań dotyczących potencjalnych korzyści badania procesu tiolacji wolnych łańcuchów w diagnostyce pacjentów

z gammapatią monoklonalną. Włączenie oznaczenia reszt tiolowych sprzężonych z cząsteczkami FLC do panelu badań u osób z gammapatią monoklonalną mogłoby być pomocne w wytypowaniu cząsteczek o zmienionej konformacji, w tym cząsteczek potencjalnie amyloidogennych.

Proces modyfikacji C-końcowej reszty cysteinyłowej jest najprawdopodobniej ściśle połączony z tworzeniem wiązań disiarczkowych. Utrzymanie właściwego potencjału redoks w świetle RE jest kluczowe dla poprawnego wydzielania białek. Wysoki potencjał redoks we wnętrzu RE zachowany jest dzięki stosunkowo wysokiemu stężeniu utlenionej formy glutationu [GSSG] - stosunek stężeń formy zredukowanej do formy utlenionej [GSH] : [GSSG] wynosi od 1:1 do 3:1. Tego typu środowisko zapewnia także optymalne warunki do działania dla enzymów komórkowych biorących udział w procesie fałdowania białek, wśród których najlepiej poznana i opisana jest izomeraza disiarczkowa białek (PDI - *protein disulphide isomerase*) oraz białko Ero 1 (*ER oxidoreductin*) [^{137,138}].

Zgodnie z wynikami badań Winther i wsp. całkowity bilans białkowych disiarczków ulega pewnym zmianom podczas różnicowania limfocyta B do komórki plazmatycznej – komórki mającej zdolność syntezy przeciwciał. Znamienny wzrost wewnątrzkomórkowego potencjału redox, związanego ze wzrostem ilości wiązań disiarczkowych, można zaobserwować w końcowych stadiach różnicowania limfocyta B, gdy są produkowane duże ilości IgM. Podczas syntezy jednego pentameru/heksameru IgM jest wytwarzanych ok. 100 wiązań disiarczkowych [¹³⁸]. Tworzenie wiązań disiarczkowych podczas syntezy kompletnych cząsteczek przeciwciał lub wolnych łańcuchów lekkich generuje powstawanie stosunkowo dużych ilości wolnych rodników tlenowych (ROS - *reactive oxygen species*). Aby zachowana została równowaga redoks, istnieje konieczność uruchomienia komórkowych systemów antyoksydacyjnych, w których kluczową rolę pełni glutation. Istnieją doniesienia mówiące o zachwianiu równowagi redoks w przebiegu szpiczaka mnogiego, co manifestuje się wzrostem surowiczych markerów stresu oksydacyjnego (produkty oksydacji białek np. AOPP, S-nitrozyłowane białka) [¹³⁹]. Odsetek dimer/monomer FLC może w sposób pośredni odzwierciedlać warunki oksydacyjne we wnętrzu RE komórek plazmatycznych – zwiększony potencjał redoks we wnętrzu RE sprzyja tworzeniu disiarczków, a więc tworzeniu dimerów FLC. Na podstawie wyników badań niniejszej pracy wskazujących, że stosunek dimer/monomer FLC jest wartością charakterystyczną dla danego pacjenta (a więc i klonu komórek plazmatycznych) i nie zmienia się w przebiegu choroby, można wnioskować o ustaleniu się pewnej równowagi redoks wewnątrz RE charakterystycznej dla konkretnego klonu komórek plazmatycznych. Ustalenie, czy i w jaki sposób mechanizm ten wpływa na naturalny przebieg choroby lub powodzenie terapii wymaga bardziej złożonych badań.

Istnieją przesłanki mówiące, że procesy redoks są zaangażowane w tworzenie włókien amyloidowych. W ekstraktach z tkanek zajętych przez proces amyloidogenezy w przebiegu AL amyloidozy, obok wolnych łańcuchów lekkich wykryto surowiczy amyloid P. Surowiczy amyloid P (SAP) jest białkiem, które w swojej strukturze posiada fragmenty o konformacji beta z wiązaniami disiarczkowymi pomiędzy cysteinami sąsiednich zwojów beta kartki.

Tego typu wiązania nie pełnią roli strukturalnej i nie stabilizują cząsteczki białka, natomiast wykazano ich udział w procesach redoks [113]. Doświadczenia, w których po podaniu myszom łańcuchów lekkich wyizolowanych z surowicy chorych z amyloidozą zaobserwowano tworzenie złogów białkowych składających się z ludzkich łańcuchów oraz mysiego SAP, sugerują udział tego białka w amyloidogenezie [57]. Uważa się, że aktywność redoks disiarczaków może powodować zmiany struktury przestrzennej białka i wyeksponowanie w białkach będących prekursorami włókien amyloidowych miejsc podatnych na działanie enzymów proteolitycznych. Proces ten może mieć istotne znaczenie w molekularnym mechanizmie tworzenia amyloidu. Warto nadmienić, że SAP jest również składową białkowych depozytów w innych niż AL amyloidozach z tej grupy.

Zjawiska dojrzewania białek zachodzące w obrębie RE są stosunkowo dobrze poznane. Jednak informacje na temat mediowanego tiolami zatrzymywania prekursorów białek we wnętrzu RE oraz modyfikacji C-końcowej reszty cysteinyłowej białek są niepełne. Zgodnie z wynikami uzyskanymi w pracy, związkiem tiolowym sprzężonym z cząsteczkami łańcuchów lekkich o najwyższym stężeniu była cysteina. Mediana stężenia cysteiny wynosiła 9.72 oraz 2.81 nM/mg białka odpowiednio dla FLC typu kappa oraz lambda. Stężenia homocysteiny oraz cysteinyloglicyny były zbliżone do siebie, ich mediany wynosiły odpowiednio: 0.71 i 1.01 nM/mg białka dla FLC kappa oraz 0.24 i 0.27 nM/mg białka dla FLC lambda. Stężenie glutationu było najniższe, z medianą 0.07 oraz 0.05 nM/ mg białka dla odpowiednio FLC kappa i lambda (wyniki zebrano w tabeli 8). Wyniki niniejszej pracy wskazują na cysteinę jako główny związek tiolowy sprzężony z FLC. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa, w których autorzy informują o obecności cysteiny związanej z C-końcową resztą cysteinyłową FLC [21,133,134]. W analizowanym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat innych niż cysteina reszt tiolowych związanych z cząsteczkami wolnych łańcuchów lekkich. W świetle wyników otrzymanych w niniejszej pracy nasuwa się szereg pytań o udział glutationu, cysteinyloglicyny czy innych drobnocząsteczkowych związków tiolowych w wydzielenie poza komórkę plazmatyczną wolnych łańcuchów lekkich.

Drobnocząsteczkowym związkiem tiolowym o najwyższym stężeniu we wnętrzu RE jest GSSG [21]. Jednak w większości zbadanych przypadków wolnych łańcuchów lekkich Cys214 związana jest głównie z cząsteczką cysteiny. Pojawia się pytanie o mechanizmy związane z procesem maskowania Cys214 we wnętrzu RE. Sitia i wsp. zaproponowali hipotezę, że to glutation wiąże się z Cys 214 łańcuchów lekkich, umożliwiając uwolnienie FLC z kompleksu z białkami macierzy RE i uwolnienie poza komórkę plazmatyczną [21]. Wymiana glutationu na cysteinę w cząsteczce FLC zachodzi natomiast pozakomórkowo. Tego typu hipoteza budzi jednak mnóstwo zastrzeżeń. Przeciw niej przemawiają nowsze doniesienia, w których rola glutationu sprowadzana jest przede wszystkim do reduktora nieprawidłowo utworzonych wiązań disiarczkowych w białkach oraz reduktora motywu CysX-XCys znajdującego się w centrum aktywnym oksydoreduktaz takich jak PDI czy ERp57 (enzymy te w stanie spoczynku występują głównie w zredukowanej formie) [140]. Najnowsze badania dowodzą również, że udział glutationu w procesie modyfikacji wolnych reszt cysteinyłowych

w cząsteczkach białek produkowanych przez komórki plazmatyczne jest niewielki. Okazuje się, że poziom glutationyloowanych białek nie zmienia się w trakcie dojrzewania limfocyta B. Nawet w końcowy etapie dojrzewania, gdy cząsteczki IgM są produkowane i wydzielane poza komórkę, mniej niż 0.3% białkowych cystein jest zmodyfikowana przez glutation [138]. Tego typu informacja pozostaje w zgodzie w wynikami niniejszej pracy, w których stężenia glutationu są najniższe. Mediana względnego stężenia glutationu dla łańcuchów lekkich wynosiła 0.88%. Najprawdopodobniej cysteinylacja Cys 214 w cząsteczkach wolnych łańcuchów lekkich zachodzi wewnątrzkomórkowo i właśnie cysteina jest głównym drobnocząsteczkowym związkiem tiolowym, który maskując wolną grupę SH w pozycji 214 przyczynia się do uwalniania FLC poza komórkę plazmatyczną. Wyniki niniejszej pracy, w których 100% badanych klonów FLC było związane przede wszystkim z cysteiną, potwierdzają taką hipotezę. Nie jest jasne pochodzenie homocysteiny oraz cysteinylglicyny, z które zostały również wykryte w preparatach łańcuchów lekkich.

Innym zagadnieniem dotyczącym modyfikacji posttranslacyjnych łańcuchów lekkich przez drobnocząsteczkowe tiole jest profil stężeń związków tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi. W celu analizy profilu związków tiolowych u poszczególnych pacjentów z gammopatią monoklonalną stężenia cysteiny, homocysteiny, cysteinylglicyny oraz glutationu zostały przedstawione w postaci wartości procentowej całkowitego stężenia związków tiolowych sprzężonych z FLC u danego pacjenta i nazwane względnymi stężeniami. Stwierdzono, że profile stężeń wymienionych związków tiolowych w materiale pochodzącym od pacjentów z różnymi postaciami gammopatii monoklonalnej są bardzo zbliżone. Nie ma statystycznie istotnych różnic w wartościach względnych stężeń poszczególnych związków tiolowych między łańcuchami lekkimi typu kappa oraz lambda, co potwierdzono nieparametrycznym testem Manna-Whitney'a. Najwyższy procentowy udział związków tiolowych sprzężonych z FLC odpowiada cysteinie (mediana: 84.43%). Udział cysteinylglicyny oraz homocysteiny w modyfikowaniu grupy sulfhydrylowej białkowej cysteiny jest zbliżony (mediany odpowiednio: 6.85% oraz 6.74%), a glutationu najmniejszy (mediana: 0.88%). Różnice w profilu stężeń związków tiolowych sprzężonych z różnymi klonami FLC dotyczą przede wszystkim cysteinylglicyny oraz homocysteiny. U części pacjentów (n=6) względne stężenia tych związków są bardzo zbliżone, u pozostałych względne stężenie cysteinylglicyny przewyższa (n=18) lub jest niższe (n=18) od względnego stężenia homocysteiny.

Analiza porównawcza względnych stężeń związków tiolowych sprzężonych z cząsteczkami FLC (%) oraz bezwzględnych wartości tych stężeń (nM/mg białka) wykazała, że największą zmiennością cechuje się procentowa zawartość cysteinylglicyny. Aktualnie niewiele wiadomo na temat roli tego związku w procesach komórkowych. Cysteinylglicyna jest dipeptydem, który powstaje w procesie hydrolizy glutationu katalizowanym przez zlokalizowany na zewnętrznej stronie błon komórkowych enzym γ -glutamylotranspeptydazę (γ -GT). Cysteinylglicyna w kolejnym etapie może być hydrolizowana przez związaną z błoną komórkową dipeptydazę. Cysteinylglicyna jest również transportowana do wnętrza

komórek (najprawdopodobniej przy pomocy transportera Pept2). Dipeptyd ten jest wewnątrzkomórkowo rozkładany przez rozpuszczalną dipeptydazę, w wyniku czego powstaje cysteina oraz glicyna, które mogą zostać użyte do odtworzenia wewnątrzkomórkowej puli glutationu. Według De Donatis [141] proces hydrolizy cysteinyloglicyny w komórkach wołowej soczewki oka zachodzi przede wszystkim wewnątrzkomórkowo, a aktywność błonowej dipeptydazy w tych komórkach jest znikoma. Nie znaleziono informacji na temat aktywności dipeptydazy rozkładającej cysteinyloglicynę oraz metabolizmu tego dipeptydu we wnętrzu komórek plazmatycznych. Jednak profil związków tiolowych sprzężonych z Cys214 łańcuchów lekkich, w którym cysteinyloglicyna zajmuje znaczące miejsce, może sugerować, że dipeptyd ten poprzez tiolację C-końcowej cysteiny łańcuchów lekkich, bierze udział w procesie uwalniania tego białka poza komórkę plazmatyczną. Z aktywnością enzymatyczną γ -GT, w wyniku której powstaje cysteinyloglicyna, wiąże się również powstawanie niewielkich ilości nadtlenu wodoru [142]. W badaniach na komórkach białaczki limfatycznej udowodniono, że ekspozycja na powstające w reakcji katalizowanej przez γ -GT reaktywne formy tlenu stymuluje proliferację komórek białaczkowych. Zaobserwowano również anty-apoptotyczne działanie niewielkich ilości H_2O_2 powstających w reakcji hydrolizy glutationu. Proces ten przyczynia się do podtrzymania nieśmiertelności komórek, która jest jedną z cech charakteryzujących komórki nowotworowe. Zastosowanie inhibitorów działania γ -GT, poprzez wiele różnych mechanizmów (m. in. na drodze zahamowania aktywności polimerazy poli[ADP-rybozy] - PARP) prowadzi do śmierci komórki nowotworowej [142]. Interesujące byłoby zbadanie związku pomiędzy procentowym udziałem związków tiolowych innych niż cysteina (przede wszystkim cysteinyloglicyny) w tiolacji C-końcowej cysteiny FLC, a tempem proliferacji nowotworu oraz jego opornością na leczenie.

Wydaje się, że profil związków tiolowych sprzężonych z C-końcową cysteiną monoklonalnych łańcuchów lekkich jest ich cechą charakterystyczną i różni się od profilu tiolacji łańcuchów poliklonalnych [obserwacje własne nieopublikowane]. Chociaż stężenia związków tiolowych (nM/mg białka) w grupie monoklonalnych FLC są różne dla obu typów łańcuchów, zawartość procentowa analizowanych drobnocząsteczkowych związków tiolowych sprzężonych z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin jest dla FLC typu kappa oraz typu lambda taka sama. Dla poliklonalnych łańcuchów lekkich natomiast profil związków tiolowych jest odmienny. Dla łańcuchów monoklonalnych i poliklonalnych zbliżone były procentowe zawartości cysteiny, homocysteiny - odpowiednio 84.5% vs 90.29% dla cysteiny oraz 6.52% vs 7.66% dla homocysteiny. W obydwu grupach łańcuchów udział procentowy glutationu był niski (0.87% vs 0.5%), a stężenia (nM/mg białka) w oznaczanych materiałach były zbliżone do granicy oznaczalności metody. Różnice między profilem związków tiolowych łańcuchów poliklonalnych i monoklonalnych dotyczyły cysteinyloglicyny. W porównaniu do łańcuchów poliklonalnych, monoklonalne FLC zawierały ok. 4 razy więcej cysteinyloglicyny (odpowiednio 6.8% vs 1.53%). Względne stężenie cysteinyloglicyny wydaje się być związane z zaburzeniem równowagi redoks w zmienionych nowotworowo komórkach

plazmatycznych. Trzeba jednak zaznaczyć, że oznaczanie związków tiolowych w łańcuchach poliklonalnych wykonywano tylko na jednym preparacie. Wyniki należałoby potwierdzić na większej grupie materiałów. Jednak ze względu na dużą zdolność nieuszkodzonych cewek nerkowych do resorpcji wolnych łańcuchów lekkich, stężenie poliklonalnych FLC w moczu pacjentów ze schorzeniami innymi niż gammadacie monoklonalnej jest niewielkie. Jednoczesne występowanie u pacjenta wzrostu stężenia poliklonalnych FLC we krwi (np. w przebiegu chorób zapalnych) oraz uszkodzenia cewek nerkowych nie jest częste. Dlatego mocze ze zwiększoną ilością poliklonalnych FLC są materiałem trudnodostępnym.

Zaprezentowane wyniki są kolejnym sygnałem, że metabolizm związków tiolowych w komórkach nowotworowych jest zaburzony. W piśmiennictwie dostępne są badania statusu tiolowego oparte na pomiarach stężeń glutationu, cysteiny i homocysteiny. Przedstawione dane są pierwszymi dotyczącymi stężeń cysteinyloglicyny w przebiegu gammadatii monoklonalnych.

5.5 Zjawisko drabin łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Zjawisko drabin łańcuchów lekkich, które wiąże się z występowaniem w rozdzielaczach elektroforetycznych charakterystycznego układu kilku prążków, było opisywane przez niewielu autorów. Interpretowano je zwykle jako wynik elektroforetycznego rozdziału poliklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Poliklonalne wolne łańcuchy lekkie, zazwyczaj niewidoczne na żelach, zostają uwidocznione na skutek zwiększonej produkcji w przebiegu przewlekłych chorób zakaźnych lub upośledzenia resorpcji białek drobnocząsteczkowych przez uszkodzone cewki nerkowe albo wreszcie jako artefakty powstałe na skutek procedury zagęszczania moczu poprzedzającej aplikację materiału na żel. Opisany w niniejszej pracy typowy wzór migracji monoklonalnych łańcuchów lekkich, zwany zjawiskiem drabin FLC, składa się z kilku prążków (zwykle trzech), wyraźnie odgraniczonych i migrujących w równych odstępach. Dane z piśmiennictwa sugerują, że analizowane metodą immunofiksacji białka tworzące drabinę zwykle są poliklonalnymi łańcuchami lekkimi kappa oraz rzadko łańcuchami typu kappa oraz lambda równocześnie [87-91]. Znalaziono tylko jedno doniesienie na temat drabiny utworzonej przez wolne monoklonalne łańcuchy lekkie [92]. Opisywano przypadek 62-letniego mężczyzny cierpiącego na chorobę łańcuchów lekkich, w którego moczu, analizowanym na żelu agarozowym w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej, zaobserwowano ponad 15 odgraniczonych i równo rozmieszczonych prążków zlokalizowanych we frakcji gamma oraz beta. Wspomniane prążki były utworzone przez łańcuchy lekkie typu lambda, co stoi w opozycji do wcześniej publikowanych informacji na temat zjawiska drabin, który łączono z łańcuchami typu kappa lub z występowaniem w moczu łańcuchów kappa oraz lambda równocześnie [89].

Harrison i wsp. [90] zaobserwowali zjawisko migrowania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w postaci trzech wyraźnie odgraniczonych prążków u pacjenta z białkomoczem Bence-Jonesa. W tym przypadku zasugerowano występowanie obok białka Bence-Jonesa znamiennej ilości poliklonalnych wolnych łańcuchów lekkich, których obecność spowodowała wystąpienie na żelu dodatkowych prążków. Jednak takie wytłumaczenie sposobu migracji FLC u pacjenta z gammadatią monoklonalną wydaje się być wątpliwe, gdyż jedną z cech chorób z tej grupy jest immunosupresja i wyparcie prawidłowych komórek plazmatycznych przez klon, który uległ transformacji nowotworowej.

W niniejszej pracy analizowano zjawisko migracji łańcuchów lekkich w postaci drabiny w grupie pacjentów z różnymi formami gammadatii monoklonalnych. Monoklonalne łańcuchy lekkie, jako produkt jednego klonu komórek plazmatycznych, nie wykazują charakterystycznego dla poliklonalnych immunoglobulin zróżnicowania w pierwszorzędowej strukturze białka spowodowanej zmiennością na złączach, zmiennością rekombinacyjną czy mutacjami punktowymi. Dlatego mechanizm powstawania drabiny w tym przypadku musi być odmienny od mechanizmu związanego z drabiną z łańcuchów poliklonalnych. Podjęte w niniejszej pracy badania nad czynnikami wpływającymi na wzór migracji monoklonalnych FLC oraz wyjaśnieniem przyczyn powstania rozdzielanych elektroforetycznie różnych form

monoklonalnych łańcuchów lekkich w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej objęły największą dotąd opisaną grupę pacjentów.

Zjawisko migracji monoklonalnych łańcuchów lekkich w postaci kilku prążków dotychczas obserwowane było w technice ogniskowania izoelektrycznego (IEF). Monoklonalne FLC w IEF migrują zazwyczaj w postaci jednego prążka o największej intensywności oraz dwóch słabszych prążków. Opisany wzór migracji związany jest z różnicami w wartościach punktów izoelektrycznych pomiędzy cząsteczkami FLC. Tego typu różnice są skutkiem modyfikacji ekspozowanych na zewnątrz reszt aminokwasowych białka, które najprawdopodobniej zachodzą posttranslacyjnie. W innych systemach elektroforetycznych z użyciem żeli agarozowych, poza wspomnianym opisem przypadku pacjenta z chorobą łańcuchów lekkich z FLC typu lambda, sposób migracji monoklonalnych FLC opisywano jako występowanie jednego prążka, którego intensywność ściśle zależała od ilości białka w moczu oraz czułości barwienia. W niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano częstość występowania zjawiska drabin monoklonalnych FLC na żelach agarozowych w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej.

Najczęstszym obrazem klasyfikowanym w pracy jako drabiny łańcuchów lekkich było występowanie 3-4 wyraźnie oddzielonych prążków białkowych. Wśród drabin monoklonalnych nie odnotowano ani jednego przypadku, w którym liczba prążków byłaby większa niż 4. Opisywany sposób migracji monoklonalnych FLC jest analogiczny do wzoru migracji poliklonalnych łańcuchów. Częstość występowania drabiny w grupie monoklonalnych i poliklonalnych FLC jest odmienna. W grupie 54 pacjentów z białkomoczem cewkowym, których mocze poddano immunofiksacji, MacNamara i wsp. zaobserwowali występowanie drabin w 72% próbek, do których wizualizacji użyto przeciwciał anti- κ oraz 26% próbek, do których wizualizacji użyto przeciwciał anti- λ [89]. Dodatkowo zauważono, że w przypadku białkomoczu cewkowego oraz w próbkach pochodzących od osób zdrowych, odpowiednie zagęszczenie lub rozcieńczenie moczu skutkowało pojawieniem się efektu drabin. Częstość występowania drabin poliklonalnych łańcuchów lekkich bardzo zależy od czułości metody elektroforetycznej użytej w badaniu. W niniejszej pracy, spośród 165 przeanalizowanych techniką elektroforezy wysokorozdzielczej próbek z białkomoczem Bence-Jonesa, zjawisko drabin zaobserwowano w 14.5% (n=24). Tylko w jednym przypadku zagęszczanie materiału spowodowało uwidocznienie zjawiska drabin dla monoklonalnych łańcuchów lekkich migrujących wcześniej jako pojedynczy prążek. W pozostałych przypadkach zagęszczanie/rozcieńczenie materiału wpływało na poprawę jakości obrazu drabiny (uwidocznienie słabych prążków lub lepsze rozdzielanie prążków, które w zagęszczonych materiałach migrowały bardzo blisko siebie), natomiast nie wpływało na podstawowy wzór migracji.

Opisywane przez innych autorów zjawisko drabin poliklonalnych łańcuchów lekkich 4 - 6 razy częściej obserwowane było dla FLC typu kappa [90,91]. Zgodnie z wynikami niniejszej pracy, informacja ta jest również prawdziwa dla łańcuchów monoklonalnych. Analizując wyniki rozdzielów elektroforetycznych wykazano, że 83.3% drabin (20/24) utworzone było

przez łańcuchy lekkie typu kappa. Pozostałe 16.7% drabin (4/24) reprezentowane było przez łańcuchy lekkie typu lambda. W chorobach z grupy gammapatii monoklonalnych obserwuje się większą częstość występowania łańcuchów lekkich typu kappa - w postaci związanej z kompletną cząsteczką immunoglobuliny lub w postaci wolnej cząsteczki, w stosunku do łańcuchów typu lambda. Proporcja $\kappa:\lambda$ wynosi 1.75 i odpowiada stosunkowi łańcuchów lekkich immunoglobulin produkowanych przez osobę zdrową [25]. Jak widać, częstsze występowanie drabiny utworzonej z FLC typu kappa nie jest prostym odzwierciedleniem ogólnego stosunku produkcji łańcuchów obu typów. Przyczyna tego zjawiska musi leżeć także w różnicach między łańcuchami kappa oraz lambda.

Jedną z najbardziej znamienitych różnic między FLC typu kappa oraz lambda jest stosunek formy monomerycznej i dimerycznej charakteryzujący oba typy łańcuchów, szeroko dyskutowany we wcześniejszych rozdziałach pracy. Łańcuchy lekkie kappa w większości przypadków mają wyższy odsetek monomeru.

W niniejszej pracy, w celu wyjaśnienia mechanizmu powstawania zjawiska drabin wykonano szereg eksperymentów. Eksperymenty były wykonane na pojedynczym klonie łańcuchów lekkich (κ_{470AD}). Metodą preparatywnej chromatografii na żelach sieciujących (HP SEC), dokonano rozdziału formy dimerycznej i monomerycznej wybranego preparatu FLC typu kappa (ryc. 10). Wykazano, że za tworzenie drabin odpowiedzialna jest przede wszystkim forma monomeryczna FLC. Dla badanych łańcuchów kappa, które migrowały w systemie HRE w postaci czterech prążków, forma dimeryczna tworzyła jeden prążek drabiny, natomiast pozostałe trzy utworzone były przez formę monomeryczną (ryc. 38).

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, forma monomeryczna FLC jest wydzielana przez komórkę plazmatyczną dopiero wówczas, gdy do reszty sulfhydrylowej cysteiny w pozycji 214 zostanie przyłączona cząsteczka związku tiolowego [19]. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że za tworzenie drabin FLC odpowiada, dyskutowany w niniejszej pracy, ale wciąż mało poznany, proces tiolacji C-końcowej reszty cysteinyłowej. Zastosowanie związku mającego zdolność redukcji wiązań disiarczkowych, jak np. DTT czy TCEP powodowało zmianę sposobu migracji FLC – cztery prążki drabiny były redukowane do jednego prążka o większej intensywności (ryc. 33). Potwierdza to hipotezę o udziale związków tiolowych w powstawaniu drabiny z użytego w badaniach klonu łańcuchów lekkich. Podobny eksperyment wykonano w pracy Vladutiu i wsp. [92] W wyniku redukcji zaobserwowano zmniejszenie liczby prążków tworzących drabinę z monoklonalnych FLC, co sugeruje udział wiązań disiarczkowych w tworzeniu drabiny. Jednak nie wszystkie prążki drabiny uległy przekształceniu pod działaniem 2-merkaptoetanolu, inaczej niż w serii eksperymentów przeprowadzonych w niniejszej pracy. Można spekulować, że w opisywanym w pracy Vladutiu przypadku mechanizm powstawania drabin FLC był wieloczynnikowy. Oprócz wpływu związków tiolowych sprzężonych z cysteiną 214 wolnych łańcuchów lekkich na różnice w ładunkach cząsteczek FLC (a więc pojawienie kilku prążków w rozdziale elektroforetycznym), u podłoża zjawiska drabin w moczu pacjenta leżał jeszcze inny, niewyjaśniony mechanizm. We wspomnianym opisie przypadku autorzy jako pierwsi

sugerują udział modyfikacji posttranslacyjnych w mechanizmie leżącym u podstaw zjawiska drabin FLC, jednak nie rozwijają tej tezy. Należy wspomnieć, że w piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat możliwych modyfikacji wolnych łańcuchów lekkich, takich jak np. fragmentacja proteolityczna, która zmienia ładunek elektryczny cząsteczki białkowej [132].

Interpretując wyniki uzyskane w niniejszej pracy można wysunąć hipotezę, że w każdym z trzech pochodzących of formy monomerycznej prążków drabiny FLC do reszty sulfhydrylowej przyłączona jest cząsteczka innego związku tiolowego. Potwierdzają to eksperymenty, w których inkubowanie łańcuchów lekkich z cząsteczkami różnych związków tiolowych powodowało zmianę intensywności poszczególnych prążków drabiny (tabela 11). Wykazano, że reszty tiolowe można podmieniać stosując wysokie stężenia innego związku tiolowego. Zamiana reszty tiolowej związanej z C-końcową cysteiną powodowała zmianę ładunku formy cząsteczkowej łańcuchów i zmianę lokalizacji danego prążka na żelu, co manifestowało się zmianami w intensywnościach prążków białkowych drabiny. Podmiana reszty tiolowej zmieniała punkt izoelektryczny białka. Ponieważ grupy karboksylowe i aminowe różnych związków tiolowych mają różne stałe dysocjacji, stąd obserwowane na żelu wzajemne transformacje prążków. Zjawisko to najlepiej jest widoczne w eksperymencie z użyciem cysteaminy. Inkubacja w środowisku 1mM cysteaminy spowodowała wyraźne zmiany we wzorze migracji badanych FLC w systemie HRE. Intensywność frakcji 1-4 uległa znacznemu zmniejszeniu, natomiast pojawiła się dodatkowa frakcja (oznaczona jako frakcja 0; ryc. 34-5) obdarzona najsilniejszym ładunkiem dodatnim i migrująca w stronę ujemnej katody.

Reaktywność związków tiolowych zależy od pKa ich grupy sulfhydrylowej. Niższe wartości pKa świadczą o większej reaktywności związku. W pracy Di Simplicio i wsp. badano substytucję związków tiolowych na modelu albuminowym. Chromatograficzna analiza wysokości pików po inkubacji albuminy z mieszaniną związków tiolowych takich jak: cysteina, homocysteina oraz glutation, wskazała, że tiolacja wolnej reszty SH albuminy (pozycja 34) najłatwiej zachodzi dla cysteiny, później homocysteiny, a na końcu glutationu [143]. Informacja ta jest spójna z wartościami pKa grup sulfhydrylowych tych związków tiolowych. W przypadku cząsteczek łańcuchów lekkich, obok wymienionych tioli, cysteina 214 była jeszcze sprzężona z cysteinyloglicyną, dla której wartość pKa grupy sulfhydrylowej jest najniższa. Dlatego proces tiolacji białek z udziałem cysteinyloglicyny powinien zachodzić najłatwiej. Bardziej reaktywne drobnocząsteczkowe związki tiolowe (o niższym pKa grupy sulfhydrylowej) mogą wypierać z połączenia z siarką białkowej cysteiny reszty tiolowe o mniejszej reaktywności. Zależność ta doskonale jest widoczna dla cysteaminy, która jest związkiem bardzo reaktywnym. Reaktywność cysteaminy doskonale obrazuje zdolność tego związku do redukcji wiązania disiarczowego w cząsteczce cystyny (dimeru cysteiny), co wykorzystywane jest w leczeniu cystynozy i cystynurii [144].

pKa grupy sulfhydrylowej związku tiolowego nie jest jedynym czynnikiem, który wpływa na jego zdolność do tworzenia disiarczów z cząsteczkami białek. Istotne jest również pKa grupy sulfhydrylowej białkowej cysteiny zaangażowanej w tworzenie

mieszanego disiarczku (w przypadku FLC cysteina w pozycji 214). O pKa grupy sulfhydrylowej cysteiny w łańcuchu polipeptydowym białka decyduje m. in. sekwencja aminokwasowa poprzedzająca cysteinę. Cysteina 214 w cząsteczce łańcuchów lekkich znajduje się we fragmencie konserwatywnym. W większości dotychczas zbadanych przypadków, C-końcowa cysteina poprzedzona była aminokwasami o charakterze kwaśnym. Wydaje się to kluczowe dla procesu łączenia łańcucha lekkiego z łańcuchem ciężkim oraz uwalniania FLC poza komórkę plazmatyczną [19].

Jak wspomniano powyżej, o szybkości reakcji substytucji związku tiolowego, sprzężonego z grupą SH białkowej cysteiny decyduje pKa grupy sulfhydrylowej związku tiolowego biorącego udział w ataku nukleofilowym. Natomiast w warunkach dynamicznej równowagi na ostateczny wynik reakcji podstawienia wpływają również stężenia tioli obecnych w układzie. W eksperymentach wykonywanych w niniejszej pracy używano stężeń 1mM, które były wystarczające, aby spowodować zmiany w intensywnościach poszczególnych frakcji drabiny, nawet w przypadku glutationu, którego wartość pKa grupy sulfhydrylowej jest najwyższa. Stosując wzrastające stężenia glutationu uzyskano wzajemną konwersję frakcji stanowiących prążki drabiny, a intensywność „frakcji glutationowej” wzrastała wraz ze wzrastającym stężeniem glutationu w roztworze (ryc. 37). Wyniki konwersji prążków tworzących drabinę FLC są spójne z wynikami oznaczenia reszt tiolowych sprzężonych z cysteiną 214 metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Dwa główne prążki drabiny – prążek 2 oraz 3 najprawdopodobniej powstają na skutek sprzężenia cząsteczek FLC z cysteiną oraz cysteinyloglicyną - związkami tiolowymi, które zostały wykryte w tym preparacie. Dodanie cysteiny lub homocysteiny wzmacnia intensywność prążka 2, potwierdzając opisaną wyżej tezę. Natomiast dodanie glutationu wzmacnia intensywność prążka 3. Można przypuszczać, że ruchliwości elektroforetyczne FLC podstawionych cysteinyloglicyną oraz glutationem są zbliżone, stąd obserwowany schemat konwersji prążka 3. Intensywność prążka 4 nie zmienia się w reakcji podstawiania cysteiny 214 przy użyciu cysteiny, homocysteiny oraz glutationu. Jednak na skutek redukcji drabiny za pomocą silnych reduktorów, także prążek 4 ulega konwersji. Być może związane jest to z faktem, że grupa SH cysteiny 214 została utleniona do jednej z wielu możliwych utlenionych form cysteiny (np. kwasu sulfenowego lub kwasu sulfinowego).

Obok łańcuchów κ470AD, reakcjom z mieszaniną związków tiolowych poddano dodatkowo 3 klony łańcuchów lekkich – 2 typu kappa, występujące w postaci dimeru oraz monomeru (przy czym monomer stanowił >50%) oraz 1 typu lambda, występujący jedynie w postaci dimeru (ryc. 40). Elektroforetyczny wzór migracji klonów ze znacznym odsetkiem monomeru uległ zmianie pod wpływem inkubacji ze związkami tiolowymi. W wyniku inkubacji preparatu łańcuchów lekkich z mieszaniną różnych związków tiolowych udało się uzyskać drabinę także dla łańcuchów typu kappa migrującego wcześniej w postaci jednego prążka. Natomiast dimeryczna forma łańcuchów lekkich lambda nie ulegała tiolacji. Nawet inkubacja z cysteaminą nie powodowała zmiany wzoru migracji występujących w postaci dimeru łańcuchów lekkich lambda. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy oraz nieliczne dane

z piśmiennictwa wskazują, że zjawisko drabin związane jest przede wszystkim z łańcuchami lekkimi typu kappa. FLC typu lambda występują głównie w postaci dimeru (mediana procentowego udziału dimerycznej formy łańcuchów lekkich lambda wynosi 100%), w którym końcowa cysteina jest zaangażowana w tworzenie wewnątrzcząsteczkowego mostka disiarczkowego. Mniejsza częstość występowania drabin z łańcuchów lambda potwierdza przedstawioną w pracy hipotezę, że za zjawisko drabin odpowiada heterogenna tiolacja monomeru łańcucha lekkiego. Nieliczne przypadki występowania drabin dla łańcuchów lekkich typu lambda mogą być związane z rzadkimi przypadkami monomerycznych form łańcuchów tego typu lub tiolacją w obrębie wewnątrzłańcuchowych cystein spinających dwie główne domeny białkowe łańcuchów [116].

Eksperymenty dotyczące ilościowego oznaczania związków tiolowych sprzężonych z FLC wykazały, że formy monomeryczne FLC zawsze są związane ze związkiem tiolowym. W przypadku większości badanych w niniejszej pracy klonów łańcuchów lekkich wykazano obecność czterech związków tiolowych: cysteiny, homocysteiny, cysteinyloglicyny oraz glutationu. Profil tiolacji dla badanych łańcuchów był zbliżony. Głównym związkiem tiolowym była cysteina (mediana=84.51%); względne stężenia cysteinyloglicyny oraz homocysteiny były zbliżone (mediany odpowiednio: 6.80%, 6.52%); natomiast względne stężenie glutationu było najniższe (mediana = 0.87%). Nie zaobserwowano różnic w profilu tiolowym pomiędzy łańcuchami lekkimi kappa oraz lambda. Jednocześnie wykazano, że dominującą formą cząsteczkową FLC typu kappa jest forma monomeryczna. Można by się więc spodziewać, że zjawisko drabin będzie występować w większości rozdzielów elektroforetycznych monoklonalnych FLC typu kappa. Jednak analizując częstość występowania drabin stwierdzono, że zjawisko to dotyczy 22% łańcuchów lekkich kappa. Przyczyną tych różnic może być fakt, że o rozdziale elektroforetycznym poszczególnych frakcji białkowych na podłożach niesieciujących decyduje kilka czynników, wśród których najważniejszy jest punkt izoelektryczny białka (różny dla różnych klonów łańcuchów lekkich) oraz własności buforów separujących (pH). W niniejszej pracy, w przypadku najintensywniej badanego klonu FLC kappa (κ 470AD), zjawisko drabin było obserwowane na agarozowych żelach wysokorozdzielczych firm Sebia oraz Ciba Corning. Różnice w pH buforu komorowego w systemach obu firm (7.4 vs 8.7) spowodowały nieco odmienny sposób rozdzielu frakcji białkowych. W systemie firmy Sebia obserwowano drabinę składającą się z 3 prążków. Frakcja 1 oraz 2, rozdzielane w systemie firmy Ciba Corning, migrowały w postaci jednego prążka. W standardowych (innych niż system elektroforezy wysokorozdzielczej) systemach agarozowych klon κ 470AD migrował w postaci jednego prążka. Prawdopodobnie stosując inne warunki rozdzielu udałoby się uzyskać drabinę we wszystkich analizowanych przypadkach FLC występujących w formie monomerycznej (w większości typu kappa). Różnice w wartościach punktu izoelektrycznego białek mają również wpływ na położenie białka na żelach poliakrylamidowych w systemie elektroforezy natywnej. Analizowany klon łańcuchów lekkich w elektroforezie natywnej na podłożu sieciującym migruje w postaci 4 prążków, analogicznych do drabiny w systemie HRE (ryc. 36).

Tiolacja cysteiny²¹⁴ w cząsteczkach FLC powoduje zmiany punktu izoelektrycznego tych białek. Punkt izoelektryczny łańcuchów lekkich może mieścić się w bardzo szerokich granicach (3.5 – 9.5). Istnieje szereg doniesień, w których szukano zależności między charakterem białka Bence-Jonesa (kwaśne/zasadowe), a jego własnościami fizjologicznymi. W piśmiennictwie łączono wartość punktu izoelektrycznego łańcuchów lekkich z ich nefrotoksycznością. Pojawienie się białka Bence-Jonesa w moczu zwykle wiąże się z upośledzeniem funkcji nerek. Jednak dynamika rozwoju uszkodzenia nerek jest trudna do przewidzenia. W niektórych przypadkach proces ten postępuje bardzo szybko, a są też pacjenci, którzy przez wiele lat wydalają znaczne ilości wolnych łańcuchów lekkich z moczem, lecz nie towarzyszy temu znaczne pogorszenie funkcji nerek. Chociaż przyczyna upośledzenia tego narządu jest złożona – hiperkalcemia towarzysząca gammopatiom monoklonalnym oraz leki stosowane w tej grupie chorób przyczyniają się do uszkodzenia nerek, istnieje szereg doniesień na temat nefrotoksyczności samych łańcuchów lekkich [^{48,50,105}]. Coward i wsp. wykazali silną korelację pomiędzy wysokimi wartościami pI białka Bence-Jonesa a zmniejszonym klirensem kreatyniny u pacjentów, sugerując przydatność oszacowania pI wolnych łańcuchów lekkich wydalanych do moczu w przewidywaniu postępu uszkodzenia nerek [¹⁴⁵]. Spostrzeżenie to zostało potwierdzone przez zespół Johnsa [¹⁴⁶]. Uszkodzenie cewek nerkowych, za miarę którego przyjęto stężenie α -1 mikroglobuliny w moczu, korelowało z wysokimi wartościami pI wydalanego białka Bence-Jonesa, chociaż w tym przypadku nie zaobserwowano korelacji z klirensem kreatyniny. Odmienne wyniki badań dotyczących biologicznego znaczenia punktu izoelektrycznego FLC opublikowano w pracy Richardsa, gdzie również nie wykryto korelacji między pI wolnych łańcuchów a klirensem kreatyniny i zanegowano związek pomiędzy pI białka Bence-Jonesa oraz ich nefrotoksycznością [¹⁴⁷]. Problem związku pomiędzy punktem izoelektrycznym białka Bence-Jonesa i jego zdolnością do upośledzenia czynności nerek dyskutowano również w pracy Gallii i wsp. [¹⁰⁵]. Nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy średnią wartością pI łańcuchów lekkich izolowanych z moczu pacjentów z uszkodzeniem nerek oraz bez uszkodzenia nerek. Jednak wartości pI białka Bence-Jonesa znacznej grupy pacjentów z uszkodzeniem nerek były > 6, co potwierdza teorię Cowarda oraz Jonesa o większej toksyczności łańcuchów, które charakteryzują wyższe wartości pI. Badania nad nefrotoksycznością białka Bence-Jonesa w zależności od jego właściwości fizykochemicznych prowadzono także w zespole Sandersa [^{46,47,148}]. Chociaż na modelu szczurzym nie udało się potwierdzić związku pomiędzy punktem izoelektrycznym wolnych łańcuchów lekkich, a ich toksycznym wpływem na komórki cewek proksymalnych, zauważono, że białko Bence-Jonesa o punkcie izoelektrycznym < 7.4 precypituje w części dystalnej nefronu tworząc wałeczki szkliste. Z obecnością zwiększonej ilości wałeczków wydalanych z moczem wiąże się możliwość wystąpienia nefropatii wałeczkowej. Na skutek upośledzenia przepływu moczu, dochodzi do pojawienia się odczynu zapalnego w tkance okołocewkowej wokół wałeczka i następnej destrukcji cewki oraz jej otoczenia, co prowadzi do powstania tzw. nerki szpiczakowej [⁴²].

Istnieją również prace dotyczące związku między punktem izoelektrycznym białka Bence-Jonesa i jego amyloidogennością. W pracy Bellotiego [¹⁴⁹] średni punkt izoelektryczny łańcuchów amyloidogennych wynosił 4.8 i był niższy w porównaniu do łańcuchów nie tworzących złogów, których średni punkt izoelektryczny wynosił 6.2. Jednak Kaplan i wsp. nie potwierdzili powyższych spostrzeżeń. Otrzymane wartości pI monoklonalnych FLC były specyficzne dla konkretnego klonu łańcuchów i wahały się w granicach 5.5 – 8.0 dla pacjentów z amyloidozą oraz 6.7 – 8.1 dla pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Zakresy te znacznie się pokrywały, dlatego na podstawie wyników powyższej pracy nie można wysunąć wniosku o wpływie wartości pI na tendencję do tworzenia złogów białkowych.

W piśmiennictwie dotyczącym zjawiska drabin łańcuchów lekkich, zjawisko to opisywane jest jedynie w kontekście analizy próbek moczu. W pracy Harrisa i wsp. przebadano ok. 3000 surowic pod kątem obecności drabiny i nie zaobserwowano ani jednego przypadku występowania drabiny FLC. Tłumaczono to niewielkim stężeniem wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, których obecność jest maskowana przez poliklonalne immunoglobuliny występujące w znacznie większym stężeniu [⁹⁰]. W niniejszej pracy podstawowym badanym materiałem był mocz. Jednak dla 2 przypadków zebrano zarówno mocz jak i surowicę pacjentów. W pierwszym przypadku w rozdzielaczach w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej obserwowano drabinę zarówno w surowicy jak i w moczu. W drugim przypadku zjawisko drabin widoczne było jedynie w rozdzielaczach surowicy. Znamienne jest również, że drabiny z surowicy oraz moczu pierwszego pacjenta różniły się nieco lokalizacją prążków oraz ich intensywnością (ryc. 42). Jedną z możliwych interpretacji tego zjawiska jest wpływ środowiska, jakim jest mocz, na zjawisko drabin, chociaż dokładne wyjaśnienie przedstawionych niespójności wymagałoby bardziej wnikliwych badań.

Podsumowując, zjawisko drabin wolnych łańcuchów lekkich spowodowane jest heterogenną tiolacją końcowej reszty cysteinyłowej łańcuchów lekkich, która w kompletnej cząsteczce immunoglobuliny jest zaangażowana w tworzenie wiązania z łańcuchem ciężkim. Tiolacja wpływa na punkt izoelektryczny białka, a zmodyfikowane łańcuchy w niektórych systemach elektroforetycznych dają charakterystyczny układ prążków zwanych drabinami. W pracy badano mechanizm powstawania drabin i określono częstość występowania tego zjawiska w systemie elektroforezy wysokorozdzielczej. Proces heterogennej tiolacji białek i związane z nim zmiany punktu izoelektrycznego poszczególnych form łańcuchów lekkich jest mało poznany. Określenie jego znaczenia fizjologicznego wymaga dalszych obserwacji i badań.

6 Wnioski

- Obecne w moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną wolne łańcuchy lekkie występują w formie monomeru i kowalencyjnego dimeru. Badany metodą SDS elektroforezy procentowy udział kowalencyjnego dimeru wyraźnie zależy od typu łańcucha. Stosunek dimer/monomer dla FLC typu kappa waha się w szerokich granicach, jednak u 75% pacjentów z łańcuchami typu kappa monomer był formą dominującą. FLC typu lambda najczęściej występują jedynie w formie dimerycznej (mediana odsetka dimeru 100%). Przypadki, gdzie odsetek dimeru stanowi < 50% są bardzo rzadkie (2/70).
- Stosunek dimer/monomer jest cechą charakterystyczną dla chorego. Wartość odsetka dimeru FLC typu lambda oraz monomeru FLC typu kappa u konkretnego chorego nie zmienia się w czasie trwania choroby.
- W warunkach zbliżonych do fizjologicznych łańcuchy lekkie mogą występować w formie niekowalencyjnych oligomerów o masach cząsteczkowych wyższych niż masa dimeru. Przy użyciu metod chromatograficznych zaobserwowano występowanie form oligomerycznych w 50% badanych przypadków. We wszystkich analizowanych przypadkach udział form oligomerycznych był niewielki. Nie zaobserwowano różnic w częstości tworzenia niekowalencyjnych form oligomerycznych łańcuchów lekkich pomiędzy FLC typu kappa oraz lambda.
- Masa cząsteczkowa monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin wyznaczona za pomocą elektroforezy SDS-PAGE charakteryzuje się zmiennością 6.14%. Zmienność ta może być związana z fizjologiczną różnorodnością pierwszorzędowej struktury tego białka, fragmentacją cząsteczek FLC lub ich modyfikacjami posttranslacyjnymi.
- Łańcuchy lekkie immunoglobulin są intensywnie tiolowane, przy czym tiolacja dotyczy głównie łańcuchów typu kappa. Łańcuchy lekkie mogą tworzyć mieszane disiarczki z: cysteiną, cysteinyloglicyną, homocysteiną oraz glutationem. Głównym drobnocząsteczkowym związkiem tiolowym, z którym są sprzęgnięte cząsteczki FLC, jest cysteina. Miejscem przyłączenia drobnocząsteczkowych związków tiolowych jest najprawdopodobniej cysteina w pozycji 214, na co wskazuje silna korelacja pomiędzy odsetkiem monomeru a całkowitym stężeniem związków tiolowych. Profil związków tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi jest taki sam dla FLC typu kappa oraz lambda i różni się od profilu tiolacji łańcuchów poliklonalnych. Monoklonalne FLC w porównaniu do łańcuchów poliklonalnych zawierają ok. 4 razy więcej cysteinyloglicyny.
- Występowanie kilku form FLC, widocznych w wysokorozdzielczej elektroforezie agarozowej jako tzw. drabiny, jest związane z tiolacją cząsteczek łańcuchów. Proces tiolacji zmienia własności fizykochemiczne cząsteczek FLC (punkt izoelektryczny).

7 Streszczenie

W naukach medycznych badania nad łańcuchami lekkimi mają charakter interdyscyplinarny. Informacje na temat własności fizykochemicznych, metabolizmu oraz zakresów stężeń wolnych łańcuchów lekkich są istotne dla postępu w zakresie diagnostyki oraz monitorowania leczenia pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi oraz nefrologicznymi. Szczególne własności cząsteczek FLC, są odpowiedzialne za tworzenie agregatów białkowych w chorobach takich jak LCDD, amyloidoza AL, nefropatia wałeczkowa, dając u pacjentów szerokie spektrum objawów: kardiologicznych, nefrologicznych, neurologicznych i innych. Amyloidogenne łańcuchy lekkie są interesującym modelem do badań nad procesami agregacji białek – ich dynamiką oraz czynnikami wpływającymi na zdolność cząsteczek do tworzenia białkowych oligomerów.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki dotyczące występowania różnych form molekularnych łańcuchów lekkich immunoglobulin wyekstrahowanych z moczu pacjentów z różnymi chorobami z grupy gammapatii monoklonalnych.

Pośród form, w jakich występują FLC, przede wszystkim należy wymienić formę monomeryczną oraz kowalencyjny dimer. W niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano profil dimer/monomer dla obu typów FLC na dużej grupie pacjentów. Przebadano 163 pacjentów - 93 z FLC typu kappa i 70 typu lambda. Odsetkowa zawartość dimeru i monomeru była wyraźnie różna dla łańcuchów typu kappa i lambda. Mediany odsetka dimeru dla FLC lambda oraz kappa wynoszą odpowiednio: 100% oraz 33.22%. O ile FLC lambda występują głównie w formie dimerycznej to dla FLC kappa odsetek dimeru jest bardzo zróżnicowany. W grupie FLC lambda odsetek dimeru <50% zaobserwowano jedynie dla 2.86% przypadków, natomiast dla FLC kappa odsetek dimeru >50% występował u 29% pacjentów.

Przyczyny, dla których FLC lambda wykazują większą zdolność do dimeryzacji w stosunku do FLC kappa nie są znane. Dane z piśmiennictwa wskazują, że dimeryczna forma FLC bierze udział w patogenezie AL amyloidozy, jest związana z występowaniem manifestacji nerkowych w przebiegu szpiczaka mnogiego i gorszymi rokowaniami dla pacjenta.

W pracy wykazano także, że odsetek dimer/monomer FLC jest cechą charakterystyczną dla pacjenta. Dokonano retrospektywnej analizy odsetka dimeru/monomeru łańcuchów lekkich immunoglobulin. Dowiedziono, że u określonego pacjenta profil dimer/monomer jest niezmienny w czasie. Wartość odsetka dimeru dla FLC lambda oraz odsetka monomeru dla FLC kappa oscyluje w wąskich granicach wokół wartości średniej i nie zmienia się w trakcie przebiegu choroby.

Wykazano, że masa cząsteczkowa łańcuchów lekkich immunoglobulin wyznaczona za pomocą tej metody charakteryzuje się zmiennością wynoszącą 7.64% dla formy dimerycznej oraz 6.14% dla formy monomerycznej. Zmienność ta może być związana z fizjologiczną zmiennością pierwszorzędowej struktury tego białka, fragmentacją cząsteczek FLC lub ich modyfikacjami posttranslacyjnymi.

Za pomocą techniki chromatografii na żelach sieciujących badano także obecność niekowalencyjnych oligomerów łańcuchów lekkich. Białkowe cząsteczki były rozdzielane w oparciu o ich masy cząsteczkowe, warunki rozdziału natomiast nie zaburzały hydrofobowych oddziaływań między rozdzielanymi cząsteczkami. Obecność oligomerycznych form FLC wykryto w 50% badanych przypadków. We wszystkich analizowanych przypadkach udział form oligomerycznych był niewielki.

W pracy wykazano, że łańcuchy lekkie są intensywnie tiolowane, chociaż tiolacja dotyczy przede wszystkim FLC kappa. Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazano, że z łańcuchami lekkimi są sprzężone cząsteczki: cysteiny, cysteinyloglicyny, homocysteiny i glutationu. Głównym drobnocząsteczkowym tiolem tworzącym mieszane disiarczki z cząsteczką łańcuchów lekkich jest cysteina. Procentowy udział cysteiny w tworzeniu mieszanych disiarczków z cząsteczkami FLC wynosił 84.5%. Silna korelacja pomiędzy odsetkiem monomeru [%] a całkowitym stężeniem związków tiolowych [nM/mg białka] wskazuje, że miejscem przyłączenia związku tiolowego do cząsteczki FLC jest cysteina w pozycji 214. Profil związków tiolowych sprzężonych z łańcuchami lekkimi nie zależy od typu łańcuchów, jest natomiast odmienny dla łańcuchów monoklonalnych i poliklonalnych. Względne stężenie cysteinyloglicyny (%), stosunek stężenia cysteinyloglicyny do całkowitego stężenia związków tiolowych sprzężonych z FLC) odróżnia łańcuchy monoklonalne od poliklonalnych. Monoklonalne FLC w porównaniu do łańcuchów poliklonalnych zawierają ok. 4 razy więcej cysteinyloglicyny (odpowiednio 6.8% vs 1.53%).

W pracy wykazano, że zjawisko drabin łańcuchów lekkich, które do tej pory wiązane było głównie z poliklonalnymi FLC, dotyczy także łańcuchów monoklonalnych, choć nie jest zjawiskiem częstym. Dowiedziono, że występowanie kilku rozdzielanych za pomocą wysokorozdzielczej elektroforezy agarozowej, form FLC jest związane z tiolacją cząsteczek łańcuchów. Poszczególne formy tworzące drabinę, poddane działaniu drobnocząsteczkowych związków tiolowych, mogą ulegać wzajemnym przekształceniom. Przedstawione wyniki dowodzą, że proces tiolacji zmienia własności fizykochemiczne cząsteczek FLC (punkt izoelektryczny). Zjawisko to może być kolejnym elementem wpływającym na procesy agregacji cząsteczek monoklonalnych łańcuchów lekkich.

Monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin stanowią heterogenną grupę białek. Zmienne proporcje monomeru i dimeru wpływają na proces S - tiolacji, który zmienia punkt izoelektryczny białka. Kliniczne znaczenie opisanych w pracy własności wolnych łańcuchów lekkich wymaga dalszych badań.

8 Summary

In medical sciences investigations of free light chains are interdisciplinary. Information concerning physicochemical properties, metabolism and reference ranges of free light chains are important for diagnostics and therapeutic monitoring of patients with hematological and nephrological disorders. Particular properties of FLC have influence on the formation of protein aggregates in protein deposition diseases (LCDD, AL, cast nephropathy and others) giving wide spectrum of symptoms: cardiological, nephrological, neurological and others. Amyloidogenic free light chains are an interesting model to study protein aggregation process, its dynamics and factors influencing the formation of protein oligomers.

In this paper the basic study concerning molecular forms of immunoglobulin free light chains isolated from the urine of patients with different presentations of monoclonal gammopathy are presented.

Monomer and joined by disulphide bond dimer are most important forms of FLCs. In this paper profile of dimer/monomer was investigated on numerous group of 163 patients – 93 FLCs kappa and 70 lambda. Percentage contributions of dimeric and monomeric forms are different for both types of FLC. Median value of dimeric form for lambda and kappa are respectively 100% and 33,22% . In a group of lambda FLCs percentage of dimers <50% was observed only in 2.86% while in a group of kappa FLCs dimeric content >50% was observed in 29% patients. FLC of lambda type exist mainly as dimers while a percentage value of dimers for kappa light chains is widely distributed. The reasons while lambda FLCs display higher tendency for dimerization are not known. Literature data indicate that dimeric form of FLCs are involved in pathogenesis of amyloidosis and are considered as a worse prognostic factor.

The data indicating that dimer/monomer ratio is characteristic for the patient and does not change during progression of the disease was presented.

Molecular mass of FLCs determined by SDS electrophoresis is characterized by relative high variability of 7.64% and 6.14% - for dimeric and monomeric form respectively. This variability may be a consequence of natural fluctuations in the primary structure of polypeptide chain, their fragmentation or posttranslational modifications.

Occurrences of noncovalent oligomers of FLCs were investigated using size exclusion chromatography in conditions not interfering with formation of hydrophobic interactions. Occurrences of oligomeric forms of FLCs were detected in 50% of investigated samples however their concentration was relatively low.

FLCs (predominantly kappa) are extensively thiolated. Using HPLC techniques cysteine was proved to be a main low molecular thiole forming mixed disulphides with FLC (84.5 % of total bound thiols). The hypothesis that low molecular thiols are bound to C-terminal cysteine moiety was supported by strong correlation between FLC's monomer percentage and total concentration of thiols bound to protein. Relative concentration of

bound thiols is independent of FLC's type but differs between monoclonal and polyclonal FLCs. Relative concentration of bound cysteinylglycine is four times higher for monoclonal FLCs as compared to polyclonal (6.8 vs. 1.53 respectively).

FLCs ladder phenomenon is usually demonstrated in polyclonal samples. In this paper presence of this phenomenon was demonstrated also for monoclonal FLCs. Existence of uniformly separated protein bands on high resolution electrophoretic separations may be explained by heterogeneous protein thiolation. Particular protein bands may be interconverted by influence of low molecular weight thiols. Thiolation of the protein particles changes their physicochemical properties (isoelectric point) possibly affecting tendency to aggregation.

In conclusion - immunoglobulin free light chains comprise heterogeneous group of proteins. Variable monomer/dimer ratio affects S-thiolation of terminal cysteine moiety changing electric charge of protein. Clinical significance of this process requires further investigation.

9 Piśmiennictwo

- ¹http://myeloma.org/pdfs/CR2003_Polish.pdf - Brian GM, Durie, MD.: *Concise Review of the Disease and Treatment Options*. POLISH EDITION 2003, tł.: dr Artur Jurczyszyn
- ²Kyle RA., Rajkumar SV.: *Multiple myeloma*. Blood. 2008; 111(6): 2962-2972.
- ³Bence Jones H.: *Papers on chemical pathology: lecture III*. Lancet 1847;ii: 88-92.
- ⁴Edelman GM, Gally JA.: *The nature of Bence Jones proteins: chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal 7-globulins*. J. Exp. Med. 1962; 116 (2): 207-227.
- ⁵Roitt I, Brostoff J, Male D.: *Immunology. Sixth Edition*. Mosby, Edinburgh London New York Philadelphia St Luis Sydney Toronto 2001: 78-85.
- ⁶Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K.: *Cellular origin of human B-cell lymphomas*. N. Engl. J. Med. 1999; 341(20): 1520-1529.
- ⁷Van der Veecken J, Redegeld FA.: *Immunoglobulin Free Light Chains in Immune Responses*. Curr. Immunol. Rev.2008; 4(2): 88-100.
- ⁸Wang L, Young DC.: *Suppression of polyclonal immunoglobulin production by M-proteins shows isotype specificity*. Ann. Clin. Lab. Sci. 2001; 31(3): 274-278.
- ⁹Jakóbiński M.: *Imunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998: 70-83.
- ¹⁰Attaelmannan M, Levinson SS.: *Understanding and identifying monoclonal gammopathies*. Clin. Chem. 2000; 46(8): 1230-1238.
- ¹¹Levinson SS, Keren DF.: *Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis*. Clin. Chem. 1994; 40(10): 1869-1878.
- ¹²Nakano T, Matsui M, Inoue I, Awata T, Katayama S, Murakoshi T.: *Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases*. Clin Chim. Acta. 2011; 412(11-12): 843-849.
- ¹³Klein F, Feldhahn N, Mooster JL.: *Tracing the pre-B to immature B cell transition in human leukemia cells reveals a coordinated sequence of primary and secondary IGK gene rearrangement, IGK deletion, and IGL gene rearrangement*. J. Immunol. 2005; 174(1): 367-375.
- ¹⁴Brewer JW, Corley RB.: *Quality control in protein biogenesis: thiol-mediated retention monitors the redox state of proteins in the endoplasmic reticulum*. J. Cell. Sci. 1996; 109(9): 2383-2392.
- ¹⁵Skowronek MH, Hendershot LM, Haas IG.: *The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP*. Proc. Natl. Acad Sci. 1998; 95(4): 1574-1578.
- ¹⁶Knittler MR, Dirks S, Haas IG.: *Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: Quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with*

partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995; 92(5): 1764-1768.

¹⁷Pepe VH, Sonenshein GE, Yoshimura MI, Shulman MJ.: *Gene transfer of Immunoglobulin light chain restores heavy chain secretion.* J. Immunol. 1986; 137(7): 2367-2372.

¹⁸Anelli T, Alessio M, Bachi A, Bergamelli L, Bertoli G, Camerini S, Mezghrani A, Ruffato E, Simmen T, Sitia R.: *Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp 44.* EMBO J. 2003; 22(19): 5015–5022.

¹⁹Leitzgen K, Knittler MR, Haas IG.: *Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding.* J. Biol. Chem. 1997; 272(5): 3117-3123.

²⁰Alberini, CM, Bet P, Milstein C, Sitia R.: *Secretion of immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents.* Nature. 1990; 347(6292): 485–487.

²¹Reddy P, Sparvolil A, Fagiolil C, Fassina G, Sital R.: *Formation of reversible disulfide bonds with the protein matrix of the endoplasmic reticulum correlates with the retention of unassembled Ig light chains.* EMBO J. 1996; 15(9): 2077-2085.

²²Ambrosino DM, Kanchana MV, Delaney NR, Finberg RW.: *Human B cells secrete predominantly lambda L chains in the absence of H chain expression.* J. Immunol. 1991; 146(2): 599–602.

²³Liu H, May K.: *Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function.* MAbs. 2012; 4(1): 17-23.

²⁴Li M, Balamuthusamy S, Simon EE, Batuman V.: *Silencing megalin and cubilin genes inhibits myeloma light chain endocytosis and ameliorates toxicity in human renal proximal tubule epithelial cells.* Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2008; 295(1): F82-90.

²⁵Bradwell AR.: *Serum free light chain analysis.* Fifth edition. 2008 A.R. Bradwell

²⁶Pratt G.: *The evolving use of serum free light chain assays in haematology.* Br. J. Haematol. 2008; 141(4): 413-422.

²⁷Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, Tsaftaris A, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Davi F, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K, Belessi C.: *Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia.* Blood. 2000; 113(2): 403-411.

²⁸Sun M, Li L, Gao QS, Paul S.: *Antigen recognition by an antibody light chain.* Biol. Chem. 1994; 269(1): 734-738.

²⁹Davies DR, Padlan EA, Sheriff S.: *Antibody-antigen complexes.* Annu. Rev. Biochem. 1990; 59: 439-473.

³⁰Sun M, Gao QS, Li L, Paul S.: *Proteolytic activity of an antibody light chain.* J. Immunol. 1994; 153 (11): 5121-5126.

-
- ³¹Jokiranta TS, Solomon A, Pangburn MK, Zipfel PF, Meri S.: *Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H*. J. Immunol. 1999; 163(8): 4590-4596.
- ³²Manikkan AT.: *Factor X deficiency: an uncommon presentation of AL amyloidosis*. Ups. J. Med. Sci. 2012; 117(4): 457-459.
- ³³Röcken M, Hültner L.: *Heavy functions for light chains*. Nat. Med. 2002; 8(7): 668-670.
- ³⁴Kraneveld AD, Kool M, van Houwelingen AH, Roholl P, Solomon A, Postma DS, Nijkamp FP, Redegeld FA.: *Elicitation of allergic asthma by immunoglobulin free light chains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102(5): 1578– 1583.
- ³⁵Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS.: *Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy?* J. Neuroimmunol. 2002; 131(1-2): 5-20.
- ³⁶Harris VK, Sadiq SA.: *Disease Biomarkers in Multiple Sclerosis. Potential for Use in Therapeutic Decision Making*. Mol. Diagn. Ther. 2009; 13(4): 225-244.
- ³⁷Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, Bayer P, Hübl W.: *Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis*. J. Neurol. 2008; 255(10): 1508-1514.
- ³⁸Kaplan B, Livneh A, Sela BA.: *Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases*. Scientific World Journal. 2011; 22(11): 726-735.
- ³⁹Thio M, Blokhuis BR, Nijkamp FP, Redegeld FA.: *Free immunoglobulin light chains: a novel target in the therapy of inflammatory diseases*. Trends Pharmacol. Sci. 2008; 29(4): 170-174.
- ⁴⁰Cohen G, Hörl WH.: *Free immunoglobulin light chains as a risk factor in renal and extrarenal complications*. Semin. Dial. 2009; 22(4): 369-372.
- ⁴¹Charafeddine KM, Jabbour MN, Kadi RH, Daher RT.: *Extended Use of Serum Free Light Chain as a Biomarker in Lymphoproliferative Disorders: A Comprehensive Review*. Am. J. Clin. Pathol. 2012; 137(6): 890-897.
- ⁴²Jurczyszyn A, Skotnicki AB.: *Szpiczak mnogi – kompleksowa diagnostyka i terapia*. Górnicki, Wydawnictwo Medyczne. Wrocław 2010: 55-69.
- ⁴³Huang ZQ, Sanders PW.: *Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein*. J. Clin. Invest. 1997; 99(4): 732-736.
- ⁴⁴Ying WZ, Sanders PW.: *Mapping the binding domain of immunoglobulin light chains for Tamm-Horsfall protein*. Am. J. Pathol. 2001; 158(5): 1859-1866.
- ⁴⁵Cockwell P, Hutchison CA.: *Management options for cast nephropathy in multiple myeloma*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2010; 19(6): 550-555.
- ⁴⁶Sanders PW.: *Pathogenesis and treatment of myeloma kidney*. J. Lab. Clin. Med. 1994; 124(4): 484-488.
- ⁴⁷Sanders PW, Booker BB, Bishop JB, Cheung HC.: *Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins*. J. Clin. Invest. 1990; 85(2): 570-576.

-
- ⁴⁸Kapur U, Barton K, Fresco R, Leehey DJ, Picken MM.: *Expanding the pathologic spectrum of immunoglobulin light chain proximal tubulopathy*. Arch. Pathol. Lab. Med. 2007; 131(9): 1368-1372.
- ⁴⁹Sirac C, Bridoux F, Carrion C, Devuyst O, Fernandez B, Goujon JM, El Hamel C, Aldigier JC, Touchard G, Cogné M.: *Role of the monoclonal kappa chain V domain and reversibility of renal damage in a transgenic model of acquired Fanconi syndrome*. Blood. 2006; 108(2): 536-543.
- ⁵⁰El Hamel C, Thierry A, Trouillas P, Bridoux F, Carrion C, Quellard N, Goujon JM, Aldigier JC, Gombert JM, Cogné M, Touchard G.: *Crystal-storing histiocytosis with renal Fanconi syndrome: pathological and molecular characteristics compared with classical myeloma-associated Fanconi syndrome*. Nephrol. Dial. Transplant. 2010; 25(9): 2982-2990.
- ⁵¹El Hamel C, Aldigier JC, Oblet C, Laffleur B, Bridoux F, Cogné M.: *Specific impairment of proximal tubular cell proliferation by a monoclonal κ light chain responsible for Fanconi syndrome*. Nephrol. Dial. Transplant. 2012; 27(12): 4368-4377.
- ⁵²Merlini G, Seldin DC, Gertz MA.: *Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options*. J. Clin. Oncol. 2011; 29(14): 1924-1933.
- ⁵³Stevens FJ, Myatt EA, Chang CH, Westholm FA, Eulitz M, Weiss DT, Murphy C, Solomon A, Schiffer M.: *A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains*. Biochem. 1995; 34(34): 10697–10702.
- ⁵⁴Palladini G, Barassi A, Klersy C.: *The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis*. Blood. 2010; 116(18): 3426-3430.
- ⁵⁵Kyle RA, Linos A, Beard CM: *Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989*. Blood. 1992; 79(7): 1817-1822.
- ⁵⁶Desport E, Bridoux F, Sirac C, Delbes S, Bender S, Fernandez B, Quellard N, Lacombe C, Goujon JM, Lavergne D, Abraham J, Touchard G, Fermand JP, Jaccard A.: *AL Amyloidosis*. Orphanet J. Rare Dis. 2012; 7(1): 54.
- ⁵⁷Solomon A, Weiss DT, Pepys MB.: *Induction in mice of human light-chain-associated amyloidosis*. Am. J. Pathol. 1992; 140(3): 629-637.
- ⁵⁸Sancharawala V.: *Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment*. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2006; 1(6): 1331-1341.
- ⁵⁹Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kyle RA, Gertz MA, Fonseca R.: *Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL)*. Blood. 2003; 101(10): 3801-3808.
- ⁶⁰Gertz MA: *Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on*

Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. Am. J. Hematol. 2005; 79(4): 319-328.

⁶¹Picken MM, Frangione B, Barlogie B, Luna M, Gallo G.: *Light chain deposition disease derived from the kappa I light chain subgroup. Biochemical characterization*. Am. J. Pathol. 1989; 134(4): 749-754.

⁶²Jimenez-Zepeda VH.: *Light chain deposition disease: novel biological insights and treatment advances*. Int. J. Lab. Hematol. 2012; 34(4): 347-355.

⁶³Lin J, Markowitz GS, Valeri AM, Kambham N, Sherman WH, Appel GB, D'Agati VD.: *Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: the disease spectrum*. J. Am. Soc. Nephrol. 2001; 12(7): 1482-1492.

⁶⁴Ronco P, Plaisier E, Mougenot B, Aucouturier P.: *Immunoglobulin light (heavy)-chain deposition disease: from molecular medicine to pathophysiology-driven therapy*. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2006; 1(6): 1342-1350.

⁶⁵Korbet SM, Schwartz MM.: *Multiple myeloma*. J. Am. Soc. Nephrol. 2006; 17(9): 2533-2545.

⁶⁶Herrera GA, Russell WJ, Isaac J, Turbat-Herrera EA, Tagouri YM, Sanders PW, Picken MM, Dempsey S.: *Glomerulopathic light chain-mesangial cell interactions modulate in vitro extracellular matrix remodeling and reproduce mesangiopathic findings documented in vivo*. Ultrastruct. Pathol. 1999; 23(2): 107-126.

⁶⁷Schiffer M.: *Molecular anatomy and the pathological expression of antibody light chains*. Am. J. Pathol. 1996; 148(5): 1339-1344.

⁶⁸Davis PD, Raffin R, Dul LJ, Vogen MS, Williamson KE, Stevens JF, Argon Y.: *Inhibition of amyloid fiber assembly by both BiP and its target peptide*. Immunity. 2000; 13(4): 433-442.

⁶⁹Buxbaum J.: *Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease*. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1992; 6(2): 323-346.

⁷⁰Demeule B, Gurny R, Arvinte T.: *Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2006; 62(2): 121-130.

⁷¹Kaplan B, Ramirez-Alvarado M, Sikkink L, Golderman S, Dispenzieri A, Livneh A, Gallo G.: *Free light chains in plasma of patients with light chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition disease. High proportion and heterogeneity of disulfide-linked monoclonal free light chains as pathogenic features of amyloid disease*. Br. J. Haematol. 2009; 144(5): 705-715.

⁷²Denoroy L, Déret S, Aucouturier P.: *Overrepresentation of the V kappa IV subgroup in light chain deposition disease*. Immunol. Lett. 1994; 42(1-2): 63-66.

-
- ⁷³Klimtchuk ES, Gursky O, Patel RS, Laporte KL, Connors LH, Skinner M, Seldin DC.: *The critical role of the constant region in thermal stability and aggregation of amyloidogenic immunoglobulin light chain*. Biochemistry. 2010; 49(45): 9848-9857.
- ⁷⁴Helms LR, Wetzel R.: *Specificity of abnormal assembly in immunoglobulin light chain deposition disease and amyloidosis*. J. Mol. Biol. 1996; 257(1): 77-86.
- ⁷⁵Alim MA, Yamaki S, Hossain MS, Takeda K, Kozima M, Izumi T, Takashi I, Shinoda T.: *Structural relationship of kappa-type light chains with AL amyloidosis: multiple deletions found in a V kappa IV protein*. Clin. Exp. Immunol. 1999; 118(3): 344-348.
- ⁷⁶Jarrett JT, Lansbury PT Jr.: *Seeding 'one dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell. 1993; 73(6): 1055-1058.
- ⁷⁷Linke RP, Zucker-Franklin D, Franklin EC: *Morphologic, chemical and immunologic studies of amyloid-like fibrils formed from Bence proteins by proteolysis*. J. Immunol. 1973; 111(1): 10-23.
- ⁷⁸Rostagno A, Vidal R, Kaplan B, Chuba J, Kumar A, Elliott JI, Frangione B, Gallo G, Ghiso J.: *pH-dependent fibrillogenesis of a V kappa III Bence Jones protein*. Br. J. Haematol. 1999; 107(4): 835-843.
- ⁷⁹Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB, Hawkins PN.: *Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy*. Br. J. Haematol. 2003; 122(1): 78-84.
- ⁸⁰Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, Minert LJ, Ionescu-Zanetti C, Millett I, Fink AL.: *Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates*. Biochemistry. 2001; 40(12): 3525-3535.
- ⁸¹Dispenzieri A, Gertz MA, Buadi F.: *What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis?* Blood Rev. 2012; 26(4): 137-154.
- ⁸²Hobbs JR.: *Immunochemical classes of myelomatosis. Including data from a therapeutic trial conducted by a Medical Research Council working party*. Br. J. Haematol 1969; 16(6): 599-606.
- ⁸³Nowrousian MR, Brandhorst D, Sammet C, Kellert M, Daniels R, Schuett P, Poser M, Mueller S, Ebeling P, Welt A, Bradwell AR, Buttkeireit U, Opalka B, Flasshove M, Moritz T, Seeber S.: *Serum Free Light Chain Analysis and Urine Immunofixation Electrophoresis in Patients with Multiple Myeloma*. Clin. Cancer. Res. 2005; 11(24): 8706-8714.
- ⁸⁴Gottenberg JE, Aucouturier F, Goetz J, Sordet C, Jahn I, Busson M, Cayuela JM, Sibia J, Mariette X.: *Serum immunoglobulin free light chain assessment in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome*. Ann. Rheum. Dis. 2007; 66(1): 23-27.

-
- ⁸⁵Lamers KJ, de Jong JG, Jongen PJ, Kock-Jansen MJ, Teunesen MA, Prudon-Rosmulder EM.: *Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements*. J. Neuroimmunol. 1995; 62(1): 19-25.
- ⁸⁶Fischer C, Arneth B, Koehler J, Lotz J, Lackner KJ.: *Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis*. Clin. Chem. 2004; 50(10): 1809-1813.
- ⁸⁷Harrison HH.: *Fine structure of "light-chain ladders" in urinary immunofixation studies revealed by ISO-DALT two-dimensional electrophoresis*. Clin. Chem. 1990; 36(8): 1526-1527.
- ⁸⁸Graziani M, Merlini G, Petrini C.: *Guidelines for the Analysis of Bence Jones Protein* Clin Chem. Lab. Med. 2003; 41(3): 338–346.
- ⁸⁹MacNamara EM, Aguzzi F, Petrini C, Higginson J, Gasparro C, Bergami MR, Bianchi G, Whicher JT.: *Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains in urine: a cause for confusion with Bence Jones protein*. Clin. Chem. 1991; 37(9): 1570 - 1574.
- ⁹⁰Harrison HH.: *The "ladder light chain" or "pseudooligoclonal" pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive IFE pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains*. Clin. Chem. 1991; 37(9): 1559-1564.
- ⁹¹Pascali E.: *Bence Jones proteins identified by immunofixation electrophoresis of concentrated urine*. Clin Chem. 1994; 40(6): 945-946.
- ⁹²Roach BM, Meinke JS, Sridhar N, Vladutiu AO.: *Multiple narrow bands in urine protein electrophoresis*. Clin. Chem. 1999; 45(5): 716-718.
- ⁹³Torres MJ, Turell L, Botti H, Antmann L, Carballal S, Ferrer-Sueta G, Radi R, Alvarez B.: *Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids*. Arch. Biochem. Biophys. 2012; 521(1-2): 102-110.
- ⁹⁴Walker JM.: *The protein protocols handbook*. 2002; Humana Press, Totowa, New Jersey: 15-21.
- ⁹⁵Kuśmierk K, Głowacki R, Bald E.: *Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography*. Anal. Bioanal. Chem. 2006; 385(5): 855-860.
- ⁹⁶Drożdż R.: *Zastosowania technik cyfrowej analizy obrazu w pracy laboratorium bioanalitycznego*. Diagn. Lab. 2003; 39(2): 163-178.
- ⁹⁷Kuśmierk K, Chwatko G, Głowacki R, Bald E.: *Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection*. Journal of Chromatography B. 2009; 877(28): 3300–3308.
- ⁹⁸Stanisz A.: *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Polska. Kraków 1998: 205.

-
- ⁹⁹Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin PR.: *A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry.* Anal. Biochem. 1999; 273(1): 73-80.
- ¹⁰⁰Sanders PW, Booker BB.: *Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins.* J. Clin. Invest. 1992; 89(2): 630.
- ¹⁰¹Solomon A, Weiss DT, Kattine AA.: *Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins.* N. Engl. J. Med. 1991; 324(26): 1845.
- ¹⁰²Berggård I, Peterson PA.: *Polymeric forms of free normal kappa and lambda chains of human immunoglobulin.* J. Biol. Chem. 1969; 244(16): 4299-4307.
- ¹⁰³Abraham RS, Charlesworth MC, Owen BA, Benson LM, Katzmann JA, Reeder CB, Kyle RA.: *Trimolecular complexes of lambda light chain dimers in serum of a patient with multiple myeloma.* Clin. Chem. 2002; 48(10): 1805-1811.
- ¹⁰⁴Schiffer M.: *Molecular anatomy and the pathological expression of antibody light chains.* Am. J. Pathol. 1996; 148(5): 1339-1344.
- ¹⁰⁵Diemert MC, Musset L, Gaillard O, Escolano S, Baumelou A, Rousselet F, Galli J.: *Electrophoretic study of the physico-chemical characteristics of Bence-Jones proteinuria and its association with kidney damage.* J. Clin. Pathol. 1994; 47(12): 1090-1097.
- ¹⁰⁶Grimm C, Hofstetter G, Aust S, Mutz-Dehbalaie I, Bruch M, Heinze G, Rahhal-Schupp J, Reinthaller A, Concin N, Polterauer S.: *Association of gamma-glutamyltransferase with severity of disease at diagnosis and prognosis of ovarian cancer.* Br. J. Cancer. 2013; 109(3): 610-614.
- ¹⁰⁷Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE.: *Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death.* J. Biol. Chem. 2001; 276(6): 3798-3804.
- ¹⁰⁸Mulcahy RT, Bailey HH, Gipp JJ.: *Up-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels.* Cancer Chemother. Pharmacol. 1994; 34(1): 67-71.
- ¹⁰⁹Shen H, Kauvar L, Tew KD.: *Importance of glutathione and associated enzymes in drug response.* Oncol. Res. 1997; 9(6-7): 295-302.
- ¹¹⁰Imbesi S, Musolino C, Allegra A, Saija A, Morabito F, Calapai G, Gangemi S.: *Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update.* Expert Rev. Hematol. 2013; 6(3): 317-325.
- ¹¹¹Goel A, Spitz DR, Weiner GJ.: *Manipulation of cellular redox parameters for improving therapeutic responses in B-cell lymphoma and multiple myeloma.* J. Cell. Biochem. 2012; 113(2): 419-425.
- ¹¹²HY, Meng X, Guan Y, Wang HQ.: *Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cell.* BMC Cancer. 2009; 9(56): 1471-2407.

-
- ¹¹³Wouters MA, Fan SW, Haworth NL.: *Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance*. *Antioxid. Redox. Signal.* 2010; 12(1): 53-91.
- ¹¹⁴Kaplan B, Ramirez-Alvarado M, Dispenzieri A, Zeldenrust SR, Leung N, Livneh A, Gallo G.: *Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study of intact and truncated forms of light chains and their charge properties*. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 46(3): 335-341.
- ¹¹⁵Roussel A, Spinelli S, Déret S, Navaza J, Aucouturier P, Cambillau C.: *The structure of an entire noncovalent immunoglobulin kappa light-chain dimer (Bence-Jones protein) reveals a weak and unusual constant domains association*. *Eur. J. Biochem.* 1999; 260(1): 192-199.
- ¹¹⁶Lavatelli F, Brambilla F, Valentini V, Rognoni P, Casarini S, Di Silvestre D, Perfetti V, Palladini G, Sarais G, Mauri P, Merlini G.: *A novel approach for the purification and proteomic analysis of pathogenic immunoglobulin free light chains from serum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1814(3): 409-419.
- ¹¹⁷Li C, Geng H, Yang Z, Zhong R.: *Influence of immunoglobulin light chain dimers on the results of the quantitative nephelometric assay*. *Clin. Lab.* 2011; 57(1-2): 53-57.
- ¹¹⁸Baden EM, Owen BAL, Peterson FC, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M, Thompson JR.: *Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein*. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(23): 15853–15860.
- ¹¹⁹Peterson FC, Baden EM, Owen BAL, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M.: *A simple mutation promotes amyloidogenicity through a highly promiscuous dimer interface*. *Structure.* 2010; 18(5): 563–570.
- ¹²⁰Solling K, Solling J, Lanng Nielsen J.: *Polymeric Bence Jones proteins in serum of myeloma patients with renal insufficiency*. *Acta Med. Scand.* 1984; 216(5): 495–502.
- ¹²¹Harding S, Provot F, Beuscart JB, Cook M, Bradwell AR, Stringer S, White D, Cockwell P, Hutchison CA.: *Aggregated serum free light chains may prevent adequate removal by high cut-off haemodialysis*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26(4): 1438–1440.
- ¹²²Leung N, Gertz MA, Zeldenrust SR, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fervenza FC, Kumar S, Lacy MQ, Lust JA, Greipp PR, Witzig TE, Hayman SR, Russell SJ, Kyle RA, Winters JL.: *Improvement of cast nephropathy with plasma exchange depends on the diagnosis and on reduction of serum free light chains*. *Kidney Int.* 2008; 73(11): 1282-1288.
- ¹²³Kosaka M, Ishi Y, Okagawa K, Saito S, Sugihara J, Muto Y.: *Tetramer Bence Jones protein in the immunoproliferative diseases: angioimmunoblastic lymphadenopathy, primary amyloidosis, and multiple myeloma*. *Am. J. Clin Pathol.* 1989; 91(6): 639–646.
- ¹²⁴Bergen HR 3rd, Abraham RS, Johnson KL, Bradwell AR, Naylor S.: *Characterization of amyloidogenic immunoglobulin light chains directly from serum by on-line immunoaffinity isolation*. *Biomed. Chromatogr.* 2004; 18(3): 191-201.

-
- ¹²⁵Connors LH, Jiang Y, Budnik M, Théberge R, Prokaeva T, Bodi KL, Seldin DC, Costello CE, Skinner M.: *Heterogeneity in primary structure, post-translational modifications, and germline gene usage of nine full-length amyloidogenic kappa1 immunoglobulin light chains*. *Biochemistry*. 2007; 46(49): 14259-14271.
- ¹²⁶Vercammen M, Meirlaen P, Broodtaerts L, Vande Broek I, Bossuyt X.: *Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay*. *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412(19-20): 1798-1804.
- ¹²⁷Harding SJ, Sharp K, Steiner A, Russ G, Blackmore S, Mead G, Durie B, Gupta M, Dean R, Emond JP, Giroux SM, Bradwell A.: *Quantification of polymerising serum free light chains*. *Clin. Lymphoma Myeloma Supplement*. 2009; 9: B101a.
- ¹²⁸Jenner E.: *Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics*. *Clin. Chim. Acta*. 2014; 427: 15-20.
- ¹²⁹Gertz MA.: *Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2013 update on diagnosis, prognosis, and treatment*. *Am. J. Hematol*. 2013; 88(5): 416-425.
- ¹³⁰Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, Woodward C.: *Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation, and molecular weight determination*. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004; 60(3): 281–293.
- ¹³¹Lee YK, Brewer JW, Hellman R, Hendershot LM.: *BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly*. *Mol. Biol. Cell*. 1999; 10(7): 2209-2219.
- ¹³²Enqvist S, Sletten K, Westermark P.: *Fibril protein fragmentation pattern in systemic AL-amyloidosis*. *J. Pathol*. 2009; 219(4): 473-480.
- ¹³³Chung CM, Chiu JD, Connors LH, Gursky O, Lim A, Dykstra AB, Liepnieks J, Benson MD, Costello CE, Skinner M, Walsh MT.: *Thermodynamic stability of a kappa1 immunoglobulin light chain: relevance to multiple myeloma*. *Biophys. J*. 2005; 88(6): 4232-4242.
- ¹³⁴Lim A, Wally J, Walsh MT, Skinner M, Costello CE.: *Identification and location of a cysteinyl posttranslational modification in an amyloidogenic kappa1 light chain protein by electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Anal. Biochem*. 2001; 295(1): 45-56.
- ¹³⁵Coriu D, Weaver K, Schell M, Eulitz M, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A.: *A molecular basis for nonsecretory myeloma*. *Blood*. 2004; 104(3): 829-831.
- ¹³⁶Gilbert HE.: *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. *Adv. Enzymol*. 1990, 63; 69-172.
- ¹³⁷Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA.: *Pathways for protein disulphide bond formation*. *Trends Cell. Biol*. 2000; 10(5): 203-210.

-
- ¹³⁸Hansen RE, Otsu M, Braakman I, Winther JR.: *Quantifying Changes in the Cellular Thiol-Disulfide Status during Differentiation of B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells*. Int. J. Cell. Biol. 2013; 2013: 898563.
- ¹³⁹Gangemi S, Allegra A, Alonci A, Cristani M, Russo S, Speciale A, Penna G, Spatari G, Cannavò A, Bellomo G, Musolino C.: *Increase of novel biomarkers for oxidative stress in patients with plasma cell disorders and in multiple myeloma patients with bone lesions*. Inflamm. Res. 2012; 61(10): 1063-1067.
- ¹⁴⁰Ellgaard L.: *Catalysis of disulphide bond formation in the endoplasmic reticulum*. Biochem. Soc. Trans. 2004; 32(5): 663-667.
- ¹⁴¹De Donatis GM, Moschini R, Cappiello M, Del Corso A, Mura U.: *Cysteinylglycine in the control of glutathione homeostasis in bovine lenses*. Mol. Vis. 2010; 16: 1025-1033.
- ¹⁴²del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E.: *Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells*. FASEB J. 1999; 13(1): 69-79.
- ¹⁴³Summa D, Spiga O, Bernini A, Venditti V, Priora R, Frosali S, Margaritis A, Di Giuseppe D, Niccolai N, Di Simplicio P.: *Protein-thiol substitution or protein dethiolation by thiol/disulfide exchange reactions: the albumin model*. Proteins. 2007; 69(2): 369-378.
- ¹⁴⁴Dello Strologo L, Rizzoni G.: *Cystinuria*. Acta. Paediatr. Suppl. 2006; 95(452): 31-33.
- ¹⁴⁵Coward RA, Delamore IW, Mallick NP, Robinson EL.: *The importance of urinary immunoglobulin light chain isoelectric point (pI) in nephrotoxicity in multiple myeloma*. Clin. Sci. (Lond). 1984; 66(2): 229-232.
- ¹⁴⁶Johns EA, Turner R, Cooper EH, MacLennan IC.: *Isoelectric points of urinary light chains in myelomatosis: analysis in relation to nephrotoxicity*. J. Clin. Pathol. 1986; 39(8): 833-837.
- ¹⁴⁷Norden AG, Flynn FV, Fulcher LM, Richards JD.: *Renal impairment in myeloma: negative association with isoelectric point of excreted Bence-Jones protein*. J. Clin. Pathol. 1989; 42(1): 59-62.
- ¹⁴⁸Sanders PW, Herrera GA, Chen A, Booker BB, Galla JH.: *Differential nephrotoxicity of low molecular weight proteins including Bence Jones proteins in the perfused rat nephron in vivo*. J. Clin. Invest. 1988; 82(6): 2086-2096.
- ¹⁴⁹Bellotti V, Merlini G, Bucciarelli E, Perfetti V, Quaglini S, Ascari E.: *Relevance of class, molecular weight and isoelectric point in predicting human light chain amyloidogenicity*. Br. J. Haematol. 1990; 74(1): 65-69.