

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Ivana Heřmanová

Mechanismus účinku L-asparaginázy u dětské akutní lymfoblastické leukémie

The mechanism of action of L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.7.2015

IVANA HEŘMANOVÁ

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala mé školitelce Júlii Starkové za odborné vedení, pracovní nasazení a přátelský přístup v průběhu celého postgraduálního studia.

Poděkování patří také Janu Trkovi, za to, že mne přijal do týmu CLIP a po celou dobu studia mne podporoval.

Dále děkuji všem kolegům z pracovní skupiny CLIP za příjemnou pracovní atmosféru a za ochotu vždy pomoci.

Velký dík patří také celé mé rodině za podporu a trpělivost v průběhu studia

Identifikační záznam:

HEŘMANOVÁ Ivana. *Mechanismus účinku L-asparaginázy u dětské akutní lymfoblastické leukémie [The mechanism of action of L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia]*. Praha, 2015. 120 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.) Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí závěrečné práce: Starková, Júlia

Klíčová slova: *akutní lymfoblastická leukémie (ALL), L-asparagináza (ASNáza), asparagin syntetáza (ASNS), metabolismus leukemických buněk, mTORC1*

Keywords: *acute lymphoblastic leukemia (ALL), L-asparaginase (ASNase), asparagine synthetase (ASNS), metabolism of leukemic cells, mTORC1*

Obsah

Úvod

1. Literární přehled.....	9
1.1 Akutní lymfoblastická leukémie u dětí	9
1.2 Terapie dětské ALL.....	11
1.3 L-asparagináza	13
1.3.1 Základní charakteristika ASNázy	13
1.3.2 Objev terapeutického účinku ASNázy.....	13
1.3.3 ASNázové přípravky.....	13
1.3.4 Mechanismus cytotoxického účinku a příčiny rezistence.....	14
1.3.5 Nežádoucí účinky ASNázy	16
1.3.6 Další použití ASNázy	16
1.4 Metabolické změny nádorových buněk	17
1.4.1 Warburgův efekt	17
1.4.2 Závislost na glutaminu.....	18
1.4.3 Metabolismus mastných kyselin.....	19
1.5 Metabolismus leukemických buněk	21
1.5.1 Využití v terapii	21
1.6 mTORC1	22
2. Vymezení cílů a základní hypotézy práce.....	25
3. Materiál a metody	26
3.1 Pacientské vzorky a zdravé kontroly.....	26
3.2 Zpracování vzorku	26
3.2.1 Izolace mononukleárních buněk z KD pacientů	26
3.2.2 Izolace mononukleárních buněk z PK zdravých dárců.....	26
3.3 Buněčné linie.....	26
3.3.1 Kryoprezervace.....	27
3.3.2 Kultivace buněčných linií	27
3.3.3 Příprava leukemických buněk pro experimenty <i>in vitro</i>	27
3.3.4 Příprava leukemických buněčných linií rezistentních k ASNáze.....	27
3.4 Stanovení genové exprese	28
3.4.1 Izolace nukleových kyselin.....	28
3.4.2 Reverzní transkripce	28
3.4.3 qRT-PCR	28
3.5 Stanovení expresního profilu ALL buněčných linií.....	29
3.5.1 Příprava vzorků.....	29
3.5.2 Měření expresního profilu	29
3.5.3 Analýza expresního profilu.....	29
3.6 Detekce proteinů metodou Western blot.....	30
3.7 In vitro cytotoxický test	31
3.8 RNA interference (RNAi)	31
3.9 Hodnocení apoptózy metodou průtokové cytometrie	32
3.10 Monitorování toku autofagie	32
3.11 Měření de novo syntézy pyrimidinů.....	33
3.12 Měření obsahu aminokyselin.....	34
3.13 Měření spotřeby glukózy	34
3.14 Stanovení hladiny extracelulárního laktátu	35
3.15 Měření oxidace mastných kyselin	35
3.15.1 Příprava iontově výměnných kolon	35
3.15.2 Příprava a měření vzorků.....	35

3.16	Měření respirace	36
3.17	Stanovení NAD ⁺ /NADH.....	37
3.18	RagB model	37
3.19	Analýza dat a statistická analýza	38
4.	Výsledky.....	39
4.1	Korelace exprese genu pro ASNS s citlivostí k ASNáze.....	39
4.1.1	Účinek snížení exprese genu pro ASNS u ALL buněčných linií na citlivost k ASNáze	39
4.1.2	Porovnání exprese genu pro ASNS primárních ALL diagnostických vzorků a ALL buněčných linií	40
4.1.3	Korelace exprese genu pro ASNS s citlivostí primárních ALL diagnostických vzorků k ASNáze.....	40
4.1.4	Účinek ASNázy na mRNA a proteinovou hladinu ASNS.....	40
4.2	Výsledky expresního profilování leukemických buněk se známou citlivostí k ASNáze	42
4.3	Vliv ASNázy na metabolismus leukemických buněk	43
4.3.1	Účinek ASNázy na celkový obsah aminokyselin	43
4.3.2	Účinek ASNázy na oxidaci MK	43
4.3.3	Účinek ASNázy na glykolýzu.....	44
4.3.4	Účinek ASNázy na respirační kapacitu	44
4.4	Regulace účinku ASNázy	46
4.4.1	Účinek ASNázy na proteosyntézu a syntézu pyrimidinů	46
4.4.2	Účinek ASNázy na autofagii	46
4.4.3	Účinek ASNázy na ALL buňky s mutací v genu pro RagB	47
4.5	Vliv farmakologická inhibice oxidace MK na cytotoxický účinek ASNázy ...	49
4.5.1	Vliv inhibice oxidace MK na cytotoxický účinek ASNázy.....	49
4.5.2	Vliv aktivity oxidace MK na citlivost k ASNáze	49
4.6	Vliv asparaginu a glutaminu na jednotlivé procesy v ALL buňkách.....	51
4.6.1	Účinek deplece asparaginu a glutaminu na dráhu mTORC1 a na hladinu proteinů c-Myc, ASNS a PARP.....	51
4.6.2	Účinek deplece asparaginu a glutaminu na oxidaci MK a respiraci.....	51
4.6.3	Účinek přidání asparaginu a glutaminu na jednotlivé buněčné procesy...	52
5.	Diskuse	53
	Závěr	59
	Abstrakt	60
	Abstract.....	62
	Obrázky	64
	Tabulky	94
	Seznam použitých zkratk	102
	Citovaná literatura	109
	Přílohy.....	121

Úvod

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL), nejčastější nádorové onemocnění v dětském věku, je léčena kombinovanou chemoterapií, která dosahuje remise u 90 % pacientů. Přestože je terapie ALL velmi úspěšná, relaps onemocnění postihuje v současné době 15-20 % dětí. Jedna z možných příčin je rezistence k léčivům. V České republice je ALL léčena dle mezinárodního protokolu AEIOP-BFM ALL 2009. Velmi významnou složkou protokolu je L-asparagináza (ASNáza). Cytotoxický efekt ASNázy spočívá v depleci extracelulárního asparaginu a glutaminu. Za endogenní syntézu asparaginu je zodpovědná asparagin syntetáza (ASNS). Leukemické buňky mají expresi genu pro *ASNS* v porovnání s buňkami zdravými velmi nízkou, jsou proto na podání ASNázy citlivé. Detailní mechanismus účinku ani příčiny rezistence však nebyly dosud vysvětleny.

Nadějným ukazatelem rezistence k ASNáze se zdála být exprese genu pro *ASNS*. Na modelu ALL buněčných linií bylo prokázáno, že vyšší exprese genu pro *ASNS* je zodpovědná za rezistentní fenotyp. Při studiu rezistence patientských vzorků však byla původní hypotéza zpochybněna. Naším cílem proto bylo zjistit, zda je exprese genu pro *ASNS* klíčový ukazatel rozdílné citlivosti jednotlivých ALL pacientů k ASNáze. Vztah exprese genu pro *ASNS* a citlivosti k ASNáze jsme studovali za využití modelu ALL buněčných linií s gradientově sníženou expresí genu pro *ASNS*. Dále jsme změřili expresi genu pro *ASNS* a citlivost k ASNáze u primárních BCP ALL diagnostických vzorků.

Druhá část práce je věnovaná studiu mechanismu účinku ASNázy se zaměřením na metabolismus leukemických buněk. Metabolismus nádorových buněk se vyznačuje charakteristickými změnami. Vzhledem k tomu, že ASNáza depletuje aminokyseliny, které jsou pro leukemické buňky esenciální, předpokládali jsme, že dochází k ovlivnění metabolických drah. Ke studiu jsme využili ALL buněčné linie s rozdílnou citlivostí k ASNáze, u kterých jsme stanovili expresní profil a následnou analýzou určili buněčné dráhy, které jsou podáním ASNázy ovlivněné. Zaměřili jsme se na klíčové bioenergetické procesy: oxidaci mastných kyselin, glykolýzu a respiraci. Studovali jsme také způsob regulace odpovědi leukemických buněk na podání ASNázy a možnost zvýšení cytotoxického účinku ASNázy. Vzhledem k tomu, že je glutaminázová aktivita ASNázy považovaná za hlavní příčinu nežádoucích účinků, zabývali jsme se také účinkem deplece jednotlivých aminokyselin.

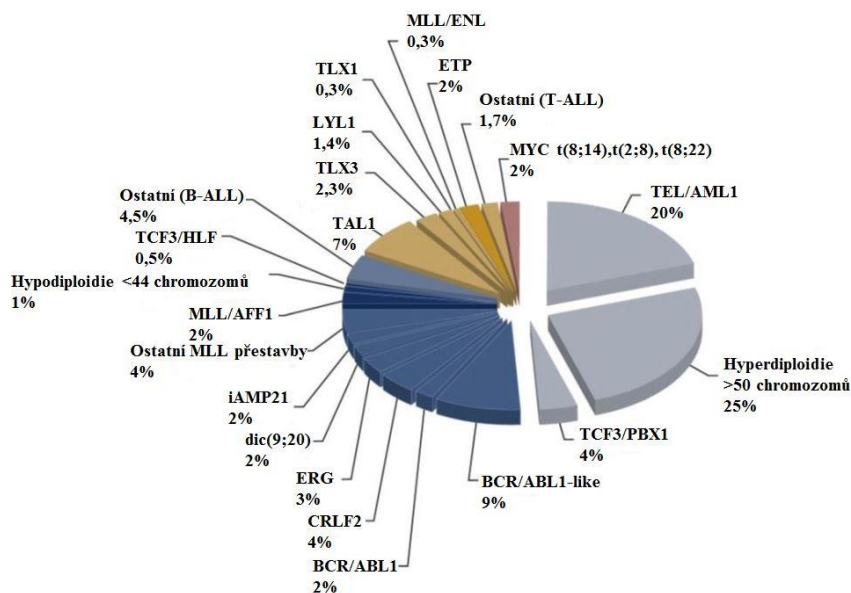
Výsledky předkládané práce pomáhají vysvětlit vztah exprese genu pro *ASNS* s citlivostí leukemických buněk k ASNáze. V naší práci popisujeme detailní mechanismus účinku ASNázy v leukemických buňkách a odkrýváme nové možnosti zvýšení jejího cytotoxického působení.

1. Literární přehled

1.1 Akutní lymfoblastická leukémie u dětí

Leukémie představuje skupinu maligních onemocnění, vznikajících transformací hematopoetické kmenové buňky, která ztrácí schopnost diferenciaci, zachovává si schopnost proliferace vymykající se fyziologické regulaci. Na základě liniového původu maligní leukemické buňky dělíme onemocnění na lymfoidní a myeloidní. Dle průběhu rozlišujeme leukémie akutní a chronické. Leukémie tvoří 30 % zhoubných nádorů v dětském věku.¹ Nejčastějším typem leukémie a tím i nejčastější malignitou u dětí je ALL, která tvoří 80 % dětských leukémií. V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 65 dětí s ALL. Klasifikace ALL dle světové zdravotnické organizace je založena na typu progenitorů, ze kterých ALL vzniká. Pokud ALL pochází z B-lymfocytární řady, jedná se o „B-cell precursor ALL“; (BCP ALL), která tvoří přibližně 80 % všech dětských ALL. BCP ALL se dále dělí dle stupně zralosti do třech imunofenotypových podskupin: pro-B ALL (5 %), cALL (“common“ ALL, 75%) a pre-B ALL (20%). ALL vycházející z progenitorů T-lymfocytární řady (T-ALL) představují přibližně 15 % dětských ALL. Nejčastějším typy T-ALL jsou “intermediate“ T-ALL (36 %) nebo zralá T-ALL (40 %), vzácnější výskyt je tzv. earlyT-ALL (23 %). Velmi vzácně se setkáváme s ALL ze zralých B buněk (1-2 %). Genetická analýza odhalila u více než 75 % pacientů s ALL primární genetickou abnormalitu, proto mohou být jednotlivé skupiny ALL dále děleny dle konkrétní genetické aberace.² Frekvence výskytu specifických ALL genotypů je uvedena na Obr. 1. Ze strukturních aberací se nejčastěji vyskytují chromozomální translokace vedoucí ke vzniku fúzních genů. Příkladem může být translokace t(12;21) a její produkt *TEL-AML1*, translokace t(9;22) s fúzním genem *BCR-ABL* či přestavby genu *MLL*. U dětských ALL také nalzáme chromozomální aberace numerické, jako jsou hyperdiploidie a vzácněji i hypodiploidie. Detekce primárních somatických genetických abnormalit je z prognostického i terapeutického hlediska velmi důležitá, protože se jednotlivé podskupiny liší agresivitou průběhu onemocnění a citlivostí k terapii. Přítomnost některých aberací tak patří k nejdůležitějším stratifikačním kritériím. Mezi prognosticky příznivé se řadí hyperdiploidie nad 50 chromozomů a fúzní gen *TEL-AML1*. Jako prognosticky nepříznivý byl identifikován fúzní gen *BCR-ABL*, přestavby genu *MLL* a hypodiploidie.^{1, 3-6} Genetické aberace hrají také kritickou roli v leukemogenezi. Obecně způsobují aktivaci protoonkogenů a/nebo inaktivaci tumor supresorových genů. Na

experimentálních modelech však bylo prokázáno, že se na vzniku leukémie podílí více mutací, ty mohou být i příčinou rezistence na léčbu.^{7, 8} Díky novým a stále se zdokonalujícím metodám genetického profilování, byla v posledních letech odhalena řada nových získaných genetických aberací. Analýzou jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) bylo identifikováno v průměru šest aberací na jeden případ BCP ALL, přičemž převažovaly delece nad amplifikacemi v poměru 2:1. Cílové geny odhalených lézí regulovaly lymfoidní diferenciaci, tumor supresorové geny, buněčný cyklus, apoptózu, signální dráhy, micro RNA a odpověď na terapii. Mezi jednotlivými tradičně definovanými genotypovými podskupinami byl výrazný rozdíl v počtu aberací. ALL s přestavbou genu *MLL* měly v průměru méně než jednu na pacienta, což naznačuje, že samotný *MLL* je potentní onkogen, který nepotřebuje mnoho kooperativních lézí k zapříčinění leukemické transformace. Naopak v případech *TEL-AML1* a *BCR-ABL1* leukémií bylo identifikováno více než 6 aberací na jeden případ.⁹ Tyto výsledky jsou kompatibilní se známým chováním uvedených leukémií a navíc odhalily, že je heterogenita leukémií ještě výraznější, než se předpokládalo. Další výzvou bude zjistit, které z nově odhalených aberací lze považovat za příčinu leukemogeneze, které jsou jejím následkem a v neposlední řadě také určit jejich prognostický význam.



Obr. 1 - Frekvence výskytu specifických ALL genotypů
(upraveno z Pui CH et al., 2012)

1.2 Terapie dětské ALL

Úspěšnost léčby dětské ALL se v posledních desetiletích dramaticky zlepšila. Do poloviny 70. let minulého století šlo o onemocnění se 100% úmrtností. V současné době dosahuje remise (vymizení blastů z kostní dřeně (KD) a mimodřeňových prostor) 99 % pacientů, přežití bez relapsu nemoci (přežití do selhání; event free survival, EFS) téměř 80 % a celkového přežití (overall survival, OS) 85 %. Za tímto úspěchem stojí zavedení nových léčebných protokolů a stratifikace pacientů dle rizikových faktorů. V České republice se dětská ALL léčí dle mezinárodního protokolu AIEOP-BFM ALL 2009. V rámci studie AIEOP-BFM ALL 2009 se spojili specializovaní dětské lékaři z Německa, Rakouska, Švýcarska, Itálie, České republiky, Izraele a Austrálie. Společně vytvořili jednotný koncept léčby, který je založen na výsledcích a zkušenostech z předchozích studií. Počáteční léčba se skládá ze tří fází: indukce remise, konsolidace a pozdní intenzifikace. Poté následuje udržovací léčba. Chemoterapie obvykle trvá dva roky. Indukce slouží k navození remise onemocnění a obnovení normální hematopoézy. Tato fáze zahrnuje prednison, vincristin, daunorubicin a ASNázu. Další fází je konsolidace, kdy je podáván cytosinarabinozid, merkaptopurin, cyklofosfamid a vysokodávkovaný metotrexát. Přibližně 6 měsíců od zahájení terapie následuje pozdní intenzifikace, která je obdobná jako indukce. Cílem konsolidace a pozdní intenzifikace je eradikace reziduální nemoci. Při udržovací léčbě se používá kombinace merkaptopurinu a metotrexátu. Nedílnou součástí terapie je také opakovaná intratekální aplikace metotrexátu do mozkomíšního moku, která slouží k prevenci a léčbě leukemické infiltrace mozku. U dětí s nejvyšším rizikem této komplikace je zařazeno ozařování neurokrania (přibližně 15 % pacientů s iniciální infiltrací CNS, T-ALL s vysokou leukocytózou nad $100 \times 10^9 / l$ a pacienti vysokého rizika).

Pacienti se dělí podle genetických změn blastů a časné odpovědi na léčbu do skupin standardního, středního a vysokého rizika. Pacienti standardního rizika potřebují méně intenzivní léčbu než pacienti vyšších rizik. Děti s nejméně příznivou prognózou jsou indikovány k transplantaci KD v první remisi. Nejlepší prognózu mají pacienti s fúzním genem *TEL-AML1* či s významnou hyperdiploidií nad 50 chromozomů v leukemické buňce s více než 90% šancí na vyléčení. Největší skupinu tzv. středního rizika tvoří děti starší než 6 let anebo pacienti s vyšší iniciální leukocytózou. Skupinu vysokého rizika tvoří děti se špatnou odpovědí na léčbu anebo s nepříznivými chromosomálními aberacemi (přestavba *BCR-ABL* nebo *MLL-AF4*). Nejhorší prognózu mají kojenci,

zvláště pokud jsou mladší než 6 měsíců, u kterých jsou časté přestavby genu *MLL* a významná hyperleukocytóza. Některé vzácné genotypy vyskytující se u méně než 1 % dětí, jako je významná hypodiploidie < 44 chromozomů, translokace t(17; 19) či průkaz fúzního genu *TEL-ABL*, mají velmi špatnou prognózu. Leukémie z T prekurzorů má v současnosti stejné výsledky léčby jako B-ALL.

Časná odpověď na terapii je hodnocena úbytkem blastů v PK po týdenní předfázi, která spočívá v izolovaném podávání prednisonu a jedné intratekální injekci metotrexátu. Dalším bodem je hodnocení poklesu blastů v KD 2 týdny od zahájení léčby. Citlivější metoda hodnocení časně odpovědi na léčbu je detekce minimální reziduální nemoci (MRN) v KD po 1 a 3 měsících od zahájení chemoterapie. Při sledování MRN se detekuje specifická klonální přestavba genu pro imunoglobulinový nebo T-buněčný receptor (*Ig/TCR*). Jedná se o unikátní sekvenci, která vzniká přeskupováním genových segmentů v průběhu vývoje leukemické buňky. Tento znak lze využívat díky tomu, že je přítomen na povrchu všech buněk leukemického klonu a je specifický pro každého pacienta.¹⁰⁻¹² Pomalý ústup MRN řadí pacienty do vysokého rizika, naopak rychlý pokles MRN vede ke kontrolovanému snížení intenzity terapie.

Nejčastější příčinou neúspěchu léčby ALL je relaps onemocnění, který postihuje 15–20 % pacientů. Z hlediska další prognózy je velmi důležitá doba a místo vzniku relapsu. Nejhorší prognózu mají děti s velmi časnými relapsy v KD, které vznikají do 18 měsíců od diagnózy. Mimodřeňové projevy leukémie mají lepší prognózu. Nejčastěji vznikají v CNS nebo u chlapců testikulární infiltrací. Příčinou těchto projevů je nedostatečný průnik cytostatik přes hematoencefalickou a hematogonadální bariéru. Pacienti, u nichž k relapsu došlo, jsou rozděleni do třech rizikových skupin. Skupině s nejnižším rizikem je podávána intenzivní chemoterapie systémem vysokodávkovaných bloků s 2–3 týdenními přestávkami. Pacienti středního rizika jsou dle odpovědi na léčbu, stanovenou měřením MRN po prvních dvou blocích chemoterapie, stratifikováni k transplantaci nebo pouze k chemoterapii. U dětí s nejvyšším rizikem je intenzivní chemoterapie zakončena transplantací hematopoetických kmenových buněk od HLA-identického sourozence nebo nepříbuzného dárce.

1.3 L-asparagináza

Jednou z klíčových látek, která se používá při terapii dětské ALL, je ASNáza. ASNáza prokazatelně zlepšuje úspěšnost léčby, v monoterapii dosahuje kompletní remise 40-60 % pacientů. Extensivní klinické studie potvrdily benefit intenzivní ASNázové terapie v porovnání s méně intenzivní terapií.¹³⁻¹⁵ Přestože se ASNáza používá již po několik desetiletí, mechanismus cytotoxického účinku a příčiny rezistence nebyly dosud vysvětleny. Rezistence na ASNázu je negativní prognostický faktor.¹⁶⁻¹⁸

1.3.1 Základní charakteristika ASNázy

ASNáza je enzym, který se vyskytuje v různých rostlinách, živočiších a mikroorganismech. Primárně hydrolyzuje asparagin za vzniku aspartátu a amoniaku (NH_3). Většina typů ASNáz má však i glutaminázovou aktivitu, což znamená, že metabolizuje i glutamin na glutamát a NH_3 .¹⁹ Glutaminázová aktivita tvoří pouze 3-9 % asparaginázové aktivity v závislosti na zdroji enzymu.²⁰

1.3.2 Objev terapeutického účinku ASNázy

Protinádorový účinek ASNázy byl poprvé popsán již v roce 1953, kdy Dr. Kidd zjistil, že podání morčecího séra inhibuje v myších růst lymfomu.²¹ Následné studie ukázaly, že příčinou regrese tumoru je enzym ASNáza. Potřeba asparaginu pro růst nádorové masy byla na *in vitro* modelech postupně potvrzena u Walkerova karcinosarkomu 256 a myši leukemické linie L5178Y.^{22, 23} V roce 1964 bylo zjištěno, že lze ASNázu izolovat z *Escherichia coli* (*E. coli*), díky tomu bylo možné začít produkovat a používat tento enzym ve větším množství. Současně byly zahájeny klinické studie, které potvrdily protinádorový účinek ASNázy. ASNáza byla poté zařazena do léčebných protokolů. Při porovnávacích studiích bylo potvrzeno, že ASNáza signifikantně zvýšila EFS a OS.^{14, 15}

1.3.3 ASNázové přípravky

Díky systematickým studiím byly popsány další druhy *E. coli*, produkující ASNázu. Největší enzymatická aktivita byla potvrzena u druhu *Erwinia chrysanthemi*. ASNáza izolovaná z tohoto bakteriálního druhu se nazývá Erwináza. V současné době probíhají klinické studie rekombinantní Erwinázy konjugované s polyethylenglykolem (PEG) (mPEG-r-crisantaspáza). Zkouší se také ASNáza vázaná v suspenzi červených krvinek (GRASPA).²⁴ Klinicky se nejčastěji používá ASNáza produkovaná *E. coli* konjugovaná s PEG, tzv. pegylovaná ASNáza. Tato modifikace vedla ke snížení počtu

hypersenzitivních reakcí, které nativní ASNáza u pacientů vyvolává. Způsob podání i dávka ASNázy se v jednotlivých zemích liší. V České republice se podává intravenózně, lze ji však aplikovat i intramuskulárně. Dávka ASNázy je stanovena dle používaného léčebného protokolu AIEOP-BFM ALL 2009.

1.3.4 Mechanismus cytotoxického účinku a příčiny rezistence

Jak již bylo uvedeno, ASNáza deaminuje neesenciální aminokyseliny asparagin a glutamin, což vede ke snížení obsahu těchto aminokyselin v séru. Antileukemický účinek byl dříve přisuzován především asparaginázové aktivitě enzymu. Deplece glutaminu byla považována za příčinu některých nežádoucích účinků a byla snaha vyvinout ASNázu bez glutaminázové aktivity. Nové studie však ukazují, že je deplece glutaminu pro cytotoxický účinek také potřebná.²⁵

1.3.4.1 Asparagin syntetáza

Asparagin je endogenně produkován enzymem ASNS. ASNS je aminotransferáza, která přenáší aminoskupinu z glutaminu na aspartát. V eukaryotických buňkách ASNS nevyužívá jiné substráty, proto je označována jako glutamin-dependentní. Při studiu protinádorového účinku ASNázy se zjistilo, že mají leukemické buňky v porovnání s buňkami zdravými nižší aktivitu ASNS. Dále byla potvrzena nízká hladina exprese genu pro ASNS, shodně s nízkou hladinou proteinu.^{26, 27} Vznikla tak hypotéza, potvrzená několika publikacemi, že za účinkem ASNázy stojí závislost leukemických blastů na extracelulárním asparaginu.²⁸⁻³⁰ Zdravé tkáně jsou dle této teorie schopny ztráty asparaginu kompenzovat díky dostatečně aktivní ASNS, případně zvýšením exprese tohoto enzymu v odpovědi na asparaginovou depleci. Nedostatek asparaginu vede v leukemických buňkách k poškození proteosyntézy, syntézy DNA, RNA a následně k apoptóze.

Přestože je ASNáza při terapii ALL velmi účinná, jsou mezi jednotlivými pacienty rozdíly v citlivosti, včetně případů rezistence k tomuto léčivu. Bazální exprese genu pro ASNS začala být proto studována jako možná příčina interindividuálních rozdílů. Experimenty provedené na modelu leukemických buněčných linií zprvu potvrzovaly předpoklad korelace exprese genu pro ASNS s citlivostí k ASNáze. Při snaze aplikovat tyto poznatky u patientských vzorků se však situace značně zkomplikovala. Chronologicky, při studiu expresních profilů ALL pacientů nebyla exprese genu pro ASNS mezi prvními 35 geny určujícími rozdělení pacientů do skupin pomocí hierchického klastrování podle citlivosti k ASNáze, ačkoliv byla potvrzena zvýšená

exprese tohoto genu u rezistentních pacientů.³¹ Další nesrovnalosti ve vztahu ASNS a ASNázy se ukázaly během studia senzitivity k tomuto léčivu u pacientů s fúzním genem *TEL-AML1*. *In vitro* testy u těchto pacientů prokázaly vyšší citlivost na ASNázu ve srovnání s blasty *TEL-AML1*-negativních pacientů.³² Naše pracovní skupina paralelně s holandskou skupinou Stams *et al.* publikovala paradoxně zvýšenou expresi genu pro ASNS u *TEL-AML1*-pozitivních pacientů.^{33, 34} Tento překvapivý výsledek vedl k hledání specifického mechanismu účinku ASNázy u *TEL-AML1*-pozitivních ALL. Následující studie nicméně odhalily, že je problematika vztahu mezi expresí ASNS a citlivostí ALL blastů k ASNáze komplexnější, zahrnující i jiné genetické subtypy. Práce publikovaná autory Fine *et al.*³⁵ prezentuje klastrování ALL buněčných linií rezistentních resp. senzitivních k ASNáze na základě bazální exprese ASNS. Klinické vzorky pacientů se však při stejném typu analýzy takto nerozdělily. Bazální exprese genu pro ASNS tedy nebyla prediktivní pro odpověď primárních vzorků na ASNázu. Po podání ASNázy však došlo k velmi podobným změnám exprese velkého množství genů jak ve zmíněných buněčných liniích, tak v klinických vzorcích.³⁵

1.3.4.2 Další možné příčiny rezistence

Je zřejmé, že se na účinku ASNázy i na vzniku rezistence podílí kromě ASNS více faktorů. Jedním z nich může být aktivační transkripční faktor 5 (activating transcription factor 5, *ATF5*). *ATF5* je součástí signalizační dráhy, která je aktivována při nedostatku aminokyselin a vede ke zvýšení exprese genu pro ASNS. Leukemické buňky rezistentní k ASNáze mají v porovnání s buňkami senzitivními zvýšenou expresi *ATF5*. Navíc byl u ALL pacientů objeven polymorfismus v *ATF5*, který zvyšoval promotorovou aktivitu. Pacienti s tímto polymorfismem mají nižší EFS, přičemž tato spojitost byla prokázána pouze u pacientů léčených ASNázou.³⁶

Mezi další příčiny rozdílné citlivosti ALL pacientů k ASNáze může patřit ztráta proteinové kinázy *GCN2* (general control nonderepressible kinase 2). Tato kináza má jediný známý substrát, α -podjednotku eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2), a je nutná při buněčné adaptaci na nedostatek aminokyselin. Na myším modelu bylo prokázáno, že poškození funkce *GCN2* zvyšuje citlivost k ASNáze.^{37, 38}

Úspěšnost terapie může být ovlivněna i rozdílnou farmakokinetikou. ASNáza může být degradována lyzomálními proteázami asparaginyl endopeptidázou a Cathepsinem B. Uvedené proteázy jsou produkovány lymfoblasty. Štěpení vede k inaktivaci a vystavení epitopů imunitní odpovědi.^{39, 40}

Svoji roli může také sehrát mikroprostředí KD. Mezenchymální buňky KD mají schopnost sekretovat asparagin a *in vitro* ochránit blasty před následky podání ASNázy.⁴¹ Měřením obsahu asparaginu u patientských vzorků však bylo prokázáno, že po podání ASNázy nedochází ke zvýšení obsahu asparaginu v KD.⁴² Protektivní role mezenchymálních kmenových buněk je proto diskutabilní.

S rezistencí k ASNáze je také spojována obezita. V *in vitro* podmínkách bylo zjištěno, že adipocyty produkují glutamin a tím inhibují cytotoxický účinek ASNázy.⁴³

1.3.5 Nežádoucí účinky ASNázy

Ačkoliv přidání ASNázy do protokolů výrazně zlepšilo léčebné výsledky, existují limity dané toxicitou, které může ASNáza při vyšších dávkách způsobovat. ASNáza je bakteriální protein, nejčastějším nežádoucím účinkem je proto hypersenzitivita, která se může projevit jako mírná alergická reakce až fatální anafylaxe.⁴⁴ Přítomnost bakteriálního antigenu také vyvolává u pacientů tvorbu neutralizačních protilátek, které způsobují rychlý pokles aktivity ASNázy, tzv. „tichou inaktivaci“. To má za následek snížení efektivity a zvýšení rizika relapsu.⁴⁵ Díky PEG-úpravě ASNázy došlo ke snížení výskytu hypersenzitivních reakcí. Pokud k nim i tak dojde, bývá indikována Erwináza.

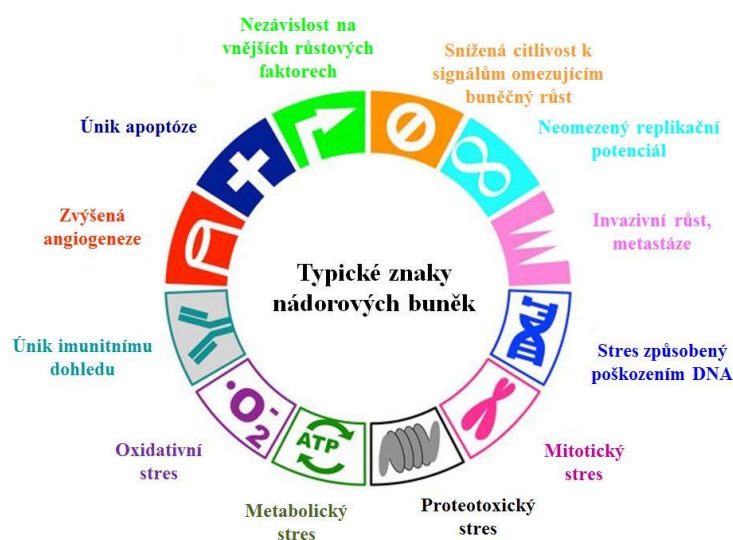
Mezi další nežádoucí účinky patří neurotoxicita, která je spojována se sekundární glutaminázovou aktivitou.⁴⁶⁻⁴⁹ V některých případech ASNáza vyvolává pankreatitidu, krvácení, trombózu, hyperglykémii, hypoglykémii, hyperlipidémii, hyperbilirubinémii a disfunkci jater.⁵⁰⁻⁵²

1.3.6 Další použití ASNázy

ASNáza je zahrnuta do léčebných protokolů pouze v případě ALL, a non-Hodgin lymfomů, její potenciální terapeutický účinek se však studuje i u jiných typů hematologických malignit. Cytotoxický účinek ASNázy byl potvrzen na primárních AML buňkách.⁵³ Použití ASNázy u solidních nádorů je komplikované, protože je ASNáza pouze omezeně transportována z vaskulárního do extravaskulárního prostředí.⁵⁴ Přesto existují studie, které se případným použitím ASNázy pro léčbu solidních tumorů zabývají. Jedná se především o nádory ovarií, u kterých preklinické studie prokázaly sensitivitu k ASNáze.⁵⁵⁻⁵⁷ Druhá fáze klinických studií však byla pro vysokou toxicitu ASNázy ukončena.⁵⁸ Účinek ASNázy je dále studován u hepatocelulárního karcinomu, nádoru pankreatu, nádoru prostaty a nádoru mozku.⁵⁹⁻⁶³

1.4 Metabolické změny nádorových buněk

Nepřetržitý vývoj znalostí biologie nádorových buněk ukazuje, že jsou nádorová onemocnění značně heterogenní. Nádorová onemocnění lze rozdělit dle orgánového či tkáňového původu, případně podle molekulárního subtypu, čímž získáme velmi velké množství podskupin, které se liší prognózou, terapií a výsledkem léčby.⁶⁴ Pokrok v sekvenování DNA a v dalších analytických technologiích umožnil rozlišit genetické heterogenity mezi histologicky podobnými tumory a rozdílné fenotypy buněk z jedné nádorové populace.⁶⁵ Existuje však řada společných rysů, zahrnující různé biologické vlastnosti a schopnosti, které nádorové bujení usnadňují (Obr. 2). Jedním z těchto rysů, který byl poprvé popsán již téměř před sto lety, je deregulovaný metabolismus.



Obr. 2 - Typické znaky nádorových buněk
(Upraveno z Hanahan D et al, 2011)

1.4.1 Warburgův efekt

Nádorové buňky mají v porovnání s buňkami zdravými jiný metabolický profil, respektive upřednostňují jiné metabolické dráhy.⁶⁶ Zdravé diferencované buňky tvoří ATP v aerobních podmínkách prostřednictvím oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation, OXPHOS). V anaerobních podmínkách využívají méně efektivní glykolýzu. Během OXPHOS vzniká z jedné molekuly glukózy 36 molekul ATP, anaerobní glykolýzou vzniknou z jedné molekuly glukózy dvě molekuly ATP. Nádorové buňky mají zvýšenou spotřebu glukózy, přičemž jen její menší frakce je oxidována v Krebsově cyklu. Většina glukózy je i v přítomnosti kyslíku použita na produkci laktátu, proto se tato reakce nazývá aerobní glykolýza. Fenomén zvýšení

aerobní glykolýzy na úkor OXPHOS byl dle objevitele pojmenován Warburgův efekt.⁶⁷
⁶⁸ Důvody, proč nádorové buňky s prokazatelně vyššími energetickými nároky používají méně efektivní glykolýzu, se stále studují. Původní hypotéza, že mají nádorové buňky poškozené mitochondrie, již byla vyvrácena.⁶⁹ Proč tedy k Warburgově efektu dochází? Zvýšený obrat glukózy je pro nádorové buňky výhodný. Ačkoliv v průběhu glykolýzy vzniká méně molekul ATP než během OXPHOS, glykolytický tok je dostatečně rychlý na to, aby energetické nároky pokryl. Během degradace glukózy navíc vzniká množství meziproductů potřebných pro biosyntetické dráhy, včetně ribózových cukrů na tvorbu nukleotidů; glycerolu a citrátu na syntézu lipidů; neesenciálních aminokyselin; a redukovaná formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), prostřednictvím pentózového cyklu.⁷⁰

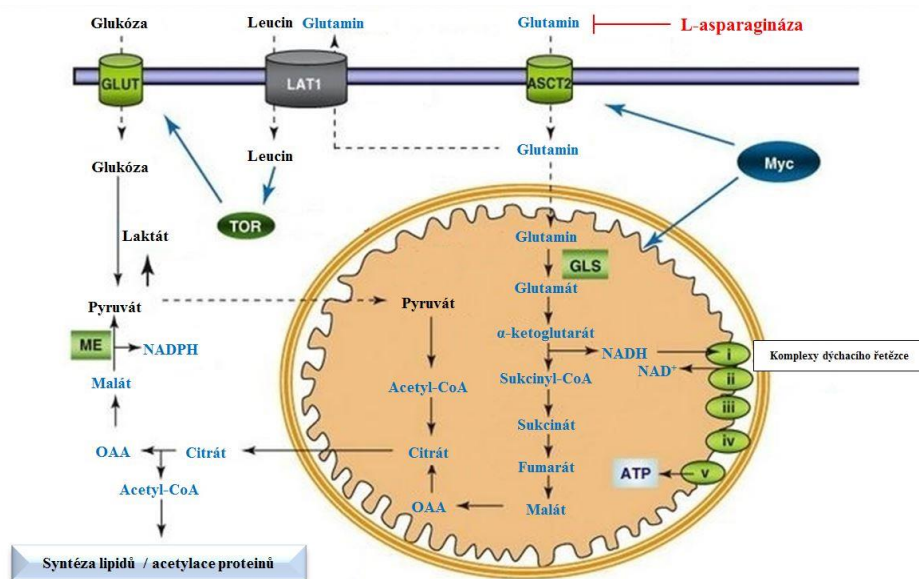
1.4.2 Závislost na glutaminu

Významným substrátem je kromě glukózy také glutamin (Obr. 3). Proliferující buňky mají vysokou spotřebu glutaminu, což dokazuje, že je glutamin jako substrát velmi univerzální.

Metabolismus glutaminu lze rozdělit dle využití γ -dusíku (syntéza nukleotidů, hexosaminů), α -dusíku nebo uhlíkového řetězce. Druhé dva typy reakcí využívají jako substrát glutamát. Ačkoliv mají nádorové buňky vysoký obsah intracelulárního glutamátu, udržení této hladiny závisí na schopnosti konvertovat glutamin na glutamát, protože glutaminu je v extracelulárním prostředí na rozdíl od glutamátu dostatek. Tento proces je umožněn přítomností glutaminázy, mitochondriálního enzymu, který je vysoce exprimován v nádorových buňkách. Bylo prokázáno, že glutaminázová aktivita koreluje s růstem tumorů *in vivo*.^{71, 72} Na experimentálních modelech bylo potvrzeno, že inhibice glutaminázové aktivity vede k poklesu růstu nádorových buněk a xenograftů.^{73, 74} Glutamin je proto považován v případě nádorového růstu za esenciální.^{75, 76, 77}

V některých nádorových buňkách je glutamin primární mitochondriální substrát a je potřebný pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu. Deaminací glutaminu na pyruvát navíc vzniká NADPH, který je nutný pro syntézu lipidů a pro redoxní kontrolu. Dochází tím také k doplnění intermediátů Krebsova cyklu. Dále je glutamin potřebný pro vstřebávání aminokyselin a aktivaci kinázy mammalian target of rapamycin (mTOR), viz dále.

Glutamin se podílí na metabolismu, buněčné signalizaci a genové expresi, proto je snaha využít terapeutika, která zasahují do metabolismu glutaminu, velmi atraktivní a opodstatněná.



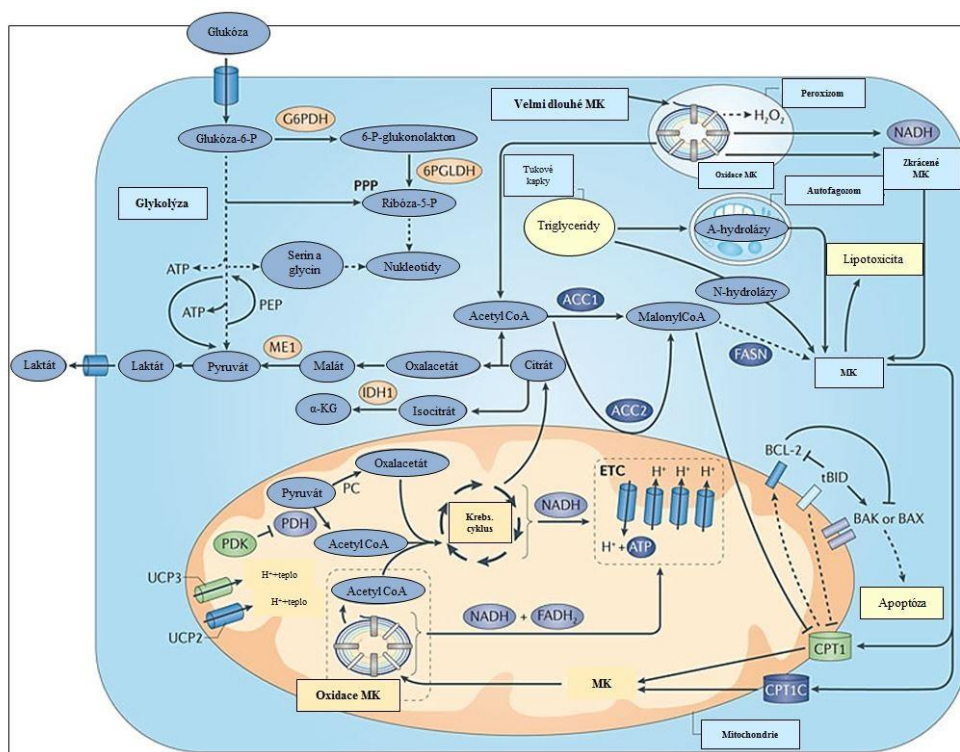
Obr. 3- Přehled metabolismu glutaminu
(Upraveno z Wise DR et al, 2010)

1.4.3 Metabolismus mastných kyselin

Další typ metabolické alterace zahrnuje oxidaci lipidů a MK. MK jsou zdrojem energie, složkou membrán a slouží jako signální molekuly. MK mohou být exogenního původu nebo vznikají *de novo* syntézou. Zdravé lidské buňky preferují exogenní zdroje MK, zatímco pro nádorové buňky je hlavním zdrojem *de novo* syntéza.⁷⁸ Oxidace MK produkuje dvojnásobné množství ATP než oxidace sacharidů.⁷⁹ K oxidaci MK dochází v mitochondriích a peroxisomech, nicméně hlavním místem oxidace jsou mitochondrie.⁸⁰ Během oxidace MK dochází k sérii reakcí, v každém cyklu se MK zkrátí o dva uhlíky za vzniku NADH, FADH₂ a acetyl-CoA. NADH a FADH₂ vstupují do elektronového transportního řetězce a produkují ATP. Acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu, kde také vzniká ATP a dále se tvoří redukční ekvivalenty, které jsou nutné pro elektronový transportní řetězec a další biologické procesy.⁷⁹

Před vlastní oxidací musí dojít k aktivaci MK a transportu do mitochondrie. MK v aktivované formě (acyl-CoA) nemohou projít přes mitochondriální membránu, proto musí být transportovány pomocí karnitinového přenašeče (Carnitine palmitoyl transferáza 1, CPT1). CPT1 se nachází na vnější mitochondriální membráně a konjuguje aktivované MK s karnitinem za vzniku acyl-karnitinu. CPT1 je pro oxidaci MK klíčová,

vykazuje až 80% kontrolu nad oxidací MK.⁸¹ Jakmile dojde k přenosu acyl-karnitinu do mitochondrie, CPT2, která se nachází na vnitřní mitochondriální membráně, přemění acyl-karnitin zpět na acyl-CoA, který již může podstoupit oxidaci.⁸⁰ Oxidace MK je pro přežívání buněk esenciální. Inhibice může vést až k buněčné smrti, která je způsobená jak akumulací lipidů (lipotoxicitou) tak nedostatkem metabolických meziproductů.^{79, 82}



Obr. 4 – Účinek oxidace MK na metabolismus nádorových buněk
(Upraveno z Carracedo A et al, 2013)

1.5 Metabolismus leukemických buněk

Většina dosavadních studií se zabývala metabolismem solidních nádorů. Charakter leukemických buněk je značně odlišný a není tak dobře prozkoumán. Některé metabolické alterace byly již nicméně popsány i u leukemií. Autoři Samudio *et al.* potvrdili, že i leukemické buňky produkují i v přítomnosti kyslíku laktát, což rekapituluje Warburgův efekt.^{82, 83} Tyto metabolické změny mohou být pro leukemické buňky výhodné. Jak již bylo uvedeno, použití i jiných uhlíkových zdrojů než je glukóza, hraje významnou roli v biosyntetické kapacitě. Schopnost využívat místo OXPHOS glykolýzu je pro proliferující leukemické buňky výhodou i z důvodu hypoxického prostředí v KD.

Leukemické buňky jsou schopné využívat pro doplnění intermediátů Krebsova cyklu kromě glutaminolýzy také acetyl-CoA vzniklý oxidací MK.^{82, 83} Zdá se, že vysvětlení charakteristického metabolického profilu souvisí s expresí odpřažovacího proteinu 2 (uncoupling protein 2 (UCP2)). UCP jsou mitochondriální proteiny, které zvyšují propustnost vnitřní mitochondriální membrány pro protony. Autoři Skrtic *et al.* objevili u AML buněk zvýšenou mitochondriální biogenesi.⁸⁴ Dále bylo popsáno, že mají leukemické buňky zvýšenou expresi genu pro *UCP2*.^{83, 85} Odpřažené mitochondrie mají snížený protonový gradient, což znemožňuje produkci ATP. Dochází k metabolické přeměně, protože se zvyšuje oxidace uhlíkových zdrojů, jako jsou MK nebo glutamin.^{85, 86} Odpřažení mitochondrií také způsobuje zvýšení hladiny proteinů Bcl-2, což vede k rezistenci k apoptóze.^{82, 86}

Dalším významným objevem souvisejícím s metabolismem leukemických buněk bylo odhalení mutace v genu pro isocitrát dehydrogenázu (*IDH*). *IDH* protein katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na α -ketoglutarát (α -KG). Mutantní proteiny *IDH1* a *IDH2* katalyzují reakci α -KG za vzniku onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu (2-HG), který se v buňkách akumuluje.^{87, 88} 2-HG ovlivňuje rodinu proteinů „tet methylcytosine dioxygenase“, což vede k poškození hydroxymetylace DNA a epigenetické kontroly.⁸⁹ Přítomnost mutace *IDH1/2* byla potvrzena u pacientů s AML (5-20 %), pediatrických pacientů s ALL (6,5 %), CML (3,7 %) a 3 % pacientů s chronickou myelomonocytární leukemií (CMML). Mutace *IDH* koreluje s nižším přežitím pacientů s AML.⁹⁰

1.5.1 Využití v terapii

Studium metabolismu nádorových buněk zažívá v posledních letech renesanci. Stále více prací zabývajících se rezistencí k terapii již přihlíží i k metabolickým příčinám.

Charakteristických metabolických vlastností nádorových buněk se využívá k cílené terapii metabolickými inhibitory, které zvyšují účinnost konvenčních látek.

Jako příklad může posloužit rezistence na glukokortikoidy u T-ALL, jejíž příčina byla spojena s vyšší glykolytickou aktivitou rezistentních buněk. Kombinace inhibitorů glykolýzy, metabolismu cholesterolu a buněčné respirace s metylprednisonem zvýšila jeho cytotoxický účinek.⁹¹

Nejvíce poznatků týkajících se využití charakteristických metabolických změn pro cílenou terapii bylo v rámci leukémií popsáno u AML. U AML buněk rezistentních na cytarabin byla prokázána závislost na argininu, deplece argininu potencovala cytotoxický účinek cytarabinu.⁹² Jiná práce zdůrazňuje závislost AML buněk na glutaminu a možné využití ASNázy pro terapii AML.⁵³ V případě AML byl také potvrzen význam oxidace MK pro buněčné přežívání, inhibice oxidace MK zvyšovala apoptózu.⁸² V preklinických studiích jsou také inhibitory mutovaného proteinu IDH, jehož funkce byla popsána v části 1.5.⁹³⁻⁹⁶

Při porovnání ALL a AML buněčných linií senzitivních a rezistentních k daunorubicinu byl popsán metabolický profil rezistentních buněk, který se vyznačoval sníženou závislostí na glutaminu, vyšší spotřebou glukózy a rozdílnou aktivitou oxidace MK.⁹⁷ Všechny uvedené charakteristiky jsou proto potenciální cíle pro kombinovanou terapii.

Kromě intracelulárních vlastností hraje významnou roli také prostředí KD. Bylo prokázáno, že se hypoxie podílí na rezistenci CML k inhibitorům tyrosin kinázy.⁹⁸

Bioenergetická rovnováha je pro přežití nádorových buněk velmi důležitá. Její prostudování a cílené narušení proto může velmi výrazně přispět k úspěšné terapii nádorových onemocnění.

1.6 mTORC1

Mezi významné regulátory buněčného metabolismu patří signální dráha fosfatidylinositol-3-kináza (PI3 kináza, PI3K), Akt a mTOR (PI3K/Akt/mTOR) (Obr. 5). Dráha PI3K/Akt/mTOR je u nádorových onemocnění často deregulovaná a podílí se na patogenezi několika typů leukemií včetně AML, T-ALL a pre-B ALL.^{99, 100}

Kináza mTOR reaguje na množství extracelulárních a intracelulárních podnětů. Tvorbou dvou fyziologicky a funkčně odlišných komplexů má centrální úlohu v homeostatické kontrole buněčného růstu, proliferace a přežívání. mTOR je tvořen proteinovými komplexy 1 a 2 (mTORC1, mTORC2). mTORC1 se skládá z proteinů

Raptoru (Regulatory associated protein of mTOR) a mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8). mTORC2 se skládá z proteinů Rictor (Rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian Stress activated protein kinase interacting protein 1) a mLST8. Oba dva komplexy mají další podjednotky, které nejsou pro jejich funkci nutné. Základní rozdíl mezi komplexy mTOR je citlivost k rapamycinu, který při krátkodobém podání inhibuje pouze komplex mTORC1. Vzhledem k tomu, že byl komplex mTORC2 objeven později, se většina poznatků o úloze v tumorigenezi týká komplexu mTORC1. mTORC1 reguluje řadu buněčných procesů, jako je proteinová syntéza, *de novo* syntéza pyrimidinů, autofagie a metabolismus.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Aktivita mTORC1 je závislá na přítomnosti aminokyselin. Autoři Sancak *et al* popsali, že pro aktivaci mTORC1 aminokyselinami jsou nutné proteiny Rag, skupina 4 guanosinových trifosfatů (GTPázy). Proteiny Rag neaktivují mTORC1 přímo, ale podněcují intracelulární lokalizaci mTOR směrem ke kompartmentu, který obsahuje aktivátor mTOR, protein Rheb.¹⁰⁵

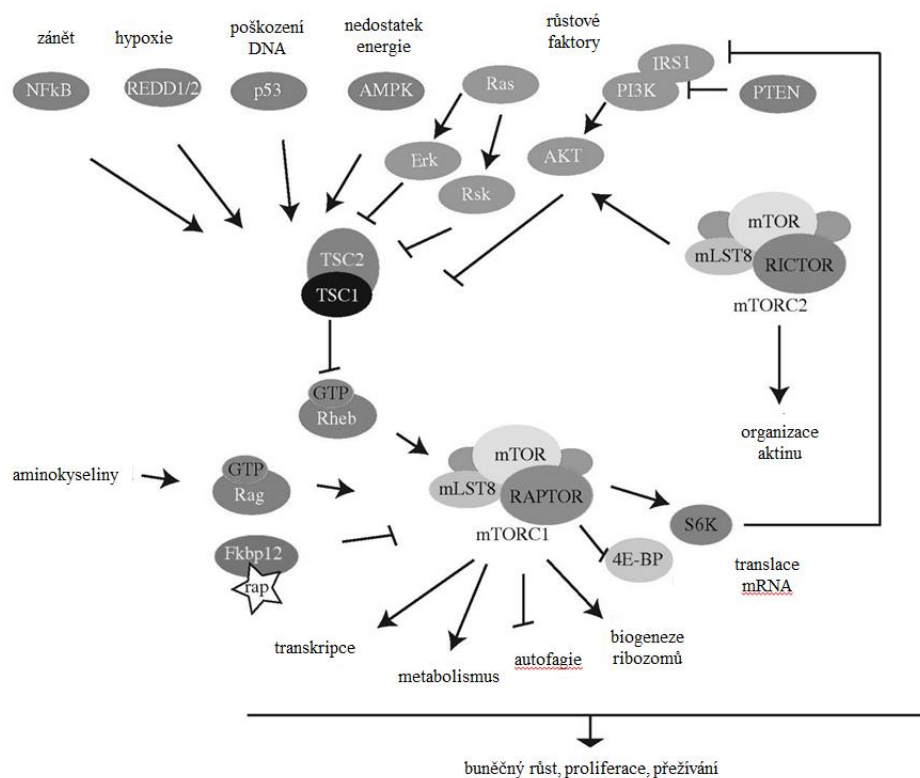
Mezi nejlépe popsané cíle komplexu mTORC1 patří ribosomální kináza p70S6 (p70S6K1 a p70S6K2) a eukaryotický iniciační faktor 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding proteins). V závislosti na růstových stimulech se mTORC1 spojí s eukaryotickým iniciačním faktorem 3 (eIF3) a reguluje iniciaci translace fosforylací substrátu p70S6K a 4E-BP1. Fosforylace p70S6K1 aktivuje, ta následně fosforyluje ribosomální protein S6 a eIF4B. mTORC1 defosforyluje 4E-BP1 což způsobuje uvolnění eIF4E, který se připojí k iniciačnímu komplexu a umožní tak zahájení translace. p70S6K fosforyluje i protein CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, a dihydroorotase), který katalyzuje první tři kroky *de novo* syntézy pyrimidinů. mTORC1 tak prostřednictvím fosforylace p70S6K stimuluje pyrimidinovou syntézu.¹⁰⁶

Autofagie je hlavní lyzozomální dráha recyklující intracelulární komponenty. Bazální autofagie slouží eliminaci poškozených organel, které by pro buňku mohly být toxické. V případě nedostatku živin dochází k aktivaci autofagie s cílem doplnit potřebné zdroje a zajistit tak přežití.^{107, 108} Autofagie je indukovaná celým spektrem signálů, na základě kterých degraduje proteiny, oxidované lipidy, proteinové agregáty, poškozené organely i intracelulární patogeny. V časných stádiích nádorového onemocnění může mít autofagie tumorsupresivní funkci, ale také může zajišťovat doplňování nutrientů pro rostoucí nádorovou masu. Stimulace autofagie tak může způsobovat zlepšení i zhoršení odpovědi na léčbu.^{108, 109} V průběhu autofagie dochází

k tvorbě speciálních vesikulů, autofagosomů, které dopravují náklad k lyzozomům a spojením vytváří autofagolyzosomy. Zahájení tvorby autofagosomů je regulováno komplexem ULK1 (Unc51-like kinase 1), který je regulován prostřednictvím mTORC1. Pře nedostatku živin dochází k inhibici mTORC1, která způsobí aktivaci autofagie. Autofagie může být aktivovaná i nezávisle na mTORC1.¹¹⁰⁻¹¹²

Aktivita mTORC1 je klíčová i pro metabolismus lipidů. mTORC1 aktivuje nukleární receptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), který reguluje vstřebávání MK. mTORC1 ovlivňuje MK prostřednictvím kinázy S6, u myši s deficientní p70S6K dochází k aktivaci oxidace MK.¹¹³

Vzhledem k tomu, že ASNáza depletuje asparagin a glutamin, její účinek na mTORC1 byl již v ALL studován. Iiboshi *et al.* potvrdili, že podání ASNázy inhibuje dráhu mTORC1, na úrovni p70S6K.¹¹⁴ Účinek ASNázy na další cíle mTORC1 v ALL studován nebyl. Na modelu AML a ovariálních nádorů bylo ukázáno, že deplece glutaminu po podání ASNázy aktivuje autofagii a ta je klíčová pro přežívání.^{53, 115} Inhibice autofagie v deprivovaných podmínkách aktivovala apoptózu. Lze tedy předpokládat, že ASNáza ovlivňuje v ALL i další cíle dráhy mTORC1.



Obr. 5 – Signální dráha mTOR

(Upraveno z McCromick MA *et al.*, 2010)

2. Vymezení cílů a základní hypotézy práce

V naší práci jsme chtěli potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že se jednotliví ALL pacienti liší v citlivosti k ASNáze v důsledku rozdílné hladiny exprese genu pro *ASNS*. Dále jsme se chtěli zaměřit na podrobné prostudování mechanismu účinku tohoto léčiva. ASNáza enzymaticky rozkládá asparagin a glutamin, přičemž obě aminokyseliny jsou pro leukemické buňky esenciální. Předpokládali jsme proto, že v důsledku jejich deplece dochází ke změnám v buněčné signalizaci a k narušení metabolické homeostázy. Dále jsme se domnívali, že podrobné popsání mechanismu účinku ASNázy by mohlo odhalit novou „Achillovu patu“ leukemických buněk, díky které by bylo možné cílenou terapií zvýšit cytotoxický účinek ASNázy. Naše cíle byly následující:

1. stanovení významu hladiny exprese genu pro *ASNS* v cytotoxickém účinku ASNázy v ALL patientských vzorcích
2. stanovení expresního profilu ALL buněk s rozdílnou citlivostí k ASNáze
3. odhalení klíčových signálních a metabolických drah, jejichž aktivita je v ALL buňkách po podání ASNázy ovlivněna
4. objasnění regulace účinku ASNázy
5. navržení kombinované terapie, která by zvýšila cytotoxický účinek ASNázy v ALL buňkách
6. určení podílu deplece asparaginu a glutaminu na celkovém cytotoxickém účinku ASNázy

3. Materiál a metody

3.1 Pacientské vzorky a zdravé kontroly

Diagnostické vzorky KD pacientů s BCP ALL byly získány z léčebných center Pracovní skupiny dětské hematologie ČR (PSDH, ČR). Základní charakteristika pacientů je shrnuta v Tab. 1. Materiál byl zpracován v souladu s informovaným souhlasem pacientů. Povolení práce se vzorky bylo schváleno etickou komisí 2. lékařské fakulty UK. Kontrolní vzorky periferní krve (PK) zdravých dárců byly získány z Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT, Praha, ČR).

3.2 Zpracování vzorku

Vzorky KD pacientů a PK zdravých kontrol byly odebrány do sterilních zkumavek s antikoagulancii, transportovány do laboratoří a poté ihned zpracovány.

3.2.1 Izolace mononukleárních buněk z KD pacientů

Mononukleární buňky byly z KD separovány centrifugací pomocí hustotního gradientu (Ficoll-Paque Research Grade, PharmaTech, New Jersey, USA). Buňky promyté fosfátovým pufrům (Phosphate Buffered Saline, PBS; lékárna FN Motol, Praha, ČR) byly následně zamrazeny nebo kultivovány.

3.2.2 Izolace mononukleárních buněk z PK zdravých dárců

Mononukleární buňky jsme izolovali z PK za využití systému RosetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Metoda je založena na principu negativní selekce. Koktejl obsahuje bispecifické protilátky, které interagují s povrchovými antigeny hematopoetických buněk (mimo B-lymfocytů) i s povrchový antigenem erytrocytů, glykoforinem A. Dochází k tvorbě rozet, které jsou díky vyšší denzitě odstraněny centrifugací v hustotním gradientu. Pracovní postup byl prováděn podle doporučení od výrobce. Buňky promyté PBS byly následně kultivovány.

3.3 Buněčné linie

BCP ALL buněčné linie REH (*TEL-AML1*[+], t(12;21)), UOCB-6 (*TEL-AML1*[+]), RS4;11 (*MLL-AF4*[+]) a NALM-6 (*TEL-PDGFRB1*[+]), byly zakoupeny u Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Human and Animal Cell Lines Database, Německo). Při přípravě virových partikulí byly používány buňky HEK293T a NIH3T3 (Ústav molekulární genetiky AVČR Praha).

3.3.1 Kryoprezervace

Zamrazovací zkumavky se směsí o složení 600 μ l buněčné suspenze, 300 μ l inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS; Life technologies, Carlsbad, USA) a 100 μ l 99% dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) jsou přes noc uloženy v zamrazovací nádobě Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA) při teplotě -80 °C. Mr. Frosty je naplněn isopropanolem a díky tomu dochází k postupnému promrazení vzorku. Poté jsou zkumavky uloženy do boxu s tekutým dusíkem pro dlouhodobé skladování.

3.3.2 Kultivace buněčných linií

Leukemické buňky jsme pěstovali v kultivačním médiu RPMI 1640 (Life technologies, Carlsbad, USA) s 10% FBS a směsí antibiotik s antimykotiky (Antibiotic-Antimycotic, 100X; Life technologies, Carlsbad, USA). V případě mononukleárních buněk izolovaných z PK zdravých dárců kultivační médium navíc obsahovalo stimulační faktory interleukin-21 (50 ng/ml) a interleukin-2 (50 ng/ml)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Buňky HEK293T a NIH3T3 byly kultivovány v médiu DMEM (Life technologies, Carlsbad, USA) s 10% FBS. Buňky byly drženy v kultivátorech při teplotě 37 °C s 5 % CO₂ (HERAcell 150 CO₂ (ThermoScientific, Wilmington, USA).

3.3.3 Příprava leukemických buněk pro experimenty *in vitro*

Pokud není u jednotlivých metod uvedeno jinak, tak jsme před každým experimentem leukemickou buněčnou linii centrifugovali 5 minut rychlostí 1000 otáček za minutu (revolutions per minute; rpm) a nasadili o koncentraci 0,5 milionu buněk na 1 ml kultivačního média. Po 24 hodinách jsme přidali ASNázu (Medac GmbH, Hamburg, Německo) o koncentraci 0,5 a 4 IU/ml a kultivovali dalších 24 hodin. Poté jsme buňky centrifugovali, peletu promyli v PBS a použili k jednotlivým experimentům. Koncentrace ASNázy byly vypočítány na základě dávek, které se používají při léčbě pacientů s ALL.

3.3.4 Příprava leukemických buněčných linií rezistentních k ASNáze

Leukemické linie REH a NALM-6 jsme dlouhodobě pěstovali s nízkou dávkou ASNázy a průběžně jsme metodou MTS měřili citlivost k ASNáze. Použitá dávka byla vybrána na základě senzitivity parentální linie. Linií NALM-6 jsme pěstovali s dávkou 0,04 IU/ml a linií REH s dávkou 0,0012 IU/ml. Obě dvě linie jsme paralelně kultivovali bez ASNázy. Jakmile byl rozdíl v citlivosti mezi parentální linií a linií inkubovanou

s ASNázou více než desetinásobný, připravili jsme vzorky na analýzu expresního profilu.

3.4 Stanovení genové exprese

V rámci našeho projektu, jsme vyšetřovali expresi genu pro *ASNS* a *c-Myc* metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR).

3.4.1 Izolace nukleových kyselin

RNA jsme izolovali pomocí RNeasy Mini kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Kvalitu a koncentraci výsledné RNA jsme zkontrolovali pomocí spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, USA).

3.4.2 Reverzní transkripce

RNA ve výchozím množství 1 µg byla přepsána do cDNA reverzní transkriptázou pomocí kitu iScript (BioRad, Hercules, USA).

3.4.3 qRT-PCR

ASNS a *c-Myc* transkript byl detekován pomocí Power SYBR Green PCR Master Mixu (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a specifických primerů (500nM). cDNA tvořila 10 % mixu. Gen $\beta 2$ microglobulin (*$\beta 2M$*) byl vybrán jako dostatečně stabilní tzv. „housekeeping“ gen. Reakční směs pro detekci *$\beta 2M$* obsahovala: 2 µl 10x koncentrovaného pufru (Life Technologies, Carlsbad, USA), 2,5mM MgCl (chlorid hořečnatý; Life Technologies, Carlsbad, USA), 200µM dNTPs (deoxyribonukleotidy; LifeTechnologies, Carlsbad, USA), 500nM forward a reverse primery, 200nM fluorescenční hybridizační sondy značené fluoresceinem a LC Red 640, 0,2 µl polymerázy Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Carlsbad, USA), cDNA (5% RT mixu) a 95 µl sterilní vody. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 2. PCR reakce probíhala na přístroji LightCycler®480 Real-Time PCR machine (Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko). Reakční podmínky byly následující: 95°C 10 min; 40 cyklů skládajících se z 15 s při 95°C a 60 s při 60°C (*ASNS*, *c-Myc*). 95°C 10 min; 41 cyklů skládajících ze 3 s při 95°C, 10 s při 62°C a 5 s při 72°C (*$\beta 2M$*).

Hodnoty exprese *$\beta 2M$* byly použity pro normalizaci expresních dat *ASNS* a *c-Myc* dle rovnice $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, kde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ vzorek} - \Delta Ct \text{ kontrola}$; $\Delta Ct = Ct \text{ studovaný gen} - Ct \beta 2M$.

3.5 Stanovení expresního profilu ALL buněčných linií

Expresní profil ALL buněčných linií jsme stanovili pomocí mikročipové technologie.

3.5.1 Příprava vzorků

Z linií REH, NALM-6 a jejich rezistentních protějšků (rezREH, rezNALM-6) jsme pomocí RNeasy mini-kitu izolovali RNA. Koncentrace, čistota a integrita výsledné RNA byla kontrolována spektrofotometrem NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) a kapilární elektroforézou s využitím čipové technologie – Agilent 2100 Bioanalyzér (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Z analýzy jsme vyloučili vzorky, které měly „RNA integrity number“ (RIN) menší než 7, poměr absorpance 260/280 menší než 1,8 a poměr absorpance 260/230 menší než 1,6.

3.5.2 Měření expresního profilu

Expresní profil byl změřen pomocí NimbleGen Human Gene Expression microarray 4x72K, HG18, NCBI 36 (Roche Nimblegen Inc., USA). Čip byl skenován při rozlišení 2 μm na přístroji InnoScan 900 (Innopsys, France). Analýza obrázku byla provedena v softwaru NimbleScan 2.6 software (Roche NimbleGen, USA).

3.5.3 Analýza expresního profilu

Analýza dat byla provedena pomocí softwaru GeneSpring GX 12.6 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Expresní profil parentálních a rezistentních linií byl porovnán jednoparametrickým t-testem s „false discover rate“ (FDR) menším než 0,05; p-hodnoty byly korigovány pomocí Benjamini-Hochberg korekce. Pro porovnání dat mezi danými skupinami byl použit i test „Kruskal-Wallis“ (FDR < 0,05). Identifikace společných a unikátně exprimovaných genů byla provedena pomocí Vennova diagramu. Výsledné skupiny genů byly analyzovány softwarem MetaCore pathway analysis software (GeneGo Inc., St Joseph, MO, USA). Funkční vztahy mezi jednotlivými geny byly objeveny pomocí funkce „Enrichment analysis tool for GeneGo and GO ontologies with canonical pathways, networks and diseases“, která je založena na vyhledávání v dostupných GeneGo databázích. Nástroj „Top GeneGo Pathway Maps“ popisuje logické celky obsahující kanonické dráhy ověřené alespoň ze tří literárních zdrojů. Nástroj „GeneGo Networks“ zobrazí síť jednotlivých interakcí, které mohou, ale nemusí obsahovat kanonické dráhy.

3.6 Detekce proteinů metodou Western blot

V rámci této metody byl z iniciální suspenze buněk připraven proteinový lyzát. Buňky byly dvakrát promyty PBS. Peleta byla resuspendována lyzačním pufrem s následujícím složením: 1% Triton-X-100 (Merck, Darmstadt, Německo); 0,1% dodecylsulfát sodný (sodium dodecylsulfát, SDS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 2mM kyselina etylendiamin tetraoctová (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 150mM chlorid sodný (NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 50mM (tris(hydroxymethyl)aminomethan s kyselinou chlorovodíkovou (Tris-HCl, pH=7,5; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 50mM fluorid sodný (NaF; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1mM ortovanadát sodný (Na₃VO₄; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); koktejl proteázových inhibitorů (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko); 1mM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko) a 0,002M chlorid hořečnatý (MgCl₂; Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko). Lyzát jsme inkubovali za občasného vortexování 20 minut na ledu a poté centrifugovali 10 minut rychlostí 14 000 rpm při teplotě 4 °C. Supernatant jsme skladovali při -80 °C. Koncentrace proteinových lyzátů jsme stanovili spektrofotometricky pomocí RC DC Protein Assay Kit I (BioRad, Hercules, USA). Pro vytvoření standardní křivky byl použit albumin bovinního séra. Dle vypočítané koncentrace jsme smíchali proteinový lyzát se vzorkovým pufrem NuPAGE® LDS Sample Buffer a redukčním činidlem NuPAGE® Sample Reducing Agent (Life technologies, Carlsbad, USA). Vzorek jsme inkubovali 10 minut při 70 °C. Proteiny byly separovány elektroforeticky v Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus Gelu (Life technologies, Carlsbad, USA) pomocí aparatury Bolt® Mini Gel Tank (Life technologies, Carlsbad, USA). Proteiny rozdělené podle své velikosti byly poté z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (BioRad, Hercules, USA) za použití Wet/Tank Blotting System (BioRad, Hercules, USA). Membránu s navázanými proteiny jsme 1 hodinu inkubovali v 5% blokačním pufru, který jsme připravili rozpuštěním Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (BioRad, Hercules, USA) v roztoku Tris-Buffered Saline s tweenem (TBST; 50mM Tris-Cl, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,2% tween BioRad, Hercules, USA) a poté přes noc inkubovali v primární protilátce. Seznam použitých protilátek je uveden v Tab. 3. Následující den jsme membránu promyli v TBST a inkubovali s příslušnou sekundární protilátkou (goat anti-rabbit nebo goat anti-mouse; BioRad, Hercules, USA) v 1% roztoku blokačního pufru. Pro vizualizaci navázané

protilátky jsme použili detekční kit o složení 0,1 M Tris (pH 8,5), 0,2 mM kyselina p-kumarová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1,25 mM luminol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 3% peroxid vodíku (H₂O₂; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Výsledná chemiluminiscence byla zachycena na světločivém filmu (Kodak, Rochester, NY, USA), který byl následně vyvolán na přístroji OptiMax X-ray Processor (ClassicXray, Rolla, USA). Pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorku jsme na každé membráně detekovali protein β -aktin. Po naskenování vyvolaného filmu jsme kvantifikovali množství proteinů pomocí volně dostupného softwaru ImageJ.

3.7 *In vitro* cytotoxický test

In vitro cytotoxicita ASNázy byla stanovena testem s 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS; AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Test je založen na redukci MTS na formazan, která probíhá v živých buňkách pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Množství vzniklého produktu se hodnotí spektrofotometricky.

Leukemické buňky (0,12 milionu/1 ml) byly inkubovány v 96-jamkové destičce s osmi různými koncentracemi ASNázy (4 až 4E-07 IU/ml v desítkovém ředění) v triplicátě. Kontrolní vzorek, který ASNázu neobsahoval, jsme použili pro normalizaci dat. Jamka obsahující pouze kultivační médium sloužila k odečtení pozadí. Po 72 hodinách inkubace (37 °C, 5% CO₂) jsme do každé jamky přidali 14 μ l MTS. Po dalších 3 hodinách inkubace jsme na spektrofotometru VersaMAX Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) změřili množství vznikajícího formazánu.

3.8 RNA interference (RNAi)

Pro inhibici exprese genu pro *ASNS* jsme zvolili metodu elektroporace malé interferující RNA (small interfering RNA, siRNA).

Buňky jsme transfekovali pomocí elektroporátoru EPI2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg, Německo) za použití kyvet 0.4-cm gap Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes (BioRad, Hercules, USA). Podmínky transfekce byly: 1 pulz, 10 ms, 350 V, 1200 μ F. Použitá siRNA proti genu *ASNS* byla směsí 4 siRNA komplementárních k různým sekvencím genu, čímž byla zvýšena úspěšnost umlčení (ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs, Dharmacon). Abychom dosáhli gradientového snížení exprese genu pro *ASNS*, použili jsme 5 různých koncentrací siRNA (0,78 μ mol, 1,56 μ mol, 3,13 μ mol, 6,25 μ mol a 9,38 μ mol). Kontrolní buňky byly transfekovány za stejných podmínek siRNA,

kteřá nebyla namířena proti žádnému lidskému genu (ON-TARGETplus Non-Targeting Pool siRNAs, Dharmacon). Buňky jsme kultivovali 24 hodin a poté jsme metodou qRT-PCR stanovili expresi genu pro *ASNS*, metodou Western blot jsme detekovali proteinovou hladinu *ASNS* a MTS testem jsme stanovili citlivost jednotlivých vzorků k ASNáze.

Pro ověření účinnosti transfekce byly buňky transfekovány siRNA konjugovanou s FITC (BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo, for electroporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Úspěšnost transfekce byla ověřena průtokovou cytometrií na přístroji LSR II (BD, San José, USA).

3.9 Hodnocení apoptózy metodou průtokové cytometrie

Detekci apoptických buněk jsme provedli za použití annexinu V-FITC (Exbio, Praha, Česká Republika) a barvení propidium jodidem (PI; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) nebo 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Buňky jsme inkubovali s ASNázou o koncentraci 0, 1, 2, 4, 8 nebo 16 IU/ml; s etomoxirem (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) o koncentraci 0, 25, 100, 200 nebo 400 μM a v kombinaci obou látek. Vzorky jsme dvakrát promyli v PBS. Peletu jsme resuspendovali v 50 μl annexinového pufru (Exbio, Praha, Česká Republika) a poté jsme přidali 5 μl annexinu-V-FITC a 1 μl PI. Vzorky jsme inkubovali v temnu 30 minut při 4 °C. Po inkubaci jsme k buňkám přidali 250 μl annexinového pufru a centrifugovali (5 minut, 2000 rpm). Buňky jsme resuspendovali ve 100 μl annexinového pufru a poté ihned analyzovali na přístroji LSR II (BD, San José, USA). V případě použití DAPI (místo PI) došlo k přidání 1 μl této protilátky do 100 μl buněčné suspenze těsně před měřením.

3.10 Monitorování toku autofagie

Vliv ASNázy na tok autofagie jsme stanovili detekcí proteinu microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) metodou Western blot. Cytosolická forma LC3 (LC3-I) je v průběhu autofagie modifikována na membránově vázanou formu LC3-II. LC3-II se na rozdíl od formy LC3-I nachází na preautofagosomu a autofagosomu, proto je LC3-II využíván jako autofagický znak. Po fúzi autofagosomu a lyzosomu je LC3-II degradován společně s autofagocytovaným materiálem uvnitř lyzosomu. Jako další znak

jsme použili protein p62/SQSTM1, který se stává součástí kompletního autofagosomu a je degradován v autolysosomech, proto jeho hladina v průběhu autofagie klesá.¹¹⁶

Uvedené proteiny jsme detekovali po inkubaci buněk s ASNázou (4 IU/ml) a 100nM bafilomycinem A1 (Baf A1; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) v časech 6, 12 a 24 hodin. Baf A1 inhibuje fúzi autofagosomů s lysosomy. Porovnání účinku ASNázy samotné, BafA1 a kombinace těchto látek slouží k ověření, že zvýšená hladina LC3-II znamená aktivaci autofagie a nejedná se pouze o kumulaci autofagosomů.

3.11 Měření *de novo* syntézy pyrimidinů

Intermediáty pyrimidinové syntézy jsme nechali komerčně změřit na metabolické platformě laboratoře CIC BioGUNE (Španělsko) metodou ultra účinné kapalinové chromatografie s tandemovým vysokorozlišovacím hmotnostním detektorem typu time-of-flight (ultra-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, UPLC-ToF-MS). Pelety buněk byly resuspendovány v 500 μ L roztoku methanol/voda (50/50; v/v%) s 10 mM kyselinou octovou. Buňky byly homogenizovány v Precellys 24® homogenizátoru (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francie) za využití skleněných homogenizujících kuliček (0,5 mm). Každý vzorek byl lyzován ve dvou cyklech (30 sekund, 6000 rpm). Poté bylo do čisté zkumavky odebráno 370 μ L výsledného homogenátu, který byl třepán (30 minut, 1400 rpm, 4 °C). Vzorek byl následně centrifugován (14 minut, 13000 rpm, 4 °C). Supernatant (300 μ L) byl evaporován v rotační vakuové odparce (Savant Speed Vac, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). Pelety byly resuspendovány ve 100 μ L roztoku voda/acetonitril/kyselina mravenčí (39,9/60/0,1 v/v/v%) a centrifugovány (14 minut, 13000 rpm, 4 °C). Výsledný extrakt byl injikován do systému ACQUITY UPLC (Waters). Chromatografická analýza probíhala na ACQUITY UPLC systému na Acquity UPLC Amide koloně (1,7 μ m, 100 mm x 2,1 mm) při teplotě 40° C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,25 ml/1 minutu. Složení mobilní fáze A: 0,5% kyselina mravenčí ve vodě s 10 mM amonnou solí kyseliny mravenčí; složení mobilní fáze B: 0,5% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Čas, po který probíhala analýza, činil 4 minuty. Objem injikovaného vzorku byl 6 μ L. Detekce analytů byla provedena za použití ToF MS, SYNAPT G2 (Waters). Přístroj pracoval za použití elektrosprejového zdroje v negativním módu. Parametry ionizačního zdroje byly následující: kapilární napětí 100 V, teplota zdroje 120 °C a teplota desolvatačního plynu 450 °C. Došlo k separaci iontů podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z) a měření zastoupení jednotlivých druhů

separovaných iontů. Retenční časy byly pro uridinmonofosfát (uridinmonophosphate, UMP) 2,95 min a Uridine 1,68 min. limity detekce UMP 0,5 microM, Uridine 0,05 microM.

3.12 Měření obsahu aminokyselin

Obsah extracelulárních aminokyselin jsme měřili metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) chromatografem Beckman Coulter Gold s fluorescenčním detektorem Merck-Hitachi F-1080 (ex.250nm, em. 395nm) za použití kitu Waters AccQ-Tag(TM) Chemistry Package (Waters) dle pokynu výrobce. Mobilní fáze se skládala z pufru A a 60% acetonitrilu. Stacionární fází tvořila kolona AccQTag Column 3.9 X 150mm (Waters). Vzorek o objemu 10 µl byl derivatizován 70 µl borátového pufru (Waters) a 20 µl derivatizačního činidla (Waters) při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Reakce byla zastavena inkubací při 55°C, která trvala 10 minut. Na kolonu bylo nastříknuto 5 µl této reakční směsi. Rychlost průtoku byla 1ml/min. Výsledky byly vyhodnoceny chromatografickým softwarem DataApex CSW32.

3.13 Měření spotřeby glukózy

Vliv ASNázy na metabolismus glukózy jsme měřili za použití radioaktivně značeného substrátu [³H]-2-deoxyglukózy (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA), což je modifikace metody Dr. Sokoloffa.¹¹⁷ Metoda je založena na faktu, že glukóza a 2-deoxyglukóza (2-DG) jsou transportovány do buněk stejnými přenašeči a fosforylovány enzymem hexokináza. Produkt fosforylace 2-DG, 2-deoxyglukóza-6-fosfát (2-DG6P), se ale na rozdíl od glukózy-6-fosfátu (G6P) kumuluje, protože nemůže být konvertován na analog fruktózy-6-fosfátu. Měřením radioaktivity stanovujeme obsah vznikajícího [³H]-2DG6P.

Buňky byly dvakrát promyty v pufru Krebs-Ringer-HEPES (KRH) (20 mM HEPES, pH 7,4, 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25mM MgSO₄, 1,25mM CaCl₂) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Peletu jsme resuspendovali v 900 µl pufru KRH a inkubovali 15 minut ve 37 °C, poté jsme přidali 100 µl 10x koncentrovaného START roztoku (1 mM 2-deoxyglucose, 5 µCi/ml [³H]-2-deoxyglucose) a inkubovali 10 minut při 37 °C. Buňky jsme dvakrát promyli v PBS a peletu jsme resuspendovali v 1 ml 0,03% SDS a 10 minut inkubovali v 37 °C. Poté jsme 900 µl přepipetovali do scintilační nádoby (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), která obsahovala 5 ml

scintilačního roztoku (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). Radioaktivita byla měřena na přístroji 1900TR liquid scintillation analyzer (Packard). Naměřené hodnoty byly normalizovány ke koncentraci proteinu.

3.14 Stanovení hladiny extracelulárního laktátu

Měření hladiny extracelulárního laktátu, glykolytické produktu, je další způsob stanovení aktivity glykolýzy. Použili jsme Lactate Kit (Trinity Biotech, Bray, Ireland). Metoda je založena na rozkladu laktátu pomocí laktát oxidasy na pyruvát a peroxid vodíku, v jehož přítomnosti křenová peroxidasa katalyzuje oxidativní kondenzaci chromogenních prekurzorů, které poskytnou barevné zbarvení vzorku přímo úměrné koncentraci laktátu. Výsledné zbarvení se měří spektrofotometrem.

Nejdříve jsme počítali živé buňky v 10 μ l suspenze barvením trypanovou modří (Lonza, Basel, Švýcarsko). Zbylou buněčnou suspenzi jsme centrifugovali (5 minut, 1200 rpm) a supernatant jsme použili na stanovení hladiny laktátu. Ke konstrukci kalibrační přímky jsme použili standard Lactate Kit: Standard Set (Trinity Biotech, Bray, Ireland). Naměřené hodnoty jsme normalizovali ke koncentraci proteinu.

3.15 Měření oxidace mastných kyselin

Princip použité metody spočíval v kvantifikaci produktu $^3\text{H}_2\text{O}$, který se uvolňuje při dehydrogenaci acyl-CoA.

3.15.1 Příprava iontově výměnných kolon

Den před měřením oxidace MK jsme připravili iontově výměnné kolony. Do skleněných Pasteurových pipet (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) jsme vložili přibližně 0,5-1 cm skelné vaty (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Smíchali jsme iontově výměnnou pryskyřici DOWEX 1x2 400 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) s vodou (36,7 g/100 ml), napipetovali 2 ml do každé kolony a nechali přes noc prokapat.

3.15.2 Příprava a měření vzorků

Buňky jsme v hexaplikátu přes noc kultivovali s ASNázou (4 IU/ml). Triplikát byl poté použit na kultivaci s médiem obsahujícím kyselinu palmitovou (výsledná koncentrace 100 μ M), karnitin (výsledná koncentrace 1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 1,7 μ Ci [9,10(n)- ^3H kyselinu palmitovou (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Dodání substrátů do média a preinkubace s nimi slouží k aktivaci β -oxidace. Ke dvěma

vzorkům jsme navíc přidali inhibitor oxidace MK etomoxir (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) o výsledné koncentraci 200 μM . Hodnota β -oxidace naměřená u vzorků inkubovaných s etomoxirem byla použita pro normalizaci dat, pro odečtení nemitochondriální β -oxidace a nespecifické radioaktivity. Poslední jamka sloužila ke kvantifikaci proteinu. Po čtyřhodinové inkubaci (37 °C) se substráty jsme vzorky centrifugovali (5 minut, 2000 rpm). V dalším kroku jsme precipitovali proteiny, k 500 μl supernatantu jsme přidali 500 μl 10% kyseliny trichloroctové (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a vzorky jsme opět centrifugovali (10 minut, 2000 rpm). Před nanesením supernatantu (900 μl) na iontově výměnnou kolonu bylo nutné vzorky alkalizovat smícháním se 100 μl 6M NaOH (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Kolony vážou většinu radioaktivity a radioaktivně značený produkt $^3\text{H}_2\text{O}$ je poté eluován vodou (dvakrát 800 μl) do scintilační nádoby (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) s obsahem 5 ml scintilačního roztoku (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). Radioaktivita byla měřena na přístroji 1900TR liquid scintillation analyzer (Packard) a je vyjádřena v nCi/mg protein/h.

3.16 Měření respirace

Endogenní respiraci jsme měřili pomocí „high-resolution“ respirometrie na přístroji Oxygraph K2 (OROBOROS Instruments Corporation, Innsbruck, Rakousko). Jedná se o Clarkovu polarografickou elektrodu, která umožňuje měřit respiraci velmi malého množství vzorku. Polarografický kyslíkový senzor je tvořen platinovou katodou a Ag/AgCl anodou, jako elektrolyt je použit roztok 1M KCl. Měření spotřeby kyslíku probíhá za stálého míchání (750 rpm) při 30 °C v uzavřených komůrkách o objemu 2 ml. Data jsou ukládána v časových intervalech (2 s) a analyzována softwarem DatLab4 (OROBOROS Instruments Corporation, Innsbruck, Rakousko). Rychlost respirace, tj. spotřeba kyslíku, je vypočítána jako negativní derivace koncentrace kyslíku v čase a je vyjádřena v $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$.¹¹⁸ Na intaktních buňkách jsme měřili rutinní respiraci (tj. v kultivačním médiu RPMI) a rutinní respiraci rozpřaženou přidáním FCCP (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Inhibice ATP syntázy oligomycinem (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) byla použita k ověření závislosti rutinní respirace na mitochondriální F_0F_1 -ATP syntáze. Použili jsme následující koncentrace inhibitorů: 1 μM oligomycin, 200-300 nM FCCP, and 0,5 μM antimycin A (inhibitor respiračního řetězce; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

3.17 Stanovení NAD⁺/NADH

Poměr celkového oxidovaného a redukováného nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺/NADH) jsme stanovili pomocí kitu NAD⁺/NADH Glo assay (Promega, Madison, WI, USA). NAD/NADH-Glo™ detekční reagent obsahuje enzymy NAD Cycling enzym, jeho substrát, reduktázu, proluciferin a Ultra-Glo™ rekombinantní luciferázu. Test je založen na konverzi NAD⁺ na NADH pomocí NAD cycling enzymu. V přítomnosti NADH, reduktáza redukuje proluciferin za vzniku luciferinu, který je poté kvantifikován pomocí luciferázy, produkovaný světelný signál odpovídá množství NAD⁺ a NADH ve vzorku. Individuální kvantifikace NAD⁺ a NADH je možná díky jejich rozdílné stabilitě v kyselém a v zásaditém prostředí. Oxidovaná forma je selektivně rozkládána zahřátím v zásaditém roztoku. Redukovaná forma není stabilní v kyselém prostředí. Nejdříve jsme buňky smíchali s 0,2N NaOH s 1% dodecyltrimethylamonium bromidem (DTAB; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), který buňky lyzuje, ale zachovává stabilitu dinukleotidů. Poté jsme vzorky rozpipetovali do 96-jamkové destičky (50 µl). Ke vzorkům, které sloužili ke kvantifikaci NAD⁺ jsme přidali 0,4 N HCl, destičku jsme zahřáli (60 °C, 15 minut), poté jsme ji inkubovali při pokojové teplotě dalších 10 minut. Ke vzorkům, sloužícím ke stanovení NAD⁺ jsme přidali 25 µl roztoku Trisma base, ke vzorkům sloužícím ke k měření NADH, jsme přidali 50 µl roztoku HCl/Trizma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Ke všem jamkám jsme přidali 100 µl NAD/NADH-Glo™ reagentu, inkubovali jsme 60 minut a změřili luminiscenci na přístroji Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko).

3.18 RagB model

Pomocí lentivirové transdukce linie NALM-6 jsme stabilně expimovali wild type (wt) a mutovaný gen pro RagB. Použili jsme lentivirové konstrukty Flag pLJM1 RagB wt (Addgene plasmid 19313) a Flag pLJM1 RagB 99L (Addgene plasmid 19315) (Addgene, Cambridge, MA, USA). Lentivirové částice byly produkovány v buňkách HEK293T. Den před transfekcí byly buňky HEK293T nasazeny tak, abychom v den transfekce dosáhli 80% konfluence. Buňky jsme transfekovali pomocí polyethyleniminu (PEI) se směsí 12 µg expresního vektoru kódující gag/pol, 1,4 µg expresního vektoru kódujícího VSV-G (virus envelope G protein, VSV-G) a 15 µg lentivirového konstruktů. Přímo před transfekcí byly buňky přesazené do média s 2% FBS. Tři hodiny po transfekci bylo médium vyměněno za kompletní DMEM. Po 24 a 48 hodinách jsme odsáli kultivační médium, přidali 18 ml DMEM s 5 % FBS. Médium s virovým

vektorem jsme sbírali druhý a třetí den po transfekci. Média z obou dní byla spojena a jednotlivé aliquoty byly okamžitě zamrazeny (-80 °C). Použité lentivirové konstrukty obsahují expresní kazetu pro puromycinovou rezistenci. Pozitivní klony byly proto selektovány na základě rezistence k puromycinu. Na 48-jamkovou desku byly vysety buňky NIH3T3. V každé jamce bylo 30000 buněk ve 300 ml média DMEM s 10% FBS. Pomocí ředící řady byly připraveny jamky s 0,01 μ l, 0,05 μ l, 0,1 μ l, 0,5 μ l, 1 μ l a 5 μ l virové suspenze. Po dvou dnech byl přidán puromycin (2 μ g/1 ml média), tímto způsobem byla provedena selekce infikovaných buněk. Dva týdny po infekci jsme spočítali narostlé kolonie a poté jsme vypočítali optimální titr viru, kterým jsme následně transdukovali linii NALM-6. Přítomnost mutace RagB 99L jsme ověřili Sangerovým sekvenováním. Sekvence primerů je uvedena v Tab. 2.

3.19 Analýza dat a statistická analýza

Sekvence primerů a sond jsme navrhli v programu Vector NTI 8 Suite Software (Informax, Bethesda, USA). Data naměřená na průtokovém cytometru jsme analyzovali softwarem FlowJo 9.2 (TreeStar, Oregon, USA). Kombinační index ASNázy a etomoxiru jsme vypočítali za použití softwaru CompuSyn (www.combosyn.com). Všechny experimenty byly prováděny minimálně v triplikátu, ze kterého byla vypočítána průměrná hodnota a změřena směrodatná odchylka. Výsledky byly zpracovány ve statistickém softwaru Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA). Statistická významnost rozdílu hodnot mezi dvěma skupinami byla stanovena t-testem. Dosažená hladina testu (p-hodnota) je vyznačena v grafech (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). Korelace exprese genu pro *ASNS* a citlivosti k ASNáze byla stanovena neparametrickým testem Spearman.

4. Výsledky

4.1 Korelace exprese genu pro *ASNS* s citlivostí k ASNáze

Nižší exprese genu pro *ASNS* v leukemických buňkách v porovnání s buňkami zdravými je pro cytotoxický účinek ASNázy klíčová. Práce zabývající se korelací bazální exprese tohoto genu s rozdílnou citlivostí leukemických buněk k ASNáze však vedly ke kontroverzním výsledkům. Nejdříve jsme se proto zaměřili na vztah exprese genu pro *ASNS* a citlivostí leukemických buněk k ASNáze s cílem vysvětlit přetrvávající nejasnosti.

4.1.1 Účinek snížení exprese genu pro *ASNS* u ALL buněčných linií na citlivost k ASNáze

Metodou qRT-PCR jsme stanovili basální expresi genu pro *ASNS* u čtyř BCP ALL linií REH, UOCB-6, RS4;11 a NALM-6 (Obr. 6). Nejvyšší hladinu vykazovala linie UOCB-6 (normalizovaná hladina exprese genu pro *ASNS*, $nASNS=4,225$), následovala linie NALM-6 ($nASNS=3,640$), REH ($nASNS=2,336$) a RS4;11 ($nASNS=0,058$). Výsledky byly navzájem signifikantně rozdílné ($p<0,001$).

Pro objasnění vztahu mezi mírou exprese genu pro *ASNS* a citlivostí k ASNáze jsme u linií UOCB-6, REH a RS4;11 gradientově snížili hladinu exprese tohoto genu pomocí RNA interference (RNAi) a sledovali cytotoxický účinek ASNázy. U jednotlivých linií jsme použili zvyšující se koncentrace siRNA proti genu *ASNS* (si*ASNS*), čímž jsme dosáhli spektra exprese od $nASNS=4,40$ až po $nASNS=0,008$ (Obr. 7). Poté jsme pomocí testu MTS změřili citlivost buněk k ASNáze. Gradientové snížení exprese genu pro *ASNS* vedlo u linie UOCB-6 ke gradientovému zvýšení citlivosti k ASNáze (Obr. 8). U linie REH vedl pokles exprese mRNA od $nASNS=1,010$ do $nASNS=0,749$ také ke zvýšení citlivosti k ASNáze. Další pokles exprese genu pro *ASNS* však citlivost neovlivnil (Obr. 9). V případě linie RS4;11, která měla nejnižší bazální hladinu exprese genu pro *ASNS*, gradientové snížení exprese tohoto genu citlivost nezvýšilo (Obr. 10).

Z uvedených výsledků vyplývá, že jsme našli hraniční hodnotu exprese genu pro *ASNS*. Citlivost vzorků k ASNáze negativně koreluje s expresí *ASNS* pouze u vzorků s bazální expresí nad touto hraniční hodnotou. U vzorků s nízkou bazální expresí genu pro *ASNS*, která je pod definovanou hranicí, již exprese tohoto genu s citlivostí k ASNáze nekoreluje.

4.1.2 Porovnání exprese genu pro ASNS primárních ALL diagnostických vzorků a ALL buněčných linií

Pomocí qRT-PCR jsme stanovili basální expresi genu pro ASNS u 30 BCP ALL diagnostických vzorků (Obr. 11). U 29 vzorků jsme naměřili velmi nízkou hladinu exprese genu pro ASNS, což je v souladu s již publikovanými daty.¹¹⁹ Medián exprese 0,18 byl pod hraniční hladinou definovanou v předchozím experimentu. Medián exprese tohoto genu u leukemických buněčných linií REH, UOCB-6, NALM-6 a RS4;11 (2,99) byl signifikantně vyšší v porovnání s primárními ALL blasty ($p < 0,0001$).

V dalším experimentu jsme se zaměřili na určení proteinových hladin metodou Western blot (Obr. 12). U leukemických buněčných linií korelovalo množství proteinu s hladinou mRNA. Navzdory použití tří různých primárních protilátek specifických pro ASNS (SantaCruz, Abcam a protilátka z laboratoře Dr.Kilberga, University of Florida College of Medicine, USA) a precizní optimalizaci byl protein ASNS u patientských vzorků nedetekovatelný.

4.1.3 Korelace exprese genu pro ASNS s citlivostí primárních ALL diagnostických vzorků k ASNáze

Testem MTS jsme změřili citlivost leukemických buněčných linií a patientských ALL blastů k ASNáze. Z buněčných linií byla k ASNáze nejvíce citlivá linie RS4;11 s IC_{50} $2,5 \times 10^{-3}$ IU/ml. Linie REH, NALM-6 a UOCB-6 měly IC_{50} 0,15 IU/ml, 0,3 IU/ml a 0,9 IU/ml (Obr. 13). Spearmanův korelační koeficient ($=1$) potvrdil korelaci mezi expresí genu pro ASNS a IC_{50} buněčných linií ($p=0,0833$). Dále jsme změřili citlivost sedmi (1-7) ALL diagnostických vzorků (Obr. 14) s naměřenou expresí genu pro ASNS $n_{ASNS}=0,4319; 0,5621; 0,4944; 0,2559; 0,2315; 0,1029$ a $0,0421$. Odpověď ALL blastů k podání ASNázy byla nezávislá na bazální expresi genu pro ASNS. Výpočet Spearmanova korelačního koeficientu ($0,2242; p=0,5367$) ukázal, že mezi bazální expresí genu pro ASNS a *in vitro* citlivostí ALL pacientů k ASNáze není korelace. Výpočet byl založen na hodnotě absolutní IC_{50} a normalizované expresi genu pro ASNS.

4.1.4 Účinek ASNázy na mRNA a proteinovou hladinu ASNS

Buněčné linie REH, UOCB-6, NALM-6 a RS4;11 jsme inkubovali s ASNázou (4 IU/ml). Ve třech časových bodech (6, 24 a 48 hodin) jsme odebrali vzorek, u kterého jsme změřili expresi genu pro ASNS na mRNA (Obr. 15) i proteinové úrovni (Obr. 16). U linií REH, NALM-6 a UOCB-6 došlo po podání ASNázy k signifikantnímu zvýšení exprese genu pro ASNS ve všech třech časových bodech. Nejvýraznější zvýšení bylo

v akutní fázi, v čase 6 hodin po podání ASNázy, kdy u linie REH došlo k 7,6 násobnému nárůstu exprese ($p=2,34 \times 10^{-4}$), u linie NALM-6 došlo k 6,8 násobnému nárůstu exprese ($p=7,4 \times 10^{-6}$) a u linie UOCB-6 k 4,3 násobnému zvýšení exprese genu pro ASNS ($p=7,1 \times 10^{-7}$). U linie RS4;11 v akutní fázi podání ASNázy nedošlo ke zvýšení exprese genu pro ASNS. Navíc v žádném z časových bodů nebyla hladina exprese genu pro ASNS u linie RS4;11 srovnatelná ani s bazálními hladinami ostatních linií. Hladina proteinu ASNS byla napříč liniemi velmi rozdílná. U linie REH a UOCB-6 došlo po podání ASNázy k jejímu signifikantnímu zvýšení, zatímco u linie NALM-6 nedošlo k žádné změně. U linie RS4;11 byl protein ASNS nedetekovatelný.

Ačkoliv je nízká exprese genu pro ASNS v leukemických buňkách pro terapeutický účinek ASNázy klíčová, nelze hodnotu její bazální hladiny používat pro predikci citlivosti k ASNáze. Abychom odhalili příčiny rozdílné citlivosti pacientů k tomuto léčivu, zaměřili jsme se v další práci na podrobné popsání mechanismu účinku ASNázy.

4.2 Výsledky expresního profilování leukemických buněk se známou citlivostí k ASNáze

Abychom zjistili, jaké geny a signální dráhy mohou být pro cytotoxický účinek ASNázy důležité, vypěstovali jsme ALL buněčné linie rezistentní k ASNáze. Citlivost parentálních (REH, NALM-6) a rezistentních linií (rezREH, rezNALM-6) jsme změřili testem MTS (Obr. 17 a 18). U všech čtyř buněčných linií jsme stanovili expresní profil. Dále jsme porovnali výsledky expresního profilu parentální a rezistentní linie (REH vs. rezREH; NALM-6 vs. rezNALM-6). V případě linie REH, došlo po vytvoření rezistence ke změně exprese (fold change, FC) 837 genů ($p < 0,01$, $FC \geq 1,45$). Expresní profil parentální a rezistentní linie NALM-6 se lišil v expresi 392 genů ($p < 0,01$, $FC \geq 1,45$). Pro určení společných znaků rezistence jsme udělali průnik obou skupin a tím jsme získali seznam 30 genů (Tab. 4).

Podobnou analýzu jsme provedli i s daty z patientských vzorků. K tomu jsme použili veřejně dostupné výsledky expresního profilování dětských pacientů s BCP ALL se známou citlivostí k ASNáze.³¹ Geny se signifikantně změněnou expresí ($p < 0,01$) reprezentující rezistentní profil ALL pacientů (564 genů) jsme porovnali se všemi geny, jejichž exprese byla rozdílná u rezistentních linií (1229). Výsledkem bylo 32 genů (Tab. 5).

Pomocí nástroje „Enrichment analysis tool for GeneGo and GO ontologies“ jsme zjistili, do jakých buněčných procesů jsou definované skupiny genů zapojené. Do této analýzy jsme zahrnuli 30 genů, které byly společné pro rezistenci buněčných linií (Tab. 6 a 7), 564 genů získané z expresního profilu ALL pacientů (Tab. 8 a 9) a 32 genů, které charakterizují společný rezistentní profil buněčných linií a diagnostických vzorků (Tab. 10 a 11). Získali jsme seznamy biologických drah a biologických sítí, jejichž aktivita je klíčová pro rozdílnou odpověď na podání ASNázy. Mezi signální a metabolické dráhy, které jsme touto analýzou získaly, patřily regulace translace, glukózový a lipidový metabolismus.

4.3 Vliv ASNázy na metabolismus leukemických buněk

Vzhledem k tomu, že ASNáza enzymaticky rozkládá dvě aminokyseliny, dochází tím k narušení metabolické homeostázy leukemických buněk. Výsledky expresního profilování leukemických buněk rezistentních k ASNáze potvrdily význam metabolických drah v odpovědi na ASNázu. Účinek ASNázy na metabolismus leukemických buněk nebyl dosud popsán, proto jsme studovali vliv ASNázy na klíčové metabolické dráhy.

4.3.1 Účinek ASNázy na celkový obsah aminokyselin

V úvodním experimentu jsme změřili, zda ASNáza ovlivňuje obsah i jiných aminokyselin, než je asparagin a glutamin. Kromě aminokyselin jsme změřili i obsah NH_3 . Použité dávky byly vybrány dle farmakokinetických vlastností a citlivostí použitých buněčných linií k ASNáze.¹²⁰ Inkubovali jsme kultivační médium RPMI s ASNázou o koncentraci 0,5 IU/ml, 1 IU/ml a 4 IU/ml po dobu 18 hodin. ASNáza snížila v porovnání s kontrolním vzorkem obsah asparaginu (2,3 - 2,4krát) a glutaminu (2,7 - 2,9krát). Došlo ke zvýšení obsahu aspartátu (2,8 - 2,9krát), glutamátu (2,1 - 2,4krát) a NH_3 (2,5 - 2,9krát). Obsah ostatních aminokyselin nebyl ovlivněn (Obr. 19). Stejného výsledku jsme dosáhli i po změření extracelulárního obsahu aminokyselin. Linie REH a NALM-6 jsme inkubovali s ASNázou (4 IU/ml; 18 hodin). Podání ASNázy způsobilo úbytek extracelulárního asparaginu (REH 2,4krát; NALM-6 3,4krát) a glutaminu (REH 18,2krát; NALM-6 9,1krát), došlo k nárůstu aspartátu (REH 1,6krát; NALM-6 1,9krát), glutamátu (REH 5,1krát; NALM-6 4,4krát) a NH_3 (REH 2,2krát; NALM-6 1,4krát)(Obr. 20 a 21). Cytotoxický účinek ASNázy nespočívá v depleci jiných aminokyselin než je asparagin a glutamin.

4.3.2 Účinek ASNázy na oxidaci MK

Z analýzy expresních profilů vyplývá, že má ASNáza vliv na metabolismus lipidů. Oxidace MK je rozhodující pro přežívání leukemických buněk při nedostatku živin. Z konkrétních metabolických drah jsme proto nejdříve studovali vliv ASNázy na β -oxidaci. Linie REH, NALM-6 a RS4;11 jsme inkubovali s ASNázou a poté jsme změřili aktivitu oxidace MK. Doba inkubace byla 18 hodin, linie REH a NALM-6 jsme inkubovali s ASNázou o koncentraci 4 IU/ml. Linii RS4;11 jsme inkubovali s ASNázou o koncentraci 0,5 IU/ml. ASNáza signifikantně zvýšila β -oxidaci u všech třech linií (REH $p=0,0156$; NALM-6 $p=0,0016$; RS4;11 $p=0,0036$)(Obr. 22).

4.3.3 Účinek ASNázy na glykolýzu

Kromě glutaminu a MK je velmi významným substrátem pro tvorbu ATP také glukóza. Měřili jsme proto účinek ASNázy na glukózový metabolismus leukemických linií. Podání ASNázy signifikantně snížilo spotřebu glukózy (REH; $p=0,0395$; NALM-6 $p=0,0003$)(Obr. 23). U linie NALM-6 a RS4;11 došlo také ke snížení tvorby glykolytického produktu laktátu (NALM-6 $p < 0,0001$; RS4;11 $p=0,0320$). U linie REH jsme žádnou změnu v laktátové produkci nenaměřili (Obr. 24).

Mezi známé regulátory glykolýzy patří *c-Myc*, proto jsme detekovali jeho expresi na mRNA (Obr. 25) a na proteinové úrovni (Obr. 26). Podání ASNázy signifikantně snížilo expresi *c-Myc* u leukemických linií (REH $p=0,0003$; NALM-6 $p=0,0002$; RS4;11 $p=0,0102$).

Glukóza je z extracelulárního prostředí transportovaná do buněk přenašečem „Glucose transporter type 1“ (GLUT1). ASNáza výrazně snížila proteinovou hladinu přenašeče GLUT1 (Obr. 26). V souladu s výsledky naměřenými na modelu buněčných linií jsme naměřili sníženou expresi proteinu *c-Myc* i u některých patientských vzorků (Obr. 27).

4.3.4 Účinek ASNázy na respirační kapacitu

Oxidace MK i glykolýza vedou k produkci NADH, který je poté oxidován v mitochondriálním respiračním řetězci. V dalších experimentech jsme proto studovali vliv ASNázy na mitochondriální respiraci. Na obrázku 28 a 29 jsou reprezentativní grafy z jednoho měření respirace buněčných linií REH a NALM-6 po inkubaci s ASNázou. ASNáza signifikantně zvýšila rutinní respiraci linie REH ($p=0,0276$)(Obr. 30). V rozpřaženém stavu, který umožňuje měřit maximální kapacitu respiračního řetězce, jsme pozorovali signifikantní zvýšení spotřeby kyslíku u všech třech linií (REH $p=0,0177$; NALM-6 $p=0,0359$; RS4;11 $p=0,026$)(Obr. 30, 31 a 32). Zajímavé bylo, že u všech třech linií došlo po podání ASNázy ke zvýšení zbytkové respirace (hodnoty naměřené po rozpřažení respiračního řetězce normalizované k rutinní respiraci; Obr. 33). U linie REH a NALM-6 byl výsledek signifikantní (REH $p=0,0216$, NALM-6 $p=0,0059$). U linie RS4;11 bylo zvýšení zbytkové respirace na hranici signifikance ($p=0,062$).

Podobný účinek ASNázy na zbytkovou respiraci jsme naměřili u primárních diagnostických vzorků ($N=3$), u kterých došlo po podání ASNázy k jejímu signifikantnímu zvýšení ($p=0,0435$). U zdravých B-lymfocytů ($N=3$), izolovaných z PK

zdravých dárců, však ke zvýšení zbytkové respirace nedošlo (Obr. 34). Tento výsledek dokazuje, že ASNáza ovlivňuje respiraci specificky pouze u leukemických buněk.

Zvýšení respirační kapacity nevedlo u leukemických linií ke zvýšení hladin proteinů OXPHOS (Obr. 35), což znamená, že nevede ke zvýšení aktivity OXPHOS a následné tvorbě ATP. Předpokládali jsme, že zvýšená respirace pravděpodobně představuje posun v rovnováze dostupných substrátů. To jsme potvrdili naměřením hladin NAD^+ a NADH . Po podání ASNázy došlo u buněčných linií REH a NALM-6 k signifikantnímu poklesu poměru NAD^+/NADH (REH $p=0,0182$; NALM-6 $p=0,0186$)(Obr. 36).

4.4 Regulace účinku ASNázy

Naše předchozí experimenty ukázaly, že podání ASNázy působí v leukemických buňkách na klíčové metabolické dráhy. V další práci jsme studovali regulaci tohoto účinku. Mezi známé buněčné senzory přítomnosti aminokyselin patří regulační proteinový komplex mTORC1. Naší hypotézou proto bylo, že je účinek ASNázy zprostředkován signalizační dráhou mTORC1. Zaměřili jsme se na efekt ASNázy na jednotlivé cíle mTORC1.

4.4.1 Účinek ASNázy na proteosyntézu a syntézu pyrimidinů

V leukemických liniích a v primárních diagnostických vzorcích jsme detekovali proteiny p-P70S6K a p-S6 (Obr. 37). Podání ASNázy způsobilo snížení fosforylace těchto proteinů, což svědčí o inhibici translace mRNA. Navíc jsme zjistili, že inkubace s ASNázou způsobila snížení fosforylace proteinu p-CAD (Obr. 38), který pozitivně reguluje *de novo* syntézu pyrimidinů.¹⁰⁶ Metodou UPLC-ToF-MS jsme změřili intermediáty pyrimidinové syntézy v buněčných liniích REH a NALM-6. V souladu s nižší hladinou proteinu p-CAD, podání ASNázy vedlo k signifikantnímu poklesu hladiny UMP (REH $p=0,0181$; NALM-6 $p=0,0034$)(Obr. 39) a uridinu (REH $p=0,043$; NALM-6 $p=0,0019$)(Obr. 40), což inhibici pyrimidinové syntézy potvrdilo.

4.4.2 Účinek ASNázy na autofagii

Další mechanismus, který může být dráhou mTORC1 ovlivněn, je autofagie. Při inhibici mTORC1 dochází k aktivaci autofagie.^{101, 102} Abychom zjistili, zda má podání ASNázy vliv na autofagický tok, detekovali jsme konverzi proteinu LC3-I na LC3-II. Inkubace s ASNázou způsobila v buněčné linii NALM-6 časově závislý nárůst exprese proteinu LC3-II (Obr. 41), což znamená, že pravděpodobně dochází k aktivaci autofagie. Dále jsme zjistili, že docházelo k poklesu hladiny selektivního autofagického substrátu, proteinu p62/SQSTM1(Obr. 41).¹¹⁶ Akumulace LC-II byla v linii NALM-6 ještě intenzivnější při kombinaci ASNázy s BafA1 (Obr. 41). BafA1 je inhibitor vakuolární ATPázy, blokuje fúzi autofagosomů s lyzosomy a to vede k akumulaci autofagosomů.¹²¹ Náš výsledek proto potvrzuje, že pozorovaný nárůst hladiny LC3-II po podání ASNázy byl způsoben aktivací autofagického toku a ne poklesem degradace lipidovaného LC3.

4.4.3 Účinek ASNázy na ALL buňky s mutací v genu pro RagB

V dalších experimentech jsme studovali mechanismus, kterým ASNáza inhibuje dráhu mTORC1. Aktivace komplexu mTORC1 aminokyselinami je zprostředkována GTPázami Rag A, B, C a D. Klíčová je konverze RagA/B-GDP na RagA/B-GTP.^{104, 105} Abychom určili, zda ASNáza inhibuje mTORC1 stejným mechanismem jako celková deprivace aminokyselin, vytvořili jsme model linie NALM-6 s wt (RagB wt) a mutovaným genem pro RagB (RagB 99L). Mutace genu pro RagB způsobuje konstitutivní aktivaci dráhy mTORC1 i při nedostatku aminokyselin.

4.4.3.1 Ověření funkčnosti modelu s mutací v genu pro RagB

Po podání ASNázy nedošlo u RagB 99L buněk ke snížení fosforylace proteinu p-S6, zatímco u buněk RagB wt k inhibici mTORC1 došlo (Obr. 42). Tímto jsme potvrdili, že nedostatek asparaginu a glutaminu inhibuje mTORC1 prostřednictvím RagB GTPázy. Také jsme si ověřili, že je linie NALM-6 s mutací RagB 99L rezistentní k inhibici mTORC1 z nedostatku aminokyselin a proto je model vhodný pro studium mechanismu regulace drah ovlivňovaných ASNázou. V souladu s předchozími daty, docházelo u buněk RagB wt po inkubaci s ASNázou k výraznějšímu snížení hladiny proteinu p-CAD než u buněk RagB 99L (Obr. 42). Na Obr. 43 je grafické znázornění výsledků densitometrie.

4.4.3.2 Vztah mezi dráhou RagB-mTORC1 a oxidací MK

Měřením aktivity oxidace MK buněk RagB wt a RagB 99L po inkubaci s ASNázou jsme chtěli zjistit, zda je tato metabolická dráha regulována dráhou RagB-mTORC1. Buňky RagB 99L nebyly na rozdíl od buněk RagB wt ($p=0,0352$) schopné po podání ASNázy zvýšit aktivitu oxidace MK (Obr. 44). Zdá se proto, že je zvýšená aktivita oxidace MK u leukemických buněk po podání ASNázy závislá na inhibici mTORC1.

4.4.3.3 Vztah mezi dráhou RagB-mTORC1 a glykolýzou

Při detekci glykolytických znaků jsme ale pozorovali opak. Jak u linie RagB wt tak u linie RagB 99L došlo po inkubaci s ASNázou k poklesu hladiny proteinu c-Myc (Obr. 42). Shodně došlo u obou typů buněk k signifikantnímu poklesu hladiny extracelulárního laktátu (RagB wt $p=0,0001$; RagB 99L $p=0,0019$)(Obr. 45). Pro potvrzení předpokladu, že je inhibice c-Myc nezávislá na inhibici komplexu mTORC1, jsme u linií REH a NALM-6 změřili hladinu proteinu c-Myc po inkubaci rapamycinem (běžný inhibitor mTORC1). Na rozdíl od ASNázy, podání rapamycinu nezpůsobilo

pokles proteinové hladiny c-Myc (Obr. 46). Došlo ale ke snížení fosforylace proteinu p-CAD, který sloužil jako pozitivní kontrola inhibice mTORC1 (Obr. 46).

Z našich výsledků vyplývá, že ASNáza inhibuje proteinovou translaci a syntézu DNA prostřednictvím inhibice dráhy RagB-mTORC1. Jejím prostřednictvím dochází také ke zvýšení oxidace MK. Glykolýza se zdá být regulovaná jiným mechanismem.

4.5 Vliv farmakologická inhibice oxidace MK na cytotoxický účinek

ASNázy

Zvýšení oxidace MK může u nádorových buněk představovat záchranný mechanismus.^{82, 122, 123} Testovali jsme proto, zda zvýšená oxidace MK způsobená ASNázou napomáhá leukemickým buňkám vyrovnat se s nastalým metabolickým stresem.

4.5.1 Vliv inhibice oxidace MK na cytotoxický účinek ASNázy

Zvolili jsme farmakologickou inhibici oxidace MK za použití etomoxiru. Mechanismus účinku etomoxiru spočívá v inhibici mitochondriálního přenašeče MK CPT1. Buněčné linie REH (Obr. 47) a NALM-6 (Obr. 48) jsme inkubovali bez inhibitorů, s etomoxirem (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M a 400 μ M) s ASNázou (1 IU/ml, 2 IU/ml, 4 IU/ml, 8 IU/ml a 16 IU/ml) nebo v kombinaci obou látek. Poté jsme metodou průtokové cytometrie změřili jejich viabilitu. Inhibice oxidace MK signifikantně zvýšila cytotoxický účinek ASNázy v obou liniích. Nejvíce efektivní byla kombinace ASNázy s etomoxirem o koncentraci 100 a 200 μ M, při které došlo u linie REH k signifikantnímu zvýšení cytotoxického účinku ASNázy ve všech pěti koncentracích. U linie NALM-6 došlo při použití 100 a 200 μ M etomoxiru k signifikantnímu zvýšení u čtyř z pěti koncentrací ASNázy. Z naměřených hodnot jsme vypočítali kombinační index. Výsledná hodnota byla pro kombinaci ASNázy a etomoxiru (100 a 200 μ M) menší než 1 (Obr. 49), což znamená, že etomoxir synergicky zvyšuje cytotoxický účinek ASNázy.¹²⁴

Pro analýzu účinku kombinace etomoxiru s ASNázou v primárních diagnostických vzorcích v podmínkách *ex vivo* jsme zvolili koncentrace etomoxiru 100 a 200 μ M. Výsledek byl podobný jako v případě buněčných linií. Etomoxir zvýšil cytotoxický účinek ASNázy u čtyřech z pěti BCP ALL patientských vzorků (Obr. 50).

4.5.2 Vliv aktivity oxidace MK na citlivost k ASNáze

V dalších práci jsme použili model buněčné linie NALM-6 s mutací genu pro RagB, u kterého jsme v předchozím experimentu prokázali sníženou schopnost aktivovat oxidaci MK po podání ASNázy. Buňky RagB wt a RagB 99L jsme inkubovali s ASNázou a poté jsme sledovali její cytotoxický účinek. Metodou Western blot jsme stanovili hladinu proteinu poly(ADP-ribose)polymeráza (PARP). Míra štěpení tohoto DNA reparačního proteinu kaspásami odráží aktivitu apoptózy.¹²⁵ U buněk RagB 99L docházelo po podání ASNázy k výraznějšímu štěpení PARP než u buněk RagB wt (Obr.

51). Metodou průtokové cytometrie jsme potvrdili, že jsou buňky RagB 99L k ASNáza signifikantně více citlivé než RagB wt ($p=0,0004$)(Obr. 52). Tyto výsledky prokázaly, že schopnost zvýšit oxidaci MK je pro přežívání leukemických buněk inkubovaných s ASNázou kritická.

4.6 Vliv asparaginu a glutaminu na jednotlivé procesy v ALL buňkách

ASNáza enzymaticky rozkládá jak asparagin, tak glutamin. Není však jasné, zda je cytotoxický účinek závislý na odstranění asparaginu, glutaminu či na kombinaci obou enzymatických aktivit. Studovali jsme proto účinek deplece jednotlivých aminokyselin na leukemické buňky. Dále jsme sledovali zda, má přítomnost jednotlivých aminokyselin schopnost ovlivnit odpověď na ASNázu.

4.6.1 Účinek deplece asparaginu a glutaminu na dráhu mTORC1 a na hladinu proteinů c-Myc, ASNS a PARP

Leukemické linie jsme kultivovali ve čtyřech rozdílných podmínkách: 1. v kompletním médiu RPMI; 2. v médiu RPMI bez asparaginu; 3. v médiu RPMI bez glutaminu a 4. v médiu RPMI s ASNázou. Sledovali jsme účinek deplece jednotlivých aminokyselin na hladinu proteinu ASNS, na dráhu mTORC1, metabolismus i apoptózu (Obr. 53).

Po odstranění asparaginu došlo u linií REH a NALM-6 stejně jako po podání ASNázy ke zvýšení hladiny proteinu ASNS. Deplece glutaminu neměla na hladinu proteinu ASNS vliv. U linie RS4;11 byl protein ASNS nedetekovatelný ve všech čtyřech kultivačních podmínkách. V případě proteinové hladiny c-Myc, která reprezentuje účinek na glukózový metabolismus, došlo u buněčných linií REH a NALM-6 k jejímu poklesu po depleci asparaginu i glutaminu. Rovněž došlo ke snížení fosforylace proteinu p-S6. U linie NALM-6 však měla větší účinek deplece glutaminu. Rozdílný účinek jsme detekovali u linie RS4;11, kde došlo k poklesu hladiny proteinů c-Myc a p-S6 po inkubaci v médiu bez asparaginu. Ve všech třech buněčných liniích měla deplece asparaginu stejný účinek na hladinu proteinu p-CAD jako deplece glutaminu, v obou případech došlo ke snížení fosforylace, která ale nebyla tak výrazná jako po podání ASNázy. Míru apoptózy jsme měřili na úrovni štěpení proteinu PARP. U linie NALM-6 nevedla deplece jednotlivých aminokyselin k aktivaci apoptózy, apoptotický účinek měla pouze ASNáza. V případě linie REH a RS4;11 došlo ke štěpení proteinu PARP při depleci asparaginu.

4.6.2 Účinek deplece asparaginu a glutaminu na oxidaci MK a respiraci

V předchozích experimentech jsme ukázali, že je aktivace oxidace MK pro leukemické buňky inkubované s ASNázou významný obranný mechanismus. Dále se zdá, že se jednotlivé leukemické linie liší nejen v citlivosti k ASNáze, ale také v odpovědi na odstranění jednotlivých aminokyselin. Abychom určili, zda se na aktivaci oxidace MK podílí odstranění asparaginu nebo glutaminu, kultivovali jsme linie NALM-6 a RS4;11

ve výše uvedených čtyřech podmínkách. U linie RS4;11 došlo k aktivaci oxidace MK po odstranění asparaginu ($p=0,0152$)(Obr. 54). Rozdílný výsledek jsme naměřili u linie NALM-6, kde měla aktivační účinek deplece glutaminu ($p=0,0116$)(Obr. 55).

Buněčná respirace je podmíněná přítomností glutaminu, protože odstranění glutaminu způsobuje omezení produkce NADH. V našich experimentech jsme tento efekt také pozorovali. Při depleci glutaminu došlo k inhibici maximální respirační kapacity jak u linie RS4;11 (Obr. 56) tak u linie NALM-6 (Obr. 57).

4.6.3 Účinek přidání asparaginu a glutaminu na jednotlivé buněčné procesy

Linie REH a NALM-6 jsme 8 hodin inkubovali s ASNázou, poté jsme buňky promyli pomocí PBS a inkubovali dalších 18 hodin 1. v kompletním médiu RPMI; 2. V médiu RPMI bez asparaginu; 3. v médiu RPMI bez glutaminu (Obr. 58 a 59). Médium bez asparaginu představuje přidání glutaminu a naopak, médium bez glutaminu představuje přidání asparaginu. Detekovali jsme proteinovou hladinu p-S6, p-CAD a štěpení proteinu PARP. Přidání asparaginu způsobilo u linie REH opětovnou fosforylaci proteinu p-S6 a pokles ve štěpení proteinu PARP. Popsaný účinek je výraznější než po přidání glutaminu. U linie NALM-6 došlo po ke zvýšení fosforylace p-S6 po přidání jak asparaginu, tak glutaminu. Pokles apoptózy byl evidentní také po přidání obou aminokyselin.

5. Diskuse

Terapie dětské ALL je velmi úspěšná, stále však dochází u některých pacientů k relapsu onemocnění. ASNáza se pro léčbu dětské ALL používá již desítky let, přesto je mechanismus jejího účinku stále překvapivě nejasný. Jeho odhalení by významně zlepšilo dosavadní terapeutické postupy i prognózu leukemických pacientů.

S citlivostí ALL buněk k ASNáze byla vždy spojována nízká exprese genu pro *ASNS*. Bazální exprese tohoto genu byla proto potenciálně nadějným ukazatelem odpovědi leukemických blastů k ASNáze. Přestože existuje řada publikací, které význam exprese genu pro *ASNS* v souvislosti s inter-individuálními rozdíly v senzitivitě k ASNáze zpochybňují, exprese genu pro *ASNS* byla i nadále uváděna jako důležitý znak rezistence. Našimi experimenty jsme chtěli proto potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že rozdíly v expresi genu pro *ASNS* mohou způsobovat rozdílnou odpověď pacientů k ASNáze. Sledovali jsme změny senzitivity ALL buněčných linií k ASNáze po gradientovém snížení exprese genu pro *ASNS*. Odhalili jsme hraniční hladinu exprese genu pro *ASNS*, která rozdělila naše vzorky. Pokles hladiny exprese genu pro *ASNS* u vzorků s bazální expresí nad touto hranicí vedl ke zvýšení citlivosti k ASNáze. Snížení exprese genu pro *ASNS*, která byla pod uvedenou hranicí, již ke zvýšení citlivosti nevedlo. Dále jsme zjistili, že 29 z 30 vyšetřených ALL pacientů mělo bazální expresi genu pro *ASNS* pod stanovenou hranicí. Tyto výsledky ukazují, že na základě bazální exprese genu pro *ASNS* nelze predikovat citlivost pacientů k ASNáze, což jsme poté potvrdili cytotoxickým testem MTS. Exprese genu pro *ASNS* nekorelovala s citlivostí k ASNáze. Původní hypotéza o vztahu mezi expresí genu pro *ASNS* a citlivostí k ASNáze byla potvrzena na modelu buněčných linií. Jako příklad můžeme uvést práci autorů Aslanian *et al.*, kteří ověřili již publikovanou informaci o zvýšení hladiny genu, proteinu i aktivity *ASNS* u leukemické linie MOLT-4 po podání ASNázy.^{126, 127} Autoři navíc dokázali, že samotné zvýšení exprese *ASNS* vede k rezistentnímu fenotypu.¹²⁶ Pouze jedna práce potvrdila obdobné výsledky i na klinických vzorcích. Autoři Haskell *et al.* popsali u pěti pacientů rezistentních na ASNázu zvýšenou enzymatickou aktivitu *ASNS* v porovnání se čtyřmi pacienty senzitivními.¹²⁸ Výpovědní hodnota publikovaných dat je však nízká. Kromě omezeného počtu vzorků nebyla vysvětlena kritéria určení senzitivity či rezistence. Navíc byla tato studie provedena na heterogenní skupině, zahrnující i dospělé pacienty jak s akutní, tak chronickou leukemií. Další analýzy klinických vzorků vedly ke kontroverzním až paradoxním výsledkům.

Paralelně se Stams *et al.* naše pracovní skupina publikovala článek o zvýšené expresi genu pro *ASNS* u *TEL-AML1*-pozitivních pacientů v porovnání s *TEL-AML1*-negativními. Právě *TEL-AML1*-pozitivní pacienti mají ale lepší prognózu a signifikantně nižší *IC50* *ASNázy*, která byla měřena MTT cytotoxickým testem u patientských vzorků *ex vivo*.^{33, 34} Tyto výsledky byly zpočátku interpretovány jako anomálie způsobená přítomností fúzního genu. Z dalších prací zpochybňujících vliv *ASNS* na vznik rezistence však vyplývá, že šlo o vyvrácení 35 let staré teorie o přímém vlivu hladiny *ASNS* na cytotoxický efekt *ASNázy*.³⁵ Naše nové výsledky jasně ukazují, že původní hypotéza nebrala v úvahu fakt, že patientské blasty mají mnohem nižší expresi genu pro *ASNS* než leukemické buněčné linie (až 20krát). Rozdíly v expresi genu pro *ASNS* mezi jednotlivými pacienty neodpovídají rozdílům v citlivosti k *ASNáze*. Porovnávání primárních vzorků s buněčnými liniemi je vždy diskutabilní. Jedním z možných mechanismů, který by mohl vysvětlit vysokou expresi genu pro *ASNS* u ALL linií v porovnání s patientskými vzorky je rychlejší proliferace v *in vitro* podmínkách. Leukemické buněčné linie si při optimálních kultivačních podmínkách velmi stabilně zachovávají hlavní vlastnosti buněk, ze kterých byly odvozeny.¹²⁹ Vzhledem k tomu, že potřebují celé spektrum živin, je ale možné, že reagují zvýšenou expresí enzymů zapojených do metabolismu aminokyselin. Pomocí expresního profilování bylo navíc ukázáno, že jsou mezi klinickými vzorky a modelovými leukemickými liniemi jisté rozdíly. Konkrétně se jednalo o buněčné linie CML, akutní promyelocytární leukémie a AML, u kterých byla ukázána zvýšená exprese genů spojených s makromolekulárním metabolismem. U klinických vzorků byla zase ukázána abundantní exprese genů spojených s imunitní odpovědí.¹³⁰ Kolektiv autorů Nan Su a *et al.* ve své práci upozornil na důležitost detekce proteinu *ASNS*, který s citlivostí k *ASNáze* koreloval u buněčných linií lépe než hladina mRNA.¹¹⁹ Testovali jsme čtyři ALL buněčné linie a exprese genu pro *ASNS* korelovala s hladinou proteinu. U klinických vzorků můžeme o stejné preferenci zatím pouze spekulovat, protože množství proteinu je tak nízké, že jej nelze metodou Western blot spolehlivě detekovat. Ve zmíněném článku Nan Su a *et al.* se to podařilo pouze u jednoho pacienta z deseti, nám se to nepodařilo u žádného. Protein *ASNS* není detekovatelný ani u ALL buněčné linie RS4;11, která má velmi nízkou expresi genu pro *ASNS*. Indukce exprese genu pro *ASNS* je jednou z prvních reakcí při nedostatku aminokyselin.^{127, 131} Akutní podání *ASNázy* také způsobuje zvýšení exprese genu pro *ASNS*.^{33, 126, 127} Absolutní hladina indukované exprese genu pro *ASNS* závisí na hladině iniciální.³³ Naše výsledky ukazují,

že se jednotlivé ALL linie v odpovědi na podání ASNázy liší v závislosti na tom, zda je bazální hladina exprese genu pro *ASNS* nad nebo pod stanovenou hranicí. Podání ASNázy signifikantně zvýšilo mRNA hladinu *ASNS* u tří ALL linií: REH, NALM-6 a UOCB-6. Bazální hladina exprese genu pro *ASNS* všech třech linií je nad stanovenou hranicí. V případě linie RS4;11 nedošlo po krátkodobé inkubaci s ASNázou ke zvýšení exprese genu pro *ASNS*. V žádném z časových bodů navíc nedošlo ke zvýšení hladiny mRNA *ASNS* natolik, aby byla nad úrovní stanovené hranice, kde exprese genu pro *ASNS* již s citlivostí k ASNáze koreluje. Naší hypotézou je, že buňky, u nichž je bazální hladina mRNA *ASNS* pod definovanou hranicí, používají alternativní mechanismus odpovědi na deprivaci aminokyselin.

ASNS jistě hraje důležitou roli v mechanismu účinku ASNázy, ale ne jako jediný činitel. Pro pochopení tohoto komplexního děje jsme proto porovnali expresní profil ALL buněk citlivých a rezistentních k ASNáze. Následnou analýzou signálních a metabolických drah jsme zjistili, že rozdílná odpověď na podání ASNázy může souviset s aktivitou translace a metabolickým nastavením buněk. Metabolické dráhy maligních buněk mohou být v porovnání s buňkami zdravými pozměněné v závislosti na dostupnosti živin a mohou se tak podílet na mechanismu rezistence k léčivům.¹³² Citlivost k ASNáze proto může být ovlivněna schopností leukemických buněk adaptovat se na nedostatek aminokyselin aktivací alternativní biosyntetické anebo bioenergetické dráhy. V naší práci jsme ukázali, že podání ASNázy způsobuje rozsáhlé změny v metabolismu leukemických buněk a aktivuje dráhy, které jsou významné pro buněčné přežívání. ASNáza v leukemických buňkách zvýšila aktivitu oxidace MK, respiraci a inhibovala glykolýzu. Oxidace MK slouží k produkci NADH, FADH₂ a acetyl-CoA, které doplňují Krebsův cyklus, což následně vede k aktivaci mitochondriální OXPHOS. Oxidace MK je proto důležitá pro buněčný růst nádorových buněk v normálních i deprivovaných podmínkách.^{79, 122, 133-135} Podíl oxidace MK na buněčném přežívání byl popsán u různých typů nádorů, jako je difuzní velkobuněčný B lymfom, mnohočetný myelom a glioblastom.¹³⁶⁻¹³⁸ Aktivita oxidace MK může také způsobovat chemorezistenci, což bylo ukázáno na adenokarcinomu plic. Inhibitor oxidace MK etomoxir zvýšil citlivost tohoto nádoru k paklitaxelu.¹³⁹ Při studiu rezistence CLL k dexamethazonu bylo také zjištěno, že se na ní podílí oxidace MK.¹²³ Farmakologická inhibice oxidace MK by mohla být prospěšná i při léčbě hematologických onemocnění, na myším modelu s myeloidní leukémií bylo ukázáno, že

potencuje účinek konvenční chemoterapie.^{82, 140} Vzhledem k tomu, že ASNáza aktivuje oxidaci MK a inhibice oxidace MK je jedna z možných cest potlačení chemorezistence, použili jsme kombinaci etomoxiru s ASNázou u ALL vzorků. Etomoxir způsobil zvýšení citlivosti ALL buněčných linií a primárních diagnostických vzorků k ASNáze. V předchozích studiích byla ukázána negativní asociace mezi mTOR a oxidací MK a naopak, pozitivní vztah mezi syntézou MK a aktivací mTOR.^{113, 141, 142} ASNáza v našem modelu inhibovala mTORC1 prostřednictvím RagB, což jsou mediátory, které zaznamenávají přítomnost aminokyselin a ovlivňují signalizaci mTORC1.¹⁰⁵ RagB mutantní buňky, které mají konstitutivně aktivovanou dráhu mTOR, měly po podání ASNázy méně aktivovanou oxidaci MK v porovnání s buňkami RagB wt. Buňky s mutací v genu pro RagB byly navíc více citlivé k ASNáze, než kontrolní buňky RagB wt. Tyto výsledky potvrzují, že k inhibici dráhy RagB-mTOR dochází následkem metabolického stresu. Inhibice mTOR následně způsobuje aktivaci oxidace MK. Domníváme se, že omezená aktivace oxidace MK u RagB mutantních buněk způsobuje jejich zvýšenou citlivost k depleci aminokyselin.

Vzhledem k tomu, že podání ASNázy způsobilo inhibici mTORC1, soustředili jsme se na známé cíle tohoto regulačního komplexu. Po inkubaci s ASNázou došlo u ALL buněk k inhibici proteinové translace a *de novo* syntézy pyrimidinů. Tuto část účinku ASNázy lze považovat za pravděpodobnou příčinu zástavy proliferace, jak již ve své práci komentoval J.G. Cory.¹⁴³ Glutamin je nutný pro aktivitu tří enzymů zapojených do *de novo* syntézy purinů a dvou enzymů při syntéze pyrimidinů, hlavní příčinou inhibice syntézy nukleotidů v leukemických buňkách je pravděpodobně glutaminázová aktivita ASNázy. V našich experimentech snížila fosforylaci proteinu p-CAD kromě deplece glutaminu i deplece asparaginu. Mnohem účinnější však byla kombinace, tzn. ASNáza. Důvod, proč dochází ke snížení fosforylace p-CAD i po depleci asparaginu může být ten, že v důsledku této deplece dochází k aktivaci enzymu ASNS, jehož funkce je glutamin-dependentní.

Současně s již uvedenými metabolickými změnami došlo po podání ASNázy k aktivaci autofagie. Zvýšení autofagie v důsledku inkubace s ASNázou již bylo ukázané u AML a ovariálních nádorů.^{53, 115} Příčinou může být kromě inhibice mTORC1 také produkce NH₃, který vzniká při deaminaci asparaginu i glutaminu. Aktivace autofagie deaminací aminokyselin je na dráze mTORC1 nezávislá.¹⁴⁴ Oxidací MK vzniká acetyl-CoA, což je další metabolit, který může autofagii aktivovat.¹¹¹ Autofagie

degradací proteinů a organel napomáhá k udržení intracelulární metabolické homeostázy.¹⁴⁵ Produkci aminokyselin a MK se proto může podílet na doplnění živin, které ASNáza depletuje a způsobovat tak snížení úspěšnosti terapie.¹⁴⁶

Další metabolická dráha, kterou podání ASNázy v leukemických buňkách ovlivnilo, byla glykolýza. Jakým konkrétním mechanismem ASNáza inhibici glykolýzy navozuje, není zatím jasné. ASNáza způsobila inhibici c-Myc, který glykolýzu reguluje. Zda se jedná o přímý účinek ASNázy na c-Myc nebo jde o zpětnou reakci na inhibici glykolýzy je potřeba ověřit. Z našich výsledků nicméně vyplývá, že je inhibice glykolýzy nezávislá na inhibici komplexu mTORC1. Jednou z možností je, že buněčnou hladinu c-Myc reguluje komplex mTORC2, jak bylo ukázáno u glioblastomu.¹⁴⁷ Jiné vysvětlení by mohlo spočívat v substrátové inhibici, která je způsobena nahromaděním pyruvátu, v důsledku zvýšené tvorby acetyl-CoA oxidací MK.

Velmi zajímavé je také zjištění, že podání ASNázy zvyšuje maximální respirační kapacitu leukemických buněk. Zvýšení respirace může odrážet zvýšený tok živin, které mohou být oxidovány v mitochondriích, což může a nemusí být závislé na oxidaci MK. Vzhledem k tomu, že jsme naměřili zvýšenou oxidaci MK, je pravděpodobné, že zvýšení respirační aktivity v tomto případě s oxidací MK souvisí. Zvýšení poměru NAD^+/NADH po podání ASNázy také naznačuje, že dochází k mitochondriální oxidaci redukčních ekvivalentů. Také byla po inkubaci s ASNázou zvýšená zbytková respirace, která charakterizuje potenciální rezervní kapacitu pro bioenergetické buněčné funkce.¹⁴⁸ U AML buněk bylo popsáno, že mají nízkou zbytkovou respirační kapacitu, která způsobuje zvýšenou citlivost k oxidativnímu metabolickému stresu.¹⁴⁹ Zvýšení zbytkové respirace po podání ASNázy je proto možný způsob kompenzace nedostatku aminokyselin.

Dále nás zajímalo, jakou úlohu hraje samotná deplece jednotlivých aminokyselin, asparaginu a glutaminu, v metabolických procesech a drahách podřízených mTOR. Z našich výsledků vyplývá, že čím více jsou leukemické buňky citlivé na ASNázu, tím více jsou i závislé na asparaginu. Jiným vysvětlením, které vychází z poznatků publikovaných autory Chan *et al.*, je, že glutaminázová aktivita ASNázy není důležitá pro ty ALL buňky, které mají velmi nízkou expresi genu pro *ASNS* (*ASNS*-negativní buňky).¹⁵⁰ Buněčná závislost na asparaginu je proto nepřímo úměrná hladině proteinu *ASNS* v našich testovaných liniích. Deplece asparaginu měla

vliv na cíle komplexu mTORC1 u linií citlivějších k ASNáze (RS4;11, REH). U méně citlivé linie NALM-6 došlo k inhibici mTORC1 při depleci asparaginu i glutaminu. Apoptózu aktivovala u citlivějších linií deplece asparaginu, u linie NALM-6 deplece jednotlivých aminokyselin nezpůsobilo.

Po přidání asparaginu došlo u linií REH a RS4;11 k inhibici apoptózy, zatímco u linie NALM-6 apoptózu inhiboval jak asparagin, tak glutamin. Aktivace oxidace MK také reflektovala závislost leukemických buněk na jednotlivých aminokyselinách. U linie RS4;11 došlo k aktivaci oxidace MK po odstranění asparaginu, zatímco u linie NALM-6 měla deplece glutaminu výraznější efekt na aktivaci MK. Jednotlivé ALL linie se nelišily pouze v citlivosti k ASNáze, expresi genu pro *ASNS*, ale také v některých odpovědích na odstranění asparaginu resp. glutaminu.

Závěr

ASNáza je esenciální a osvědčená komponenta moderních léčebných protokolů, k léčbě dětské ALL se používá již od sedmdesátých let minulého století. Nově se testuje u řady jiných nádorových onemocnění. Detailní mechanismus cytotoxického působení však nebyl dosud vysvětlen. Nedostatek poznatků tak komplikuje i studium příčin rezistence a nežádoucích účinků.

Cílem naší práce bylo v první řadě vysvětlit mnohokrát diskutovaný vztah mezi expresí genu pro *ASNS* a citlivostí ALL buněk k ASNáze. Dále jsme chtěli vnést nový náhled do mechanismu účinku ASNázy.

Naše výsledky vyvrátily hypotézu, že rozdíly v expresi genu pro *ASNS* mohou způsobovat rozdílnou odpověď leukemických pacientů k ASNáze. Ačkoliv je enzym *ASNS* pro mechanismus účinku ASNázy zásadní, jeho důležitost spočívá hlavně v nízké hladině, která je specifická pro leukemické buňky ve srovnání s buňkami zdravými. Tato nízká hladina exprese genu pro *ASNS* však znemožňuje použít hladinu bazální exprese genu pro *ASNS* pro predikci odpovědi na léčbu ASNázou.

Při dalším studiu mechanismu účinku ASNázy jsme odhalili, že ASNáza výrazně mění bioenergetické a biosyntetické procesy leukemických buněk. Hierarchii jednotlivých dějů bude nutné ještě prozkoumat. Podařilo se nám nicméně zjistit, že ASNáza část těchto dějů ovlivňuje prostřednictvím dráhy RagB-mTORC1. Konkrétně se jedná o oxidaci MK, proteinovou translaci a *de novo* syntézu pyrimidinů.

V naší práci jsme také popsali několik způsobů, kterými by bylo teoreticky možné zvýšit cytotoxický účinek ASNázy. Potenciál tkví v inhibici autofagie a inhibici buněčné respirace. Prakticky jsme se zaměřili na oxidaci MK, protože její kritický význam pro přežívání leukemických buněk byl již dříve popsán. Zjistili jsme, že farmakologická inhibice oxidace MK potencuje cytotoxický efekt ASNázy jak u leukemických buněčných linií, tak u primárních diagnostických vzorků. Použitý inhibitor oxidace MK etomoxir s ASNázou navíc působil synergicky.

Naše práce jako první ukazuje účinek ASNázy na metabolismus leukemických buněk. Metabolické změny, které jsme na modelu leukemických buněk popsali, jsou u nádorových buněk časté. Kombinace ASNázy s etomoxirem by proto mohla být použita kromě léčby dětské ALL také v terapii jiných nádorových onemocnění.

Abstrakt

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastější nádorové onemocnění u dětí. L-asparagináza (ASNáza) klíčová složka terapie dětské ALL, hydrolyzuje plazmatický asparagin a glutamin. Leukemické buňky jsou na depleci aminokyselin citlivé, protože mají v porovnání se zdravými buňkami sníženou aktivitu asparagin syntetázy (ASNS). Léčba dětské ALL je velmi úspěšná, přesto se v některých případech projevují nežádoucí účinky a rezistence na terapii. Příčiny nebyly dosud spolehlivě vysvětleny.

V naší práci jsme chtěli objasnit, do jaké míry exprese genu pro *ASNS* ovlivňuje citlivost ALL buněk k ASNáze. Dále jsme se zaměřili na detailní mechanismus účinku ASNázy, s cílem vysvětlit příčiny rozdílné citlivosti leukemických pacientů k tomuto léčivu.

Pro studium vztahu mezi expresí genu pro *ASNS* a citlivostí k ASNáze jsme použili BCP ALL buněčné linie (REH, NALM-6, RS4;11 a UOCB-6) a 30 diagnostických BCP ALL vzorků. Pomocí RNA interference jsme u ALL linií gradientově snížili expresi genu pro *ASNS*. Definovali jsme hraniční hodnotu exprese genu pro *ASNS*, pod jejíž úrovní již exprese genu pro *ASNS* nekoreluje s citlivostí k ASNáze. Hladina exprese genu pro *ASNS* u patientských vzorků je pod definovanou hranicí. Dále jsme potvrdili, že citlivost ALL diagnostických vzorků k ASNáze nekoreluje s expresí genu pro *ASNS*. Navíc jsme ukázali, že u ALL buněk s velmi nízkou bazální expresí genu pro *ASNS* nedochází po podání ASNázy ke zvýšení exprese tohoto genu.

Pro další práci jsme dlouhodobou inkubací s ASNázou vypěstovali subklony leukemických linií s nižší citlivostí k ASNáze (rezREH, rezNALM-6). U parentálních i rezistentních linií jsme změřili expresní profil a následně jsme analyzovali signální a metabolické dráhy, jejichž aktivita byla po vytvoření rezistence změněna. Stejným způsobem jsme analyzovali veřejně dostupná expresní data patientských vzorků, u nichž je známá citlivost k ASNáze. Zjistili jsme, že geny jejichž exprese byla signifikantně změněna, se vyskytují v dráhách regulujících translaci mRNA a metabolismus. Zaměřili jsme se proto na účinek ASNázy na metabolismus ALL buněk. Inkubace ALL buněk s ASNázou vedla ke zvýšení oxidace MK, respirace a ke snížení glykolýzy. Zvýšená oxidace MK, společně se sníženou translací a syntézou pyrimidinů byla způsobena inhibicí dráhy RagB-mTORC1. Účinek ASNázy na glykolýzu je na RagB-mTORC1 nezávislý. Bylo popsáno, že aktivita oxidace MK je velmi důležitá pro

přežívání leukemických buněk v metabolickém stresu. Studovali jsme proto, zda oxidace MK neovlivňuje citlivost ALL buněk k ASNáze. Farmakologická inhibice oxidace MK významně zvýšila cytotoxický účinek ALL buněčných linií i BCP ALL diagnostických vzorků k ASNáze. Další důkaz významu oxidace MK pro buněčné přežívání jsme získali při využití ALL buněčné linie s konstitutivní aktivací mTORC1. U této linie nedochází po inkubaci s ASNázou k aktivaci oxidace MK, v porovnání s kontrolními buňkami je však na ASNázu citlivější.

Závěrem naší práce je, že na základě bazální exprese genu pro *ASNS* nelze u ALL pacientů predikovat citlivost k ASNáze. Navíc jsme zjistili, že ASNáza významně ovlivňuje bioenergetické a biosyntetické procesy ALL buněk. Naše výsledky dále ukazují, že lze pro zvýšení cytotoxického účinku ASNázy využít kombinaci s farmakologickými inhibitory oxidace MK.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent type of childhood cancer. The key component in the therapy, L-asparaginase (ASNase), hydrolyzes plasma asparagine and glutamine. Leukemic cells are sensitive to the depletion due to low activity of asparagine synthetase. Although the treatment is very effective, resistance and side effects remain a serious problem in some cases and its mechanism of action is not well understood.

In this study, we wanted to elucidate the effect of *ASNS* expression level on the sensitivity of ALL cells to ASNase treatment. Our aim was also to clarify the intracellular consequences of the amino acid depletion to define the reason of different patients' response.

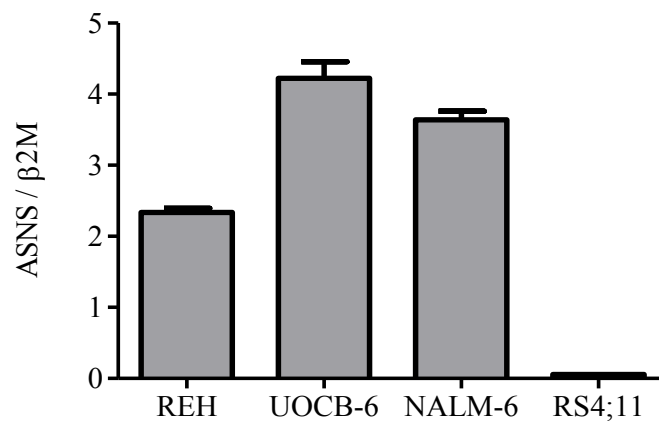
We used four ALL cell lines (NALM-6, RS4;11, REH, and UOCB-6) and 30 diagnostic bone marrow samples of ALL patients to study the relationship between *ASNS* expression and sensitivity to ASNase using MTS proliferation assay. RNA interference was used to study the effect of a range of *ASNS* levels on the response to ASNase treatment. Using a cell line model with a gradually knocked-down *ASNS* gene, we defined a cutoff level below which *ASNS* gene expression does not correlate with sensitivity to ASNase. Importantly, *ASNS* gene expression in patients' ALL blasts is below this level. We confirmed that there was no correlation between *ASNS* gene expression and sensitivity to ASNase in ALL blasts. In addition, we show that cells with low *ASNS* expression level do not respond to asparagine deprivation by upregulation of *ASNS* gene expression.

To study further the effect of ASNase on leukemic cells, we have generated ASNase-resistant subclones through chronic exposure to the enzyme. Pathway analysis of gene expression profiles of the cell lines (REH, NALM-6 and their resistant counterparts) and primary samples (sensitive and resistant to ASNase; Holleman *et al.* (NEJM, 2004)) revealed that ASNase affects the translation machinery and metabolism of leukemic cells. Therefore, we studied the impact of ASNase on the main metabolic pathways in leukemic cells. Treating leukemic cells with ASNase increased fatty acid oxidation (FAO) and cell respiration and inhibited glycolysis. FAO, together with the decrease in protein translation and pyrimidine synthesis, was regulated through inhibition of the RagB-mTORC1 pathway, whereas the effect on glycolysis was RagB-mTORC1 independent. Since FAO has been suggested to have a pro-survival function

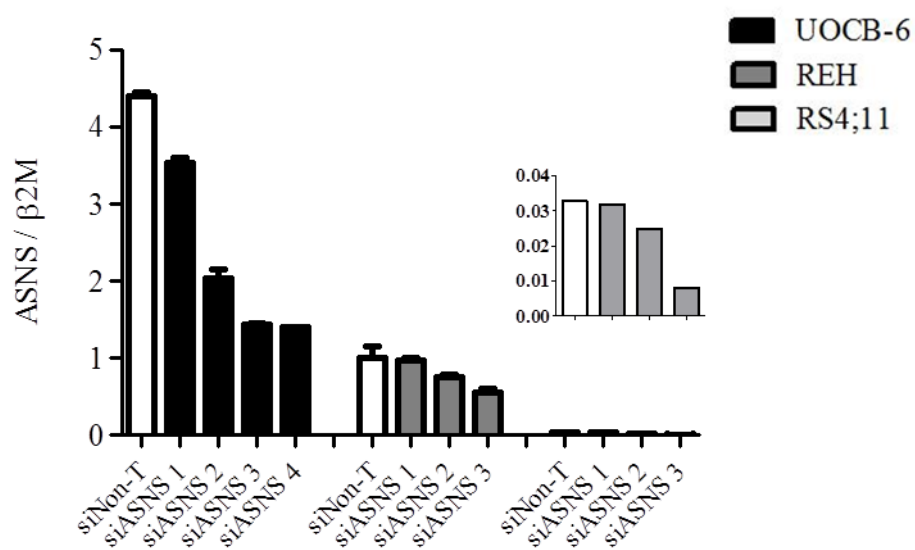
in leukemic cells, we tested its contribution to cell survival following ASNase treatment. Pharmacological inhibition of FAO significantly increased the sensitivity of ALL cells to ASNase. Moreover, constitutive activation of the mTOR pathway increased apoptosis in leukemic cells treated with ASNase, but did not increase FAO.

In conclusion, the *ASNS* expression level does not predict sensitivity to ASNase in leukemic blasts. Moreover, our study uncovers a novel therapeutic option based on the combination of ASNase and FAO inhibitors.

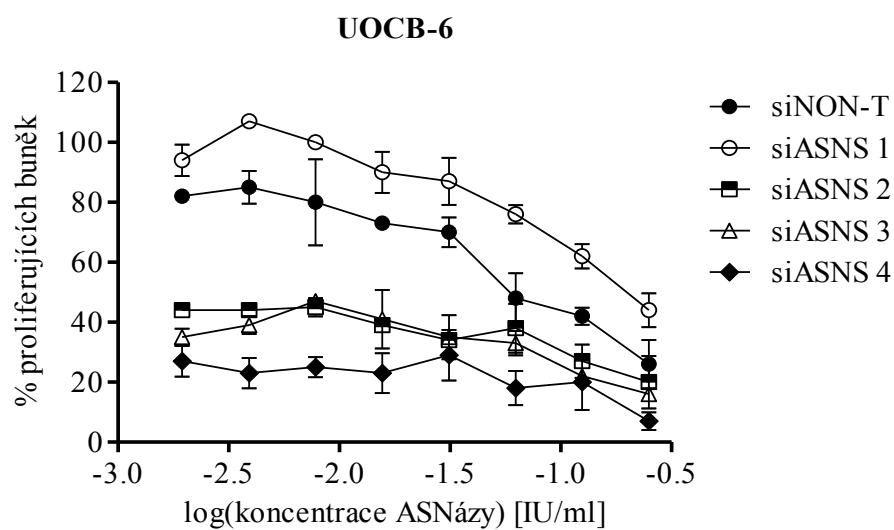
Obrázky



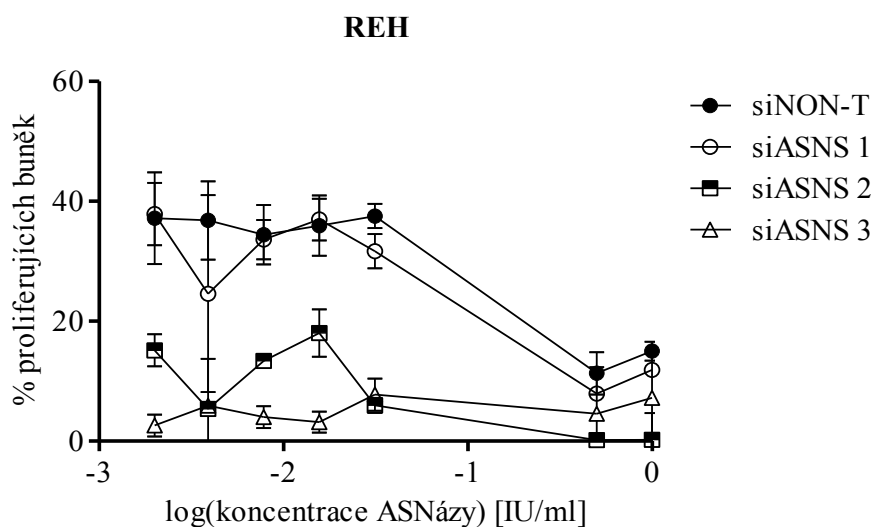
Obr. 6 - Normalizovaná bazální hladina exprese genu pro *ASNS* u ALL buněčných linií



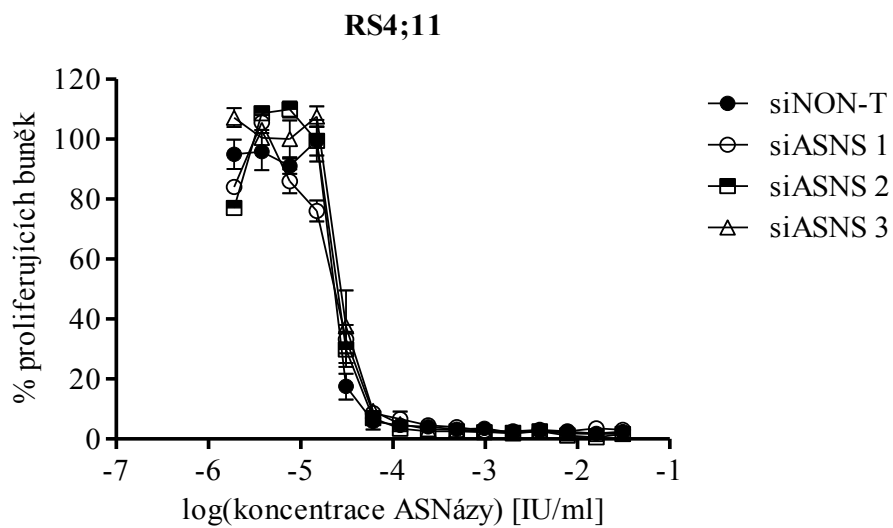
Obr. 7 – Gradientově snížená hladina exprese genu pro *ASNS* u ALL buněčných linií pomocí RNA interference



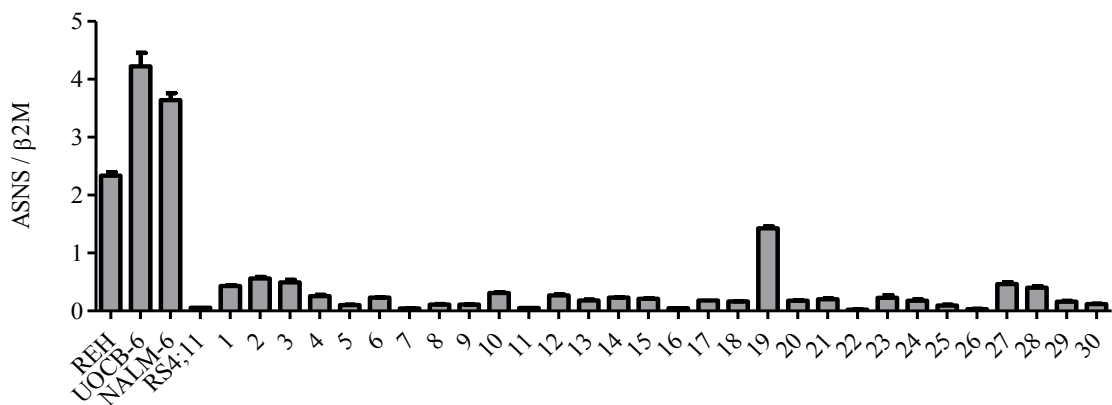
Obr. 8 - Výsledek MTS cytotoxického testu buněčné linie UOCB-6 s gradientově umlčeným genem pro *ASNS*



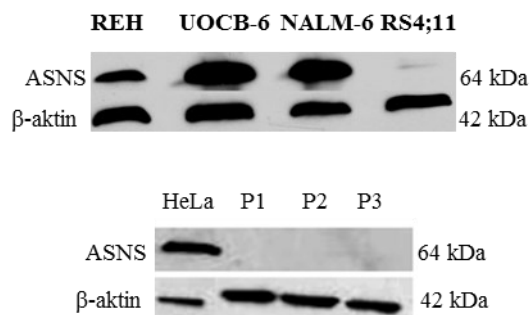
Obr. 9 - Výsledek MTS cytotoxického testu buněčné linie REH s gradientově umlčeným genem pro *ASNS*



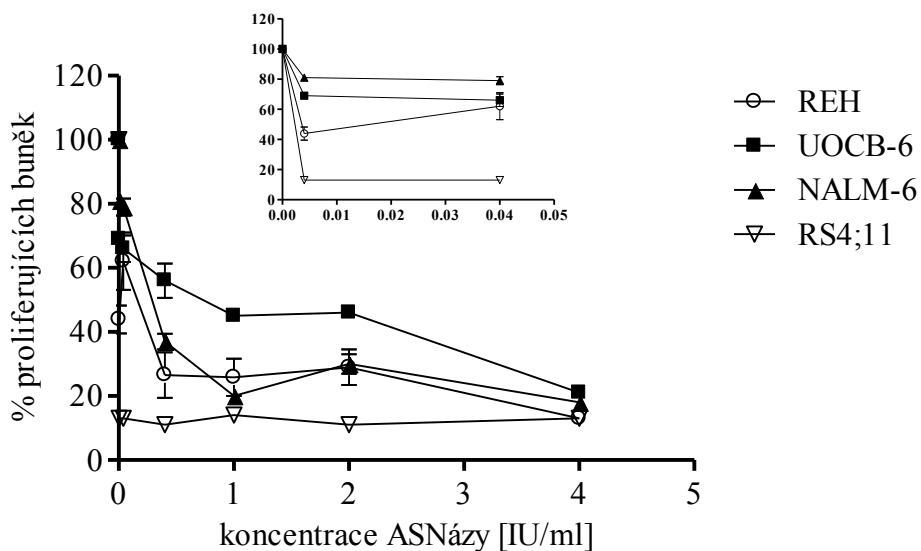
Obr. 10 - Výsledek MTS cytotoxického testu buněčné linie RS4;11 s gradientově umlčeným genem pro *ASNS*



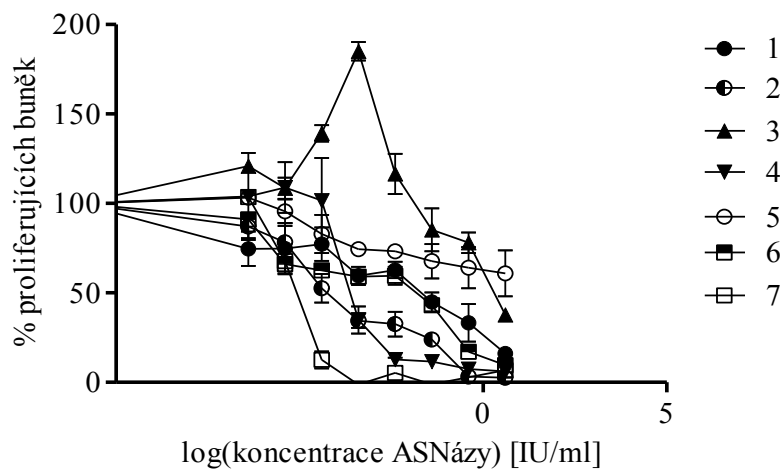
Obr. 11 - Normalizovaná bazální hladina exprese genu pro *ASNS* u ALL buněčných linií a BCP ALL diagnostických vzorků



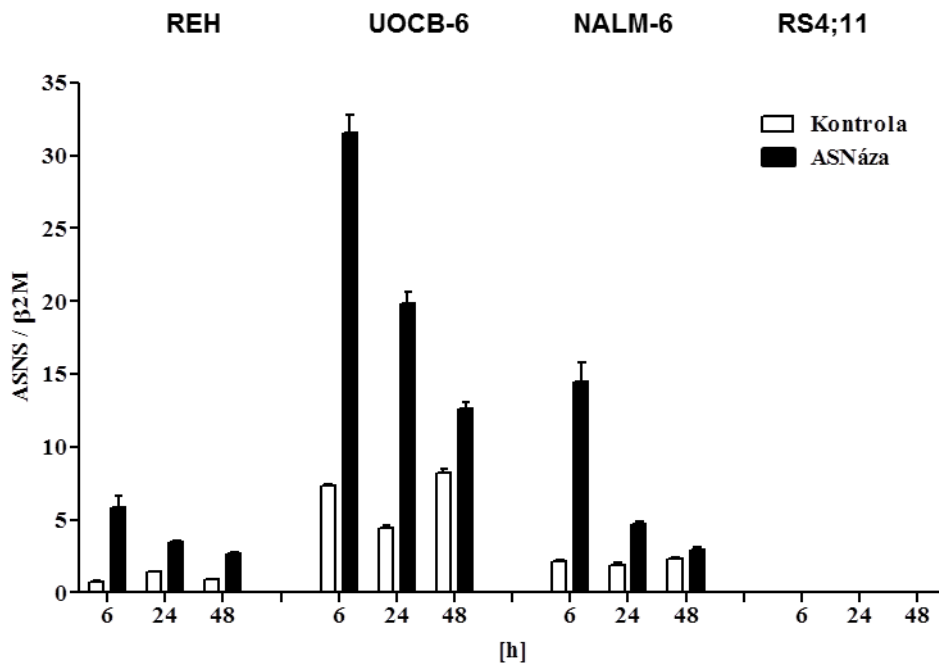
Obr. 12 – Hladina proteinu ASNS u ALL buněčných linií a BCP ALL diagnostických vzorků



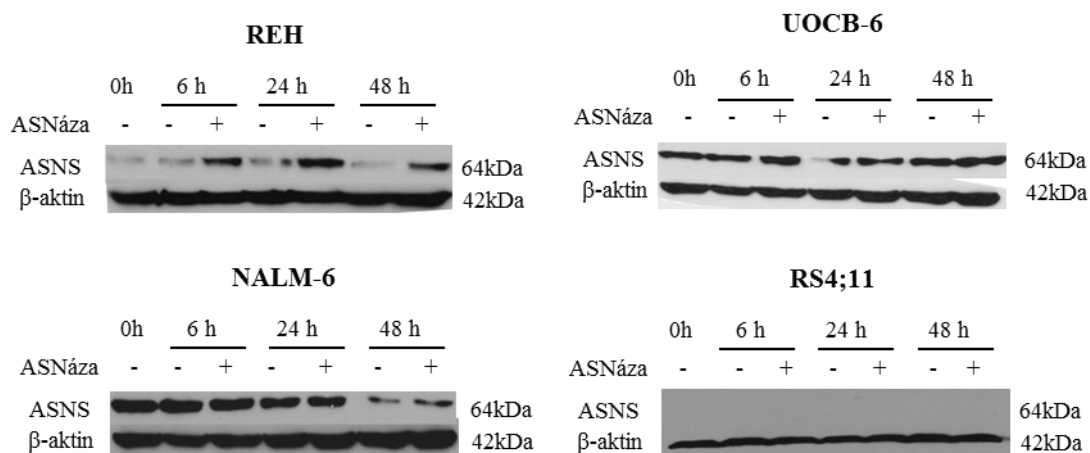
Obr. 13 - Výsledek MTS cytotoxického testu ALL buněčných linií



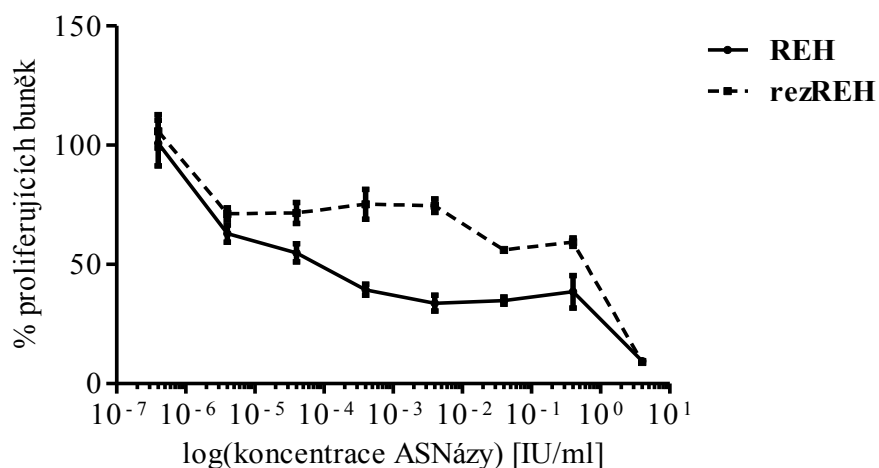
Obr. 14 - Výsledek MTS cytotoxického testu BCP ALL diagnostických vzorků



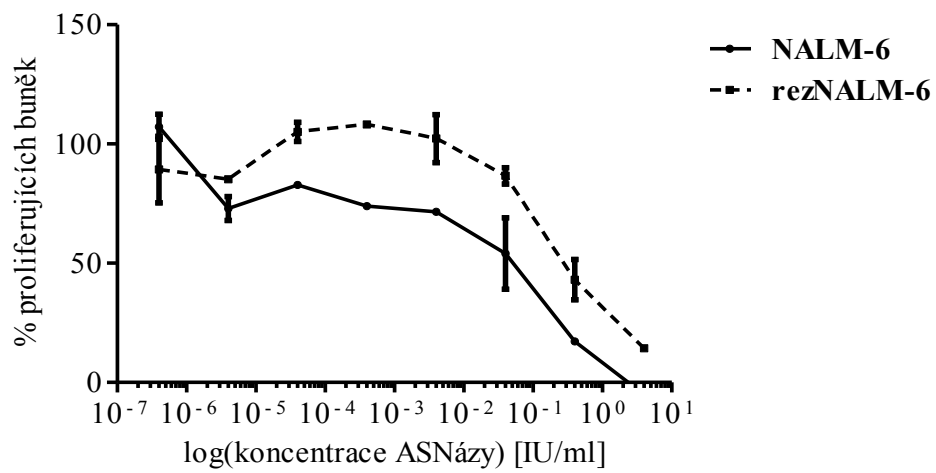
Obr. 15 - Normalizovaná hladina exprese genu pro *ASNS* u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



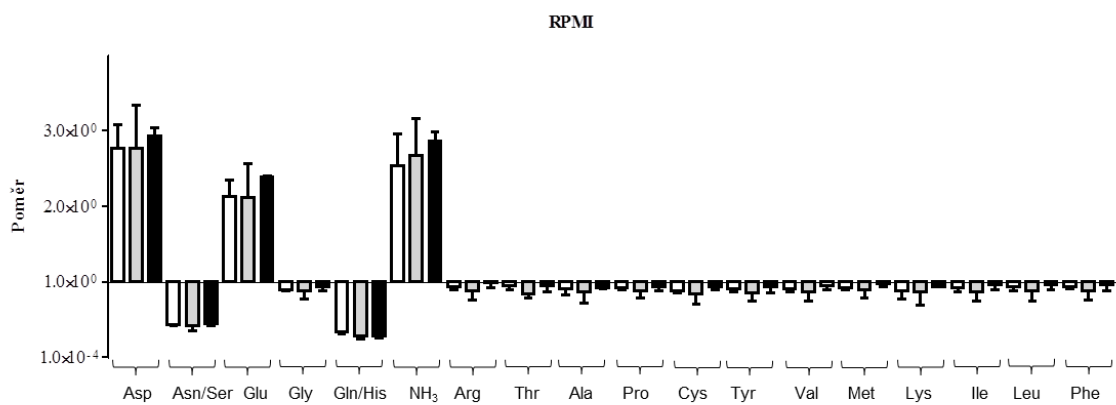
Obr. 16 – Hladina proteinu ASNS u ALL buněčných po inkubaci s ASNázou



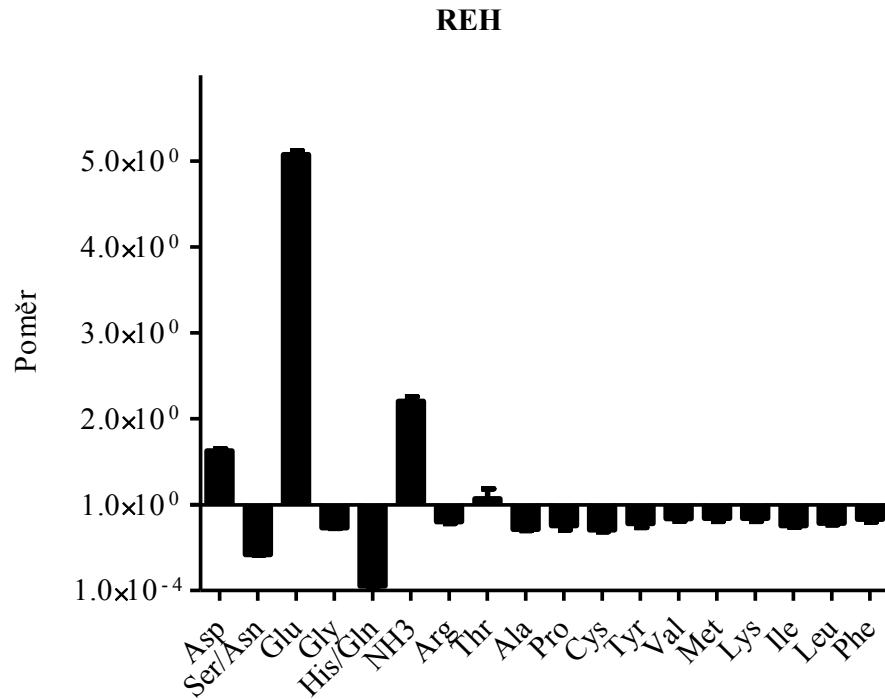
Obr. 17 - Výsledek MTS cytotoxického testu ALL buněčných linií REH a rezREH



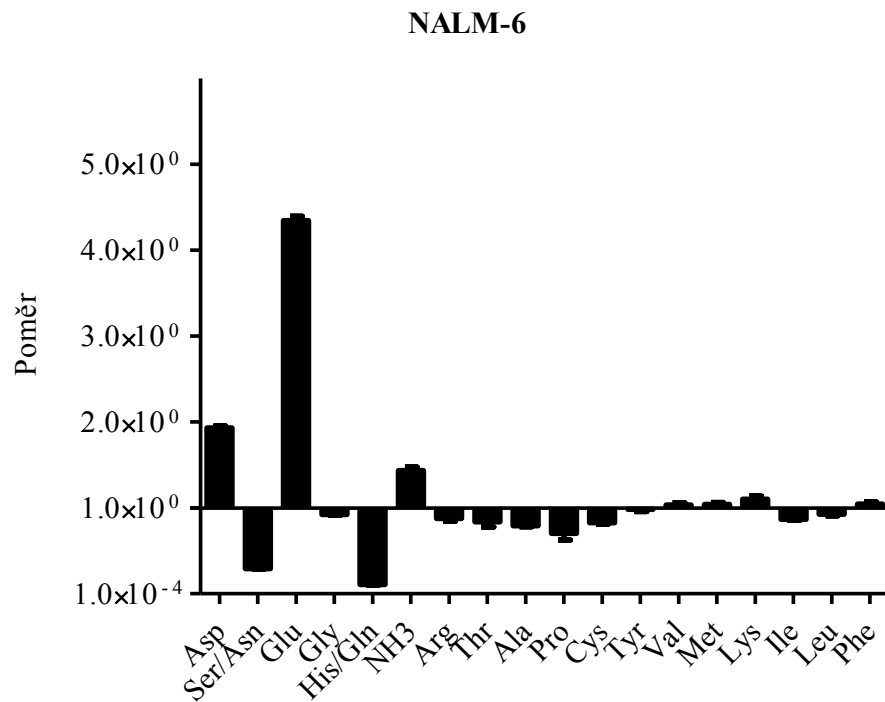
Obr. 18 - Výsledek MTS cytotoxického testu ALL buněčných linií NALM-6 a rezNALM-6



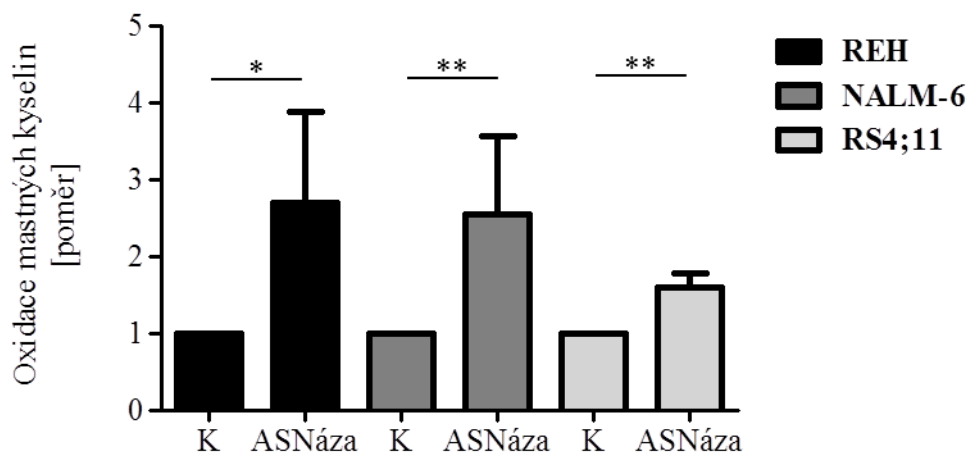
Obr. 19 – Obsah aminokyselin v médiu RPMI po inkubaci s ASNázou



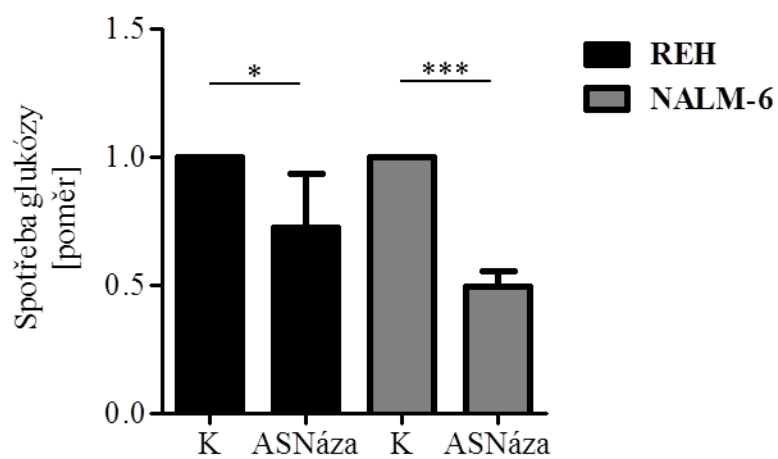
Obr. 20 – Obsah extracelulárních aminokyselin po inkubaci linie REH s ASNázou



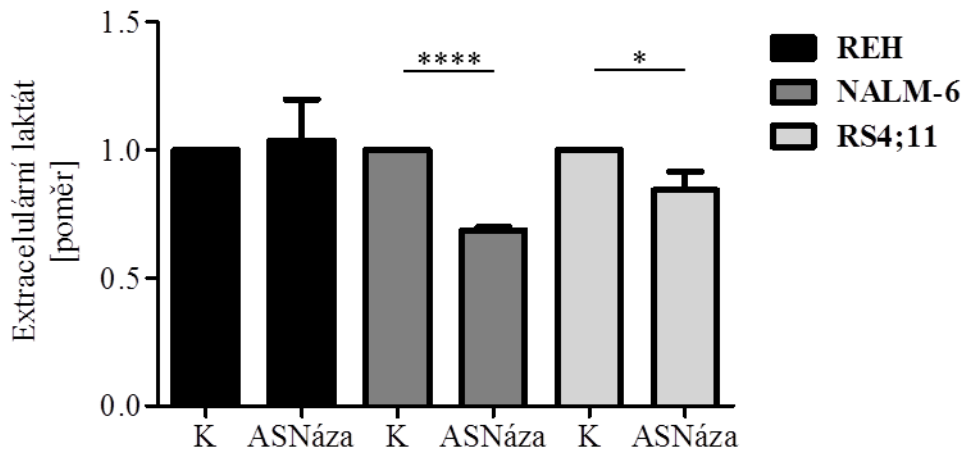
Obr. 21 – Obsah extracelulárních aminokyselin po inkubaci linie NALM-6 s ASNázou



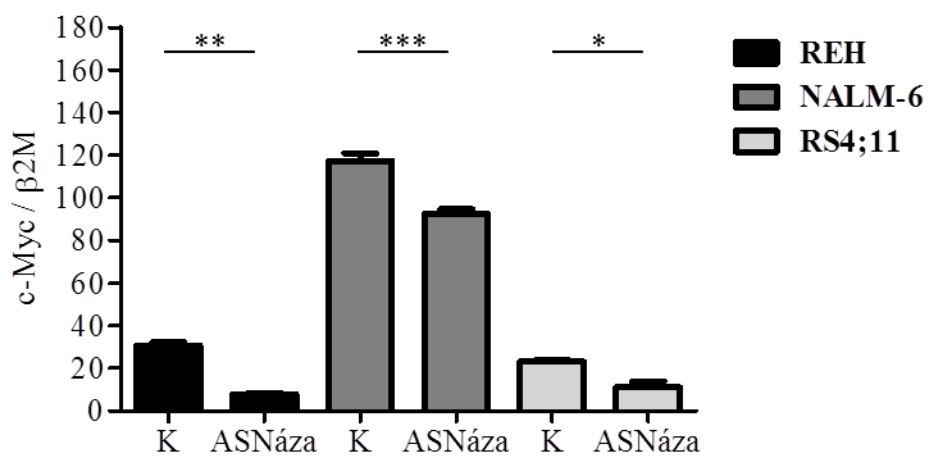
Obr. 22 – Oxidace mastných kyselin ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



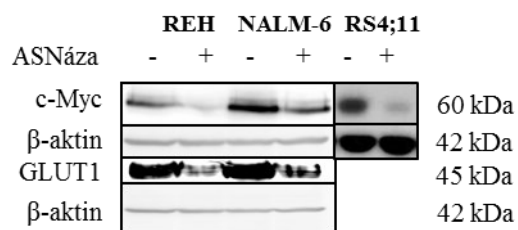
Obr. 23 – Spotřeba glukózy ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



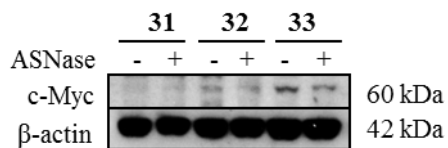
Obr. 24 – Extracelulární laktát po inkubaci ALL buněčných linií s ASNázou



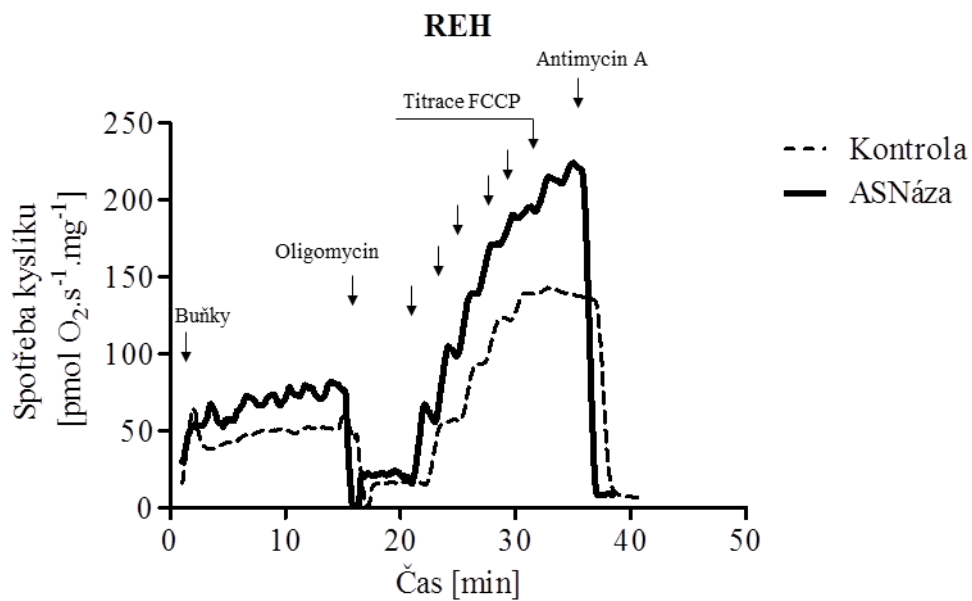
Obr. 25 – Normalizovaná hladina exprese genu pro *c-Myc* u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



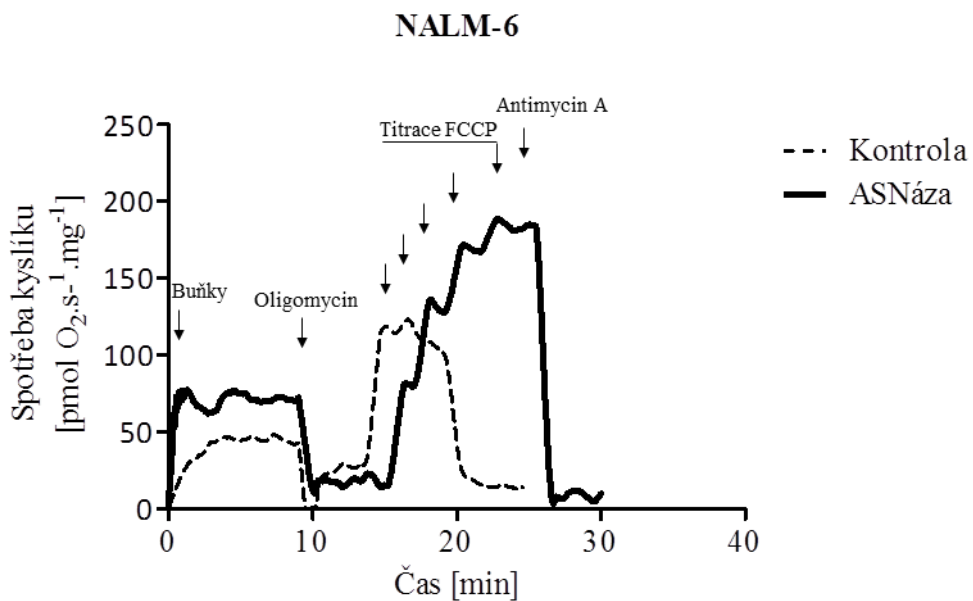
Obr. 26 – Hladina proteinu c-Myc a GLUT1 u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



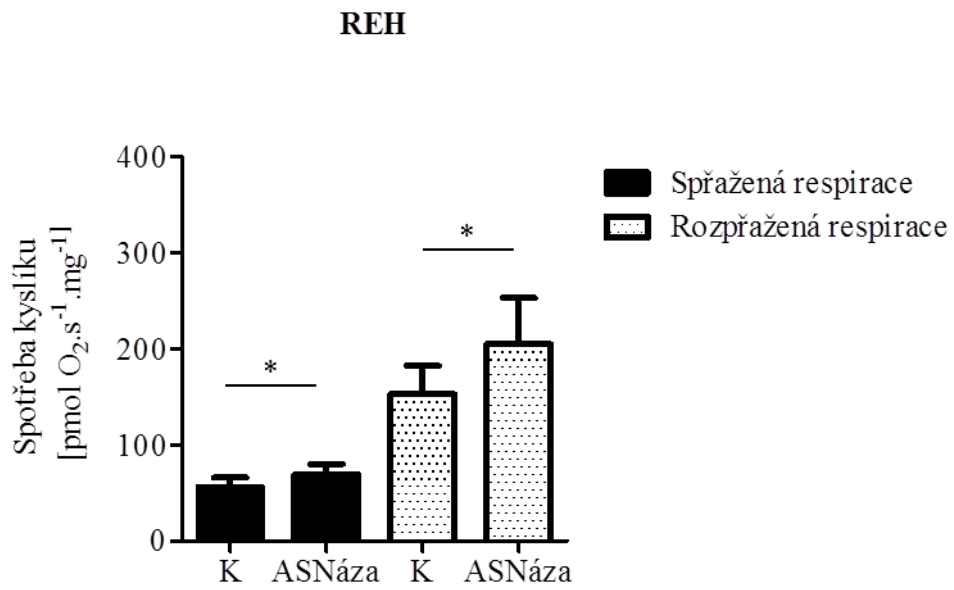
Obr. 27 – Hladina proteinu c-Myc u BCP ALL diagnostických vzorků po inkubaci s ASNázou



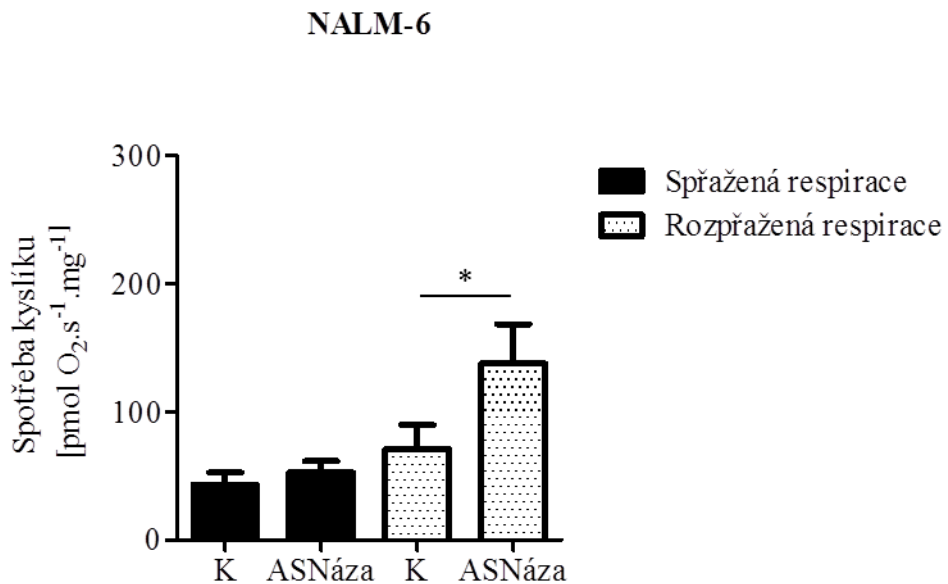
Obr. 28 – Reprezentativní obrázek respirace buněčné linie REH po inkubaci s ASNázou



Obr. 29 – Reprezentativní obrázek respirace buněčné linie NALM-6 po inkubaci s ASNázou

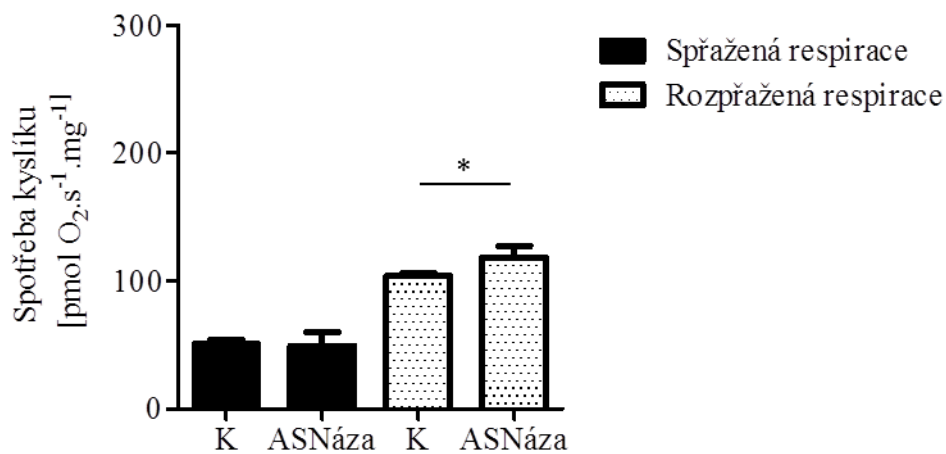


Obr. 30 – Respirace buněčné linie REH po inkubaci s ASNázou

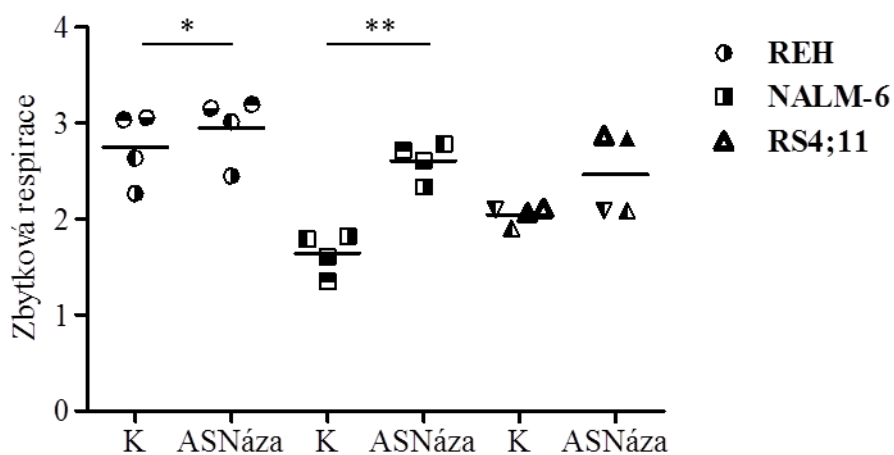


Obr. 31 – Respirace buněčné linie NALM-6 po inkubaci s ASNázou

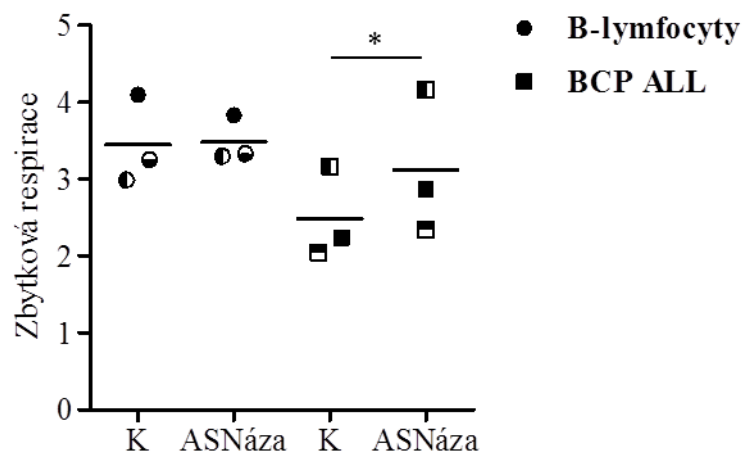
RS4;11



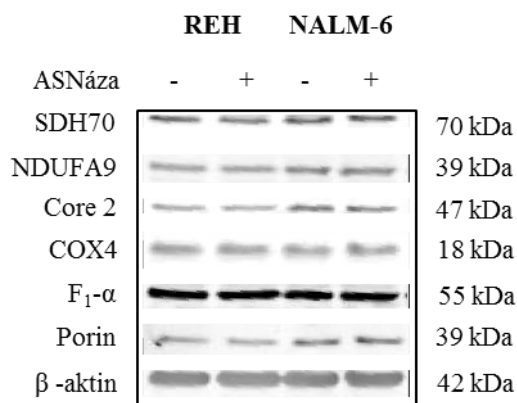
Obr. 32 – Respirace buněčné linie RS4;11 po inkubaci s ASNázou



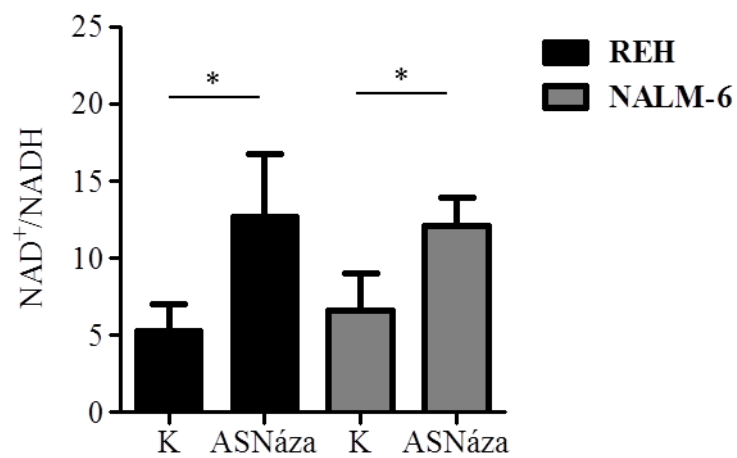
Obr. 33 – Zbytková respirace ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



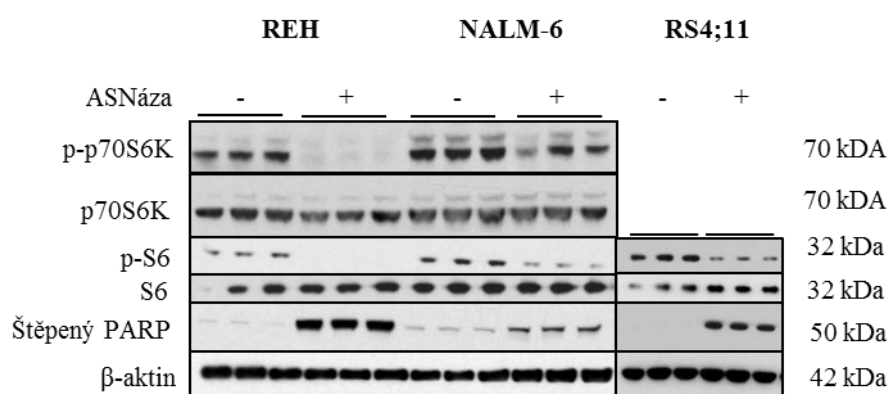
Obr. 34 – Zbytková respirace zdravých B-lymfocytů a BCP ALL diagnostických vzorků po inkubaci s ASNázou



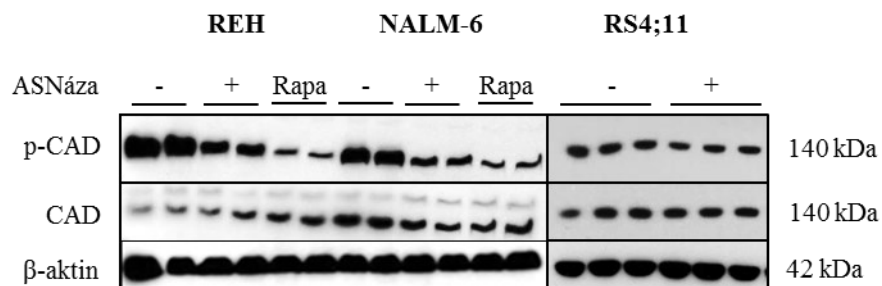
Obr. 35 – Hladina proteinů OXPHOS u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



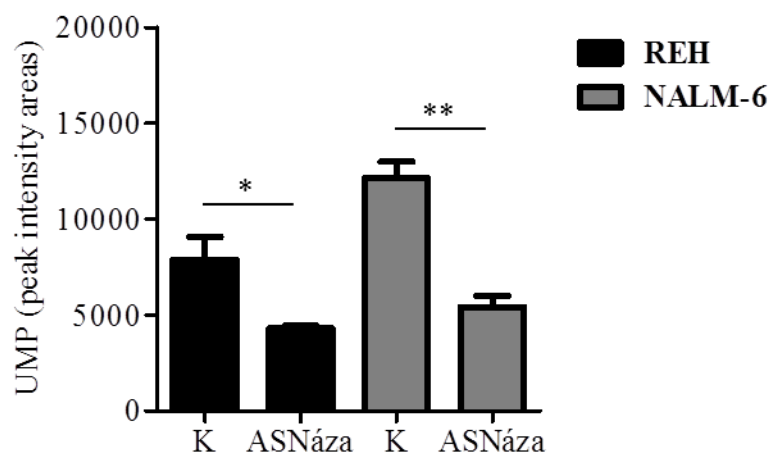
Obr. 36 – Poměr NAD⁺/NADH u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



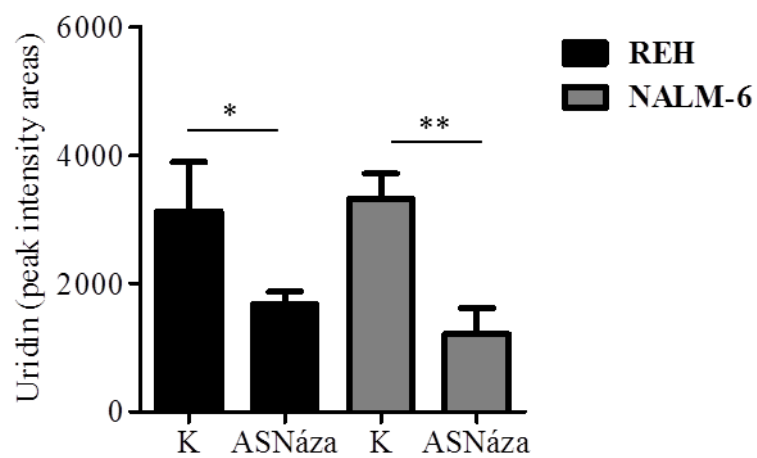
Obr. 37 – Hladina proteinů p-p70S6K, p70S6K, p-S6, S6 a štěpený PARP u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



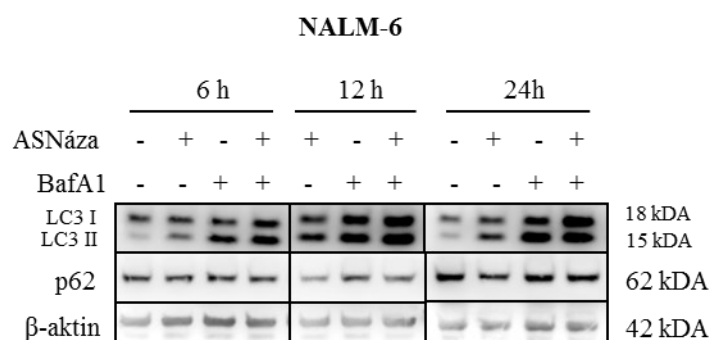
Obr. 38 – Hladina proteinů p-CAD a CAD u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou a rapamycinem



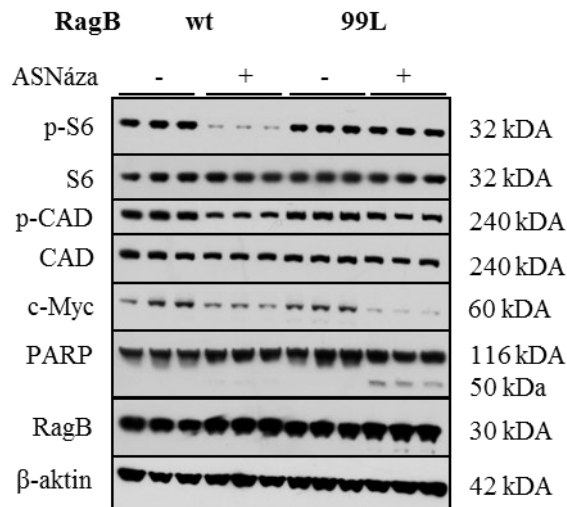
Obr. 39 – Hladina UMP u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



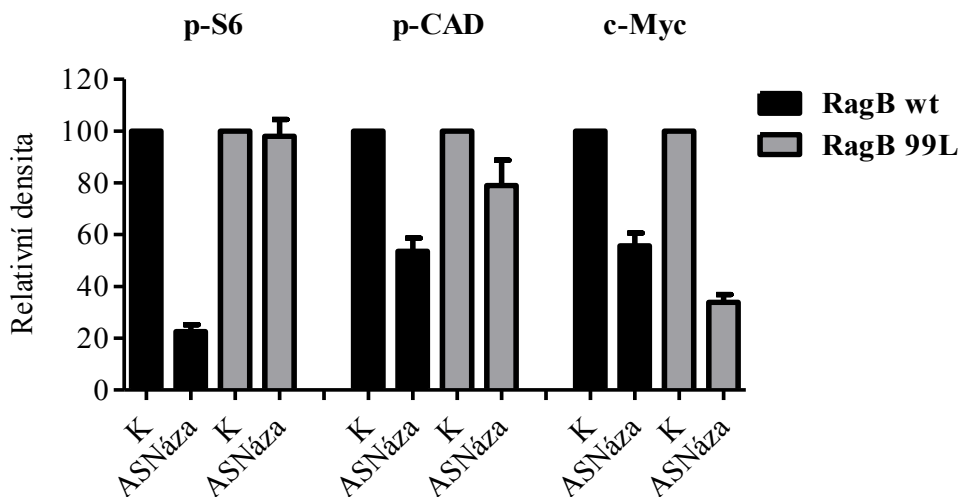
Obr. 40 – Hladina uridinu u ALL buněčných linií po inkubaci s ASNázou



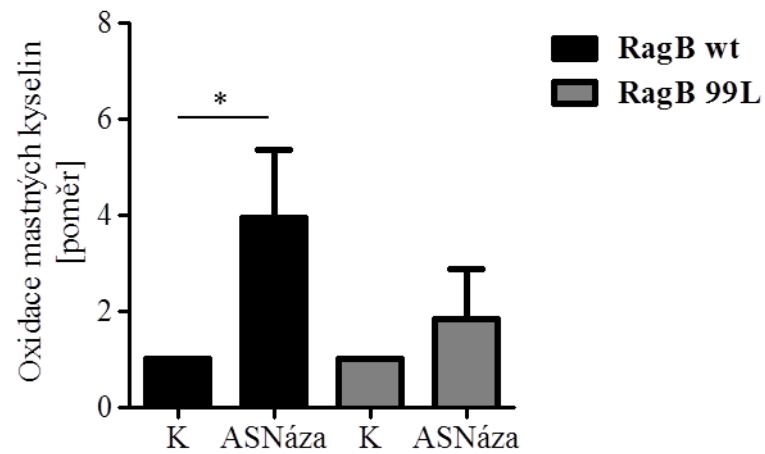
Obr. 41 – Autofagický tok u buněčné linie NALM-6 po inkubaci s ASNázou



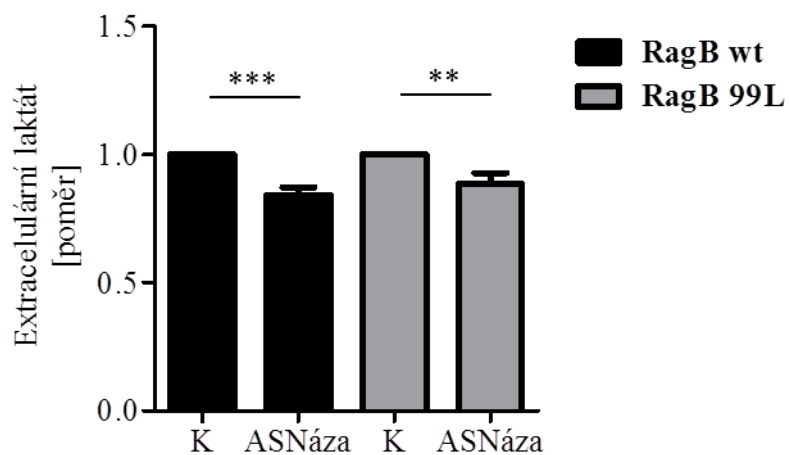
Obr. 42 – Hladina proteinů p-S6, S6, p-CAD, CAD, c-Myc, PARP a RagB u buněčných linií RagB wt a RagB 99L po inkubaci s ASNázou



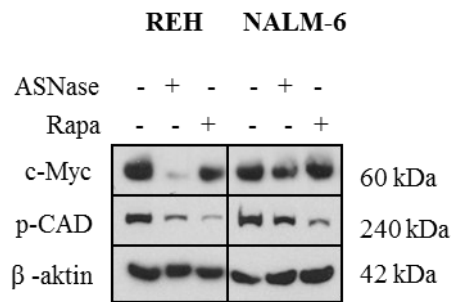
Obr. 43 – Výsledky densitometrie proteinů p-S6, p-CAD a c-Myc u buněčných linií RagB wt a RagB 99L po inkubaci s ASNázou



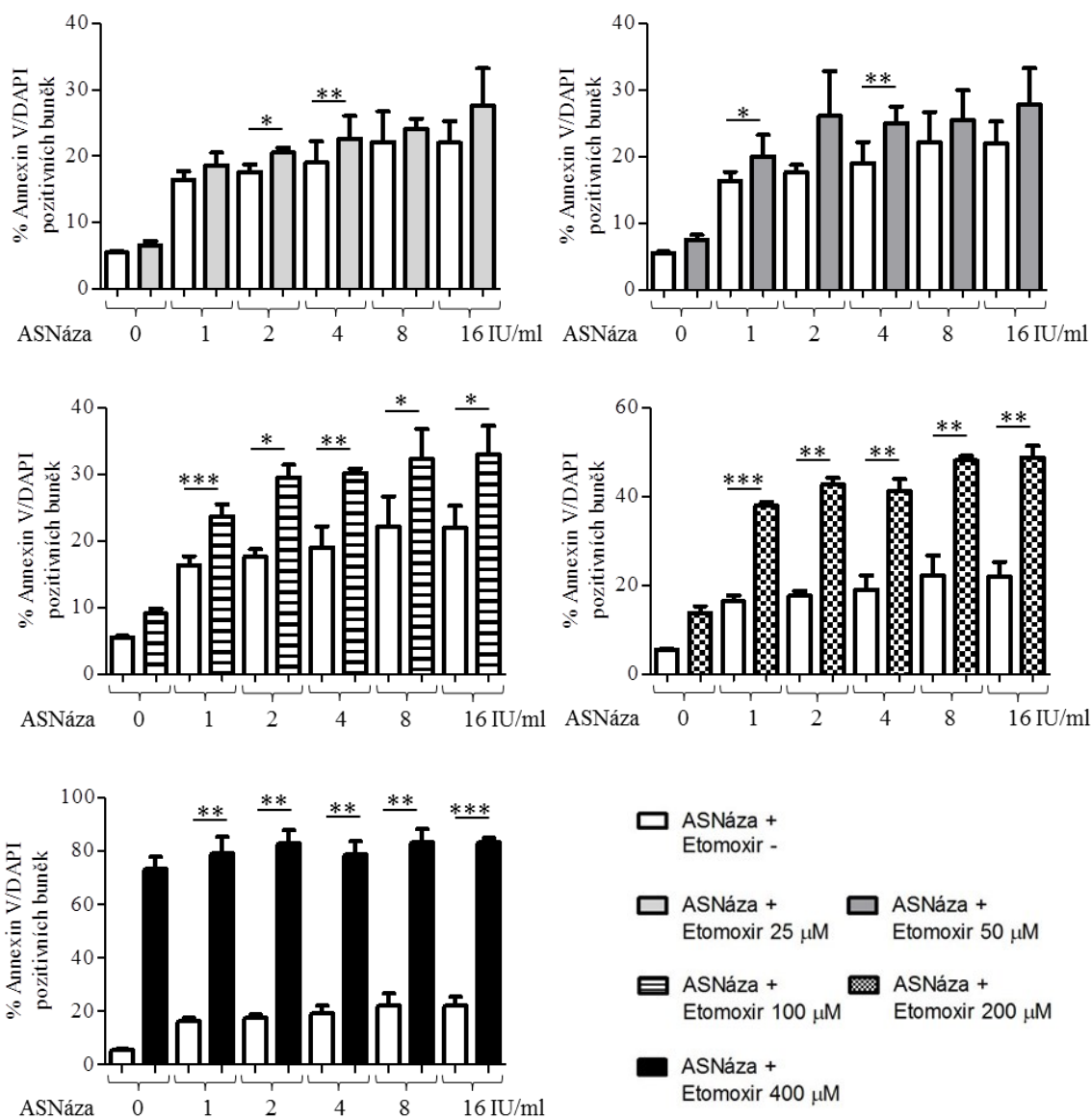
Obr. 44 – Oxidace mastných kyselin buněčných linií RagB wt a Ragb 99L po inkubaci s ASNázou



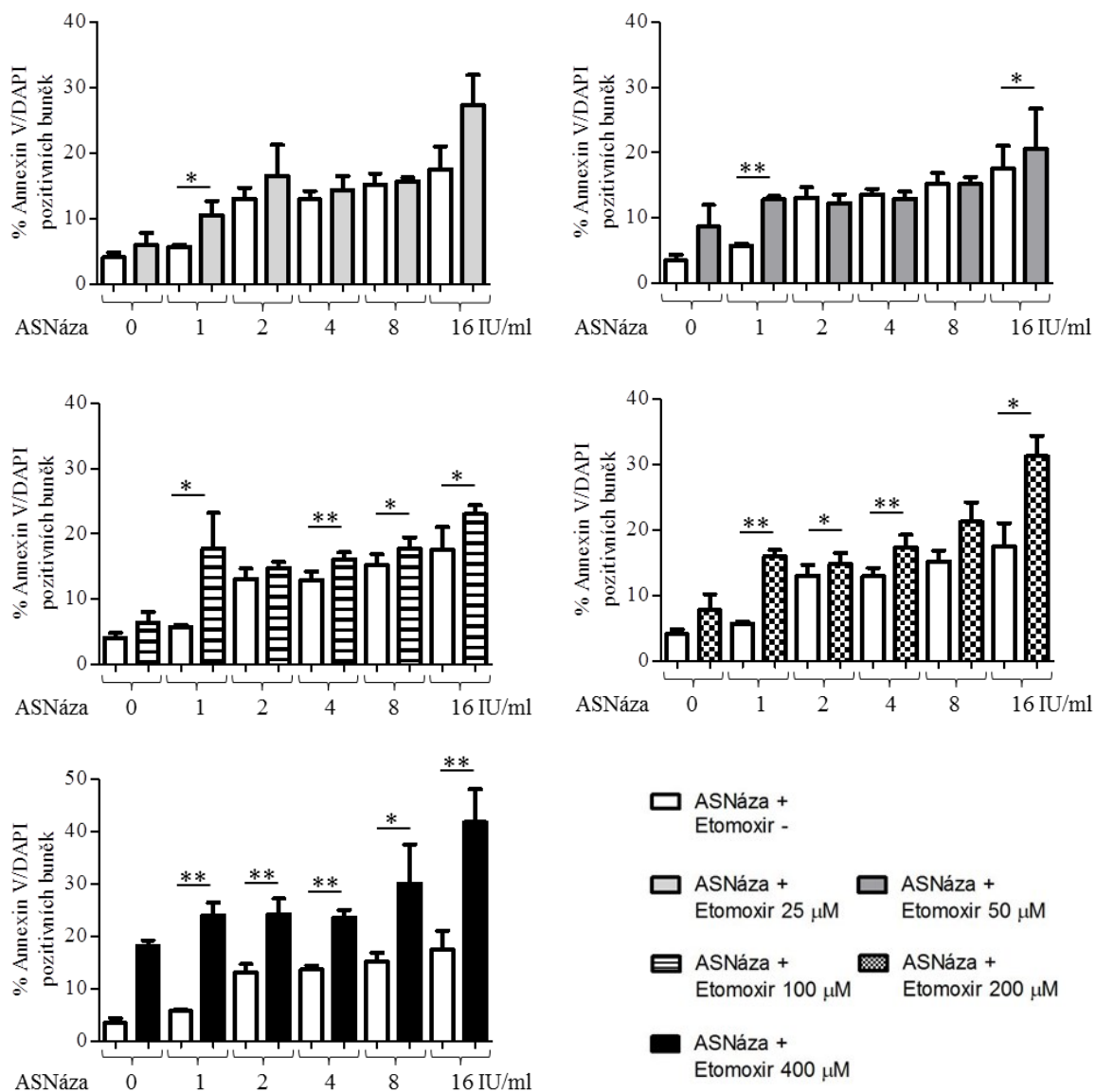
Obr. 45 – Extracelulární laktát buněčných linií RagB wt a RagB 99L po inkubaci s ASNázou



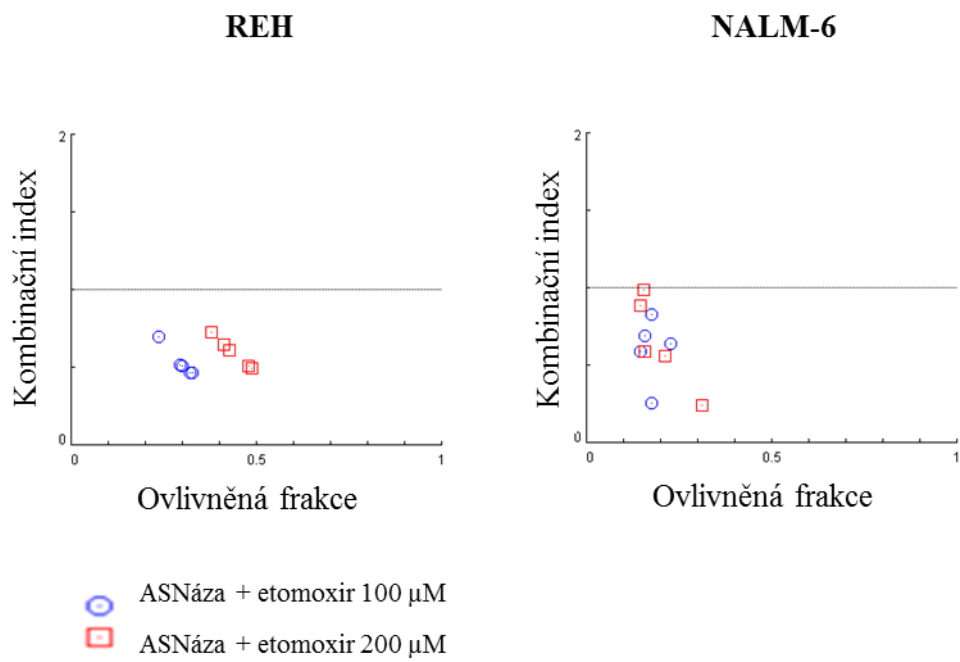
Obr. 46 – Hladina proteinů c-Myc a p-CAD u buněčných linií REH a NALM-6 po inkubaci s ASNázou a rapamycinem



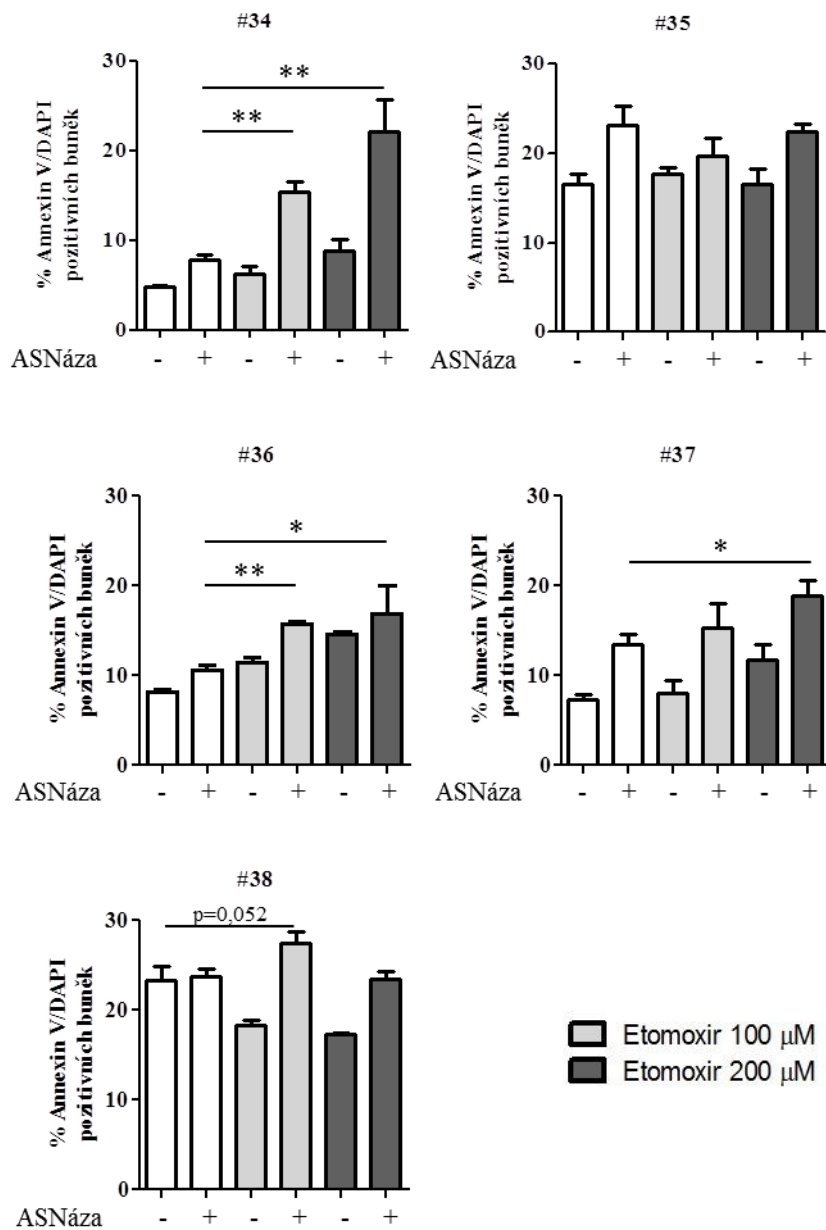
Obr. 47 – Procento apoptotických buněk po inkubaci buněčné linie REH s ASNázou a etomoxirem



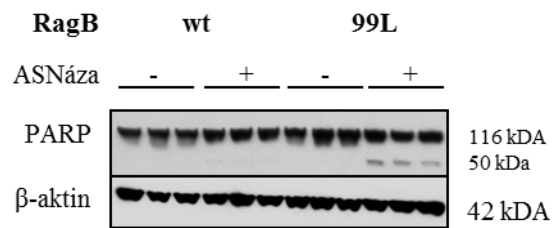
Obr. 48 – Procento apoptotických buněk po inkubaci buněčné linie NALM-6 s ASNázou a etomoxirem



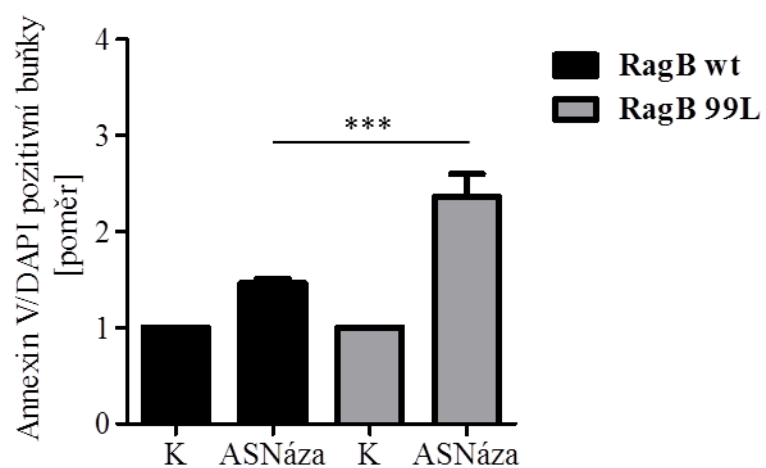
Obr. 49 – Kombinační index ASNázy a etomoxiru u buněčných linií REH a NALM-6



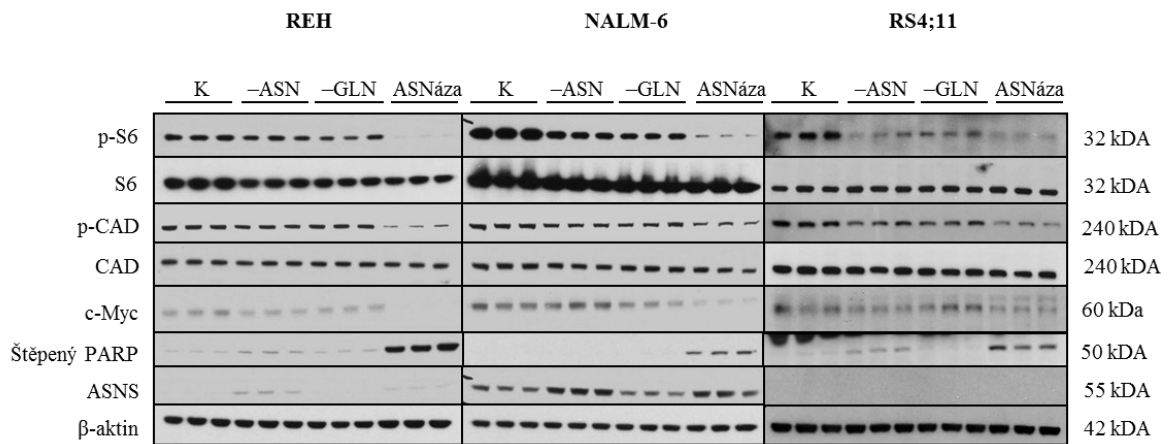
Obr. 50 – Procento apoptotických buněk po inkubaci BCP ALL diagnostických vzorků s ASNázou a etomoxirem



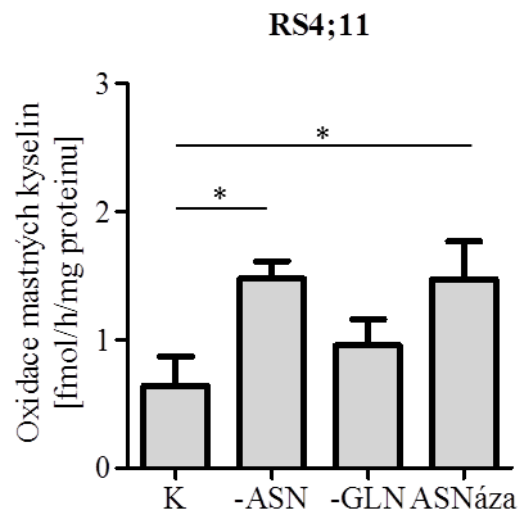
Obr. 51 – Hladina proteinu PARP u buněk RagB wt a RagB 99L po inkubaci s ASNázou



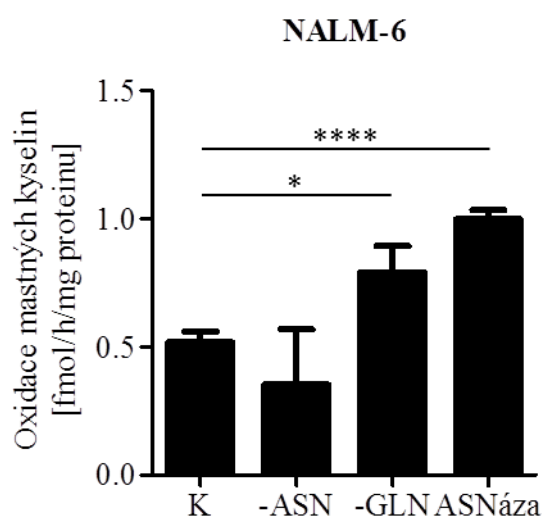
Obr. 52 – RagB wt a RagB 99L apoptotické buňky po inkubaci s ASNázou



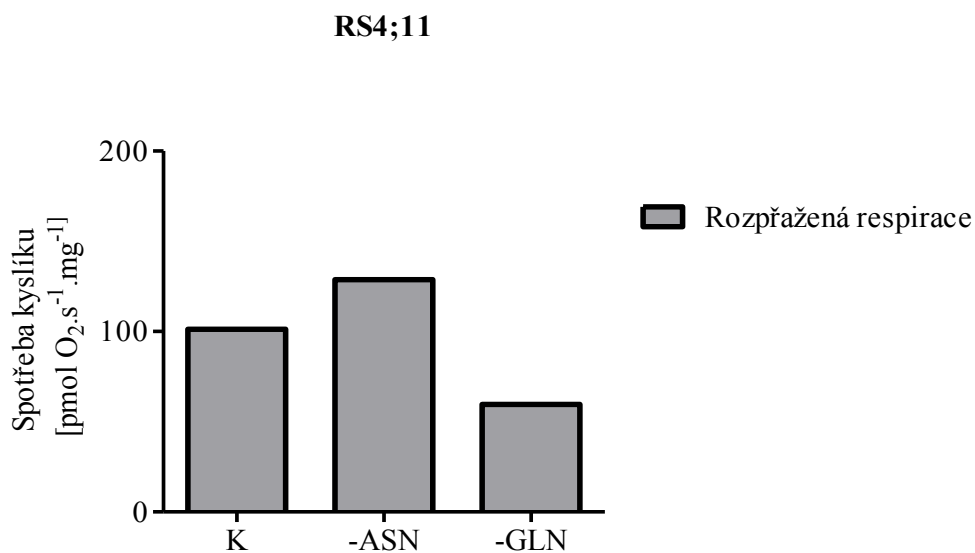
Obr. 53 – Hladina proteinů p-S6, S6, p-CAD, CAD, c-Myc, štěpený PARP a ASNS u ALL buněčných linií po inkubaci v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu, médiu RPMI bez glutaminu a kompletním médiu RPMI s ASNázou



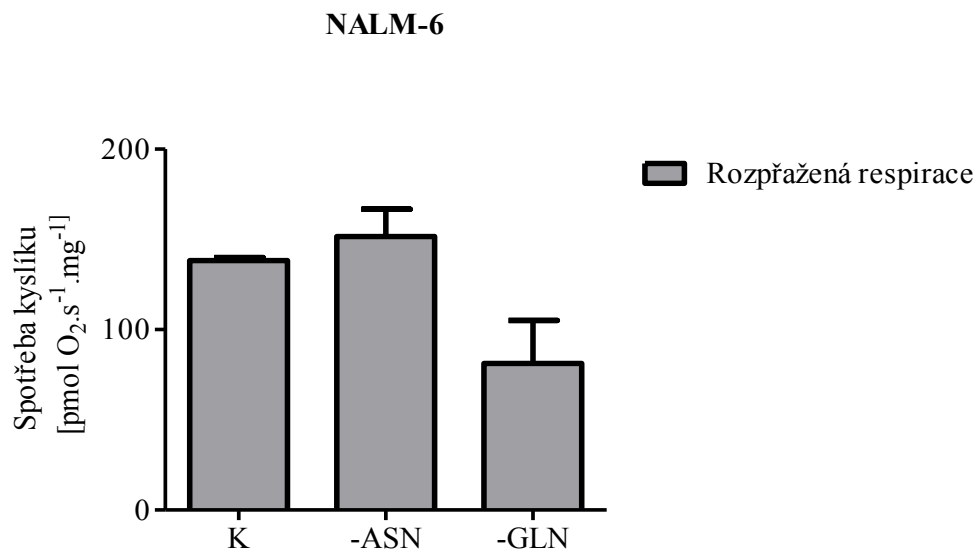
Obr. 54 – Oxidace mastných kyselin buněčné linie RS4;11 po inkubaci v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu, médiu RPMI bez glutaminu a kompletním médiu RPMI s ASNázou



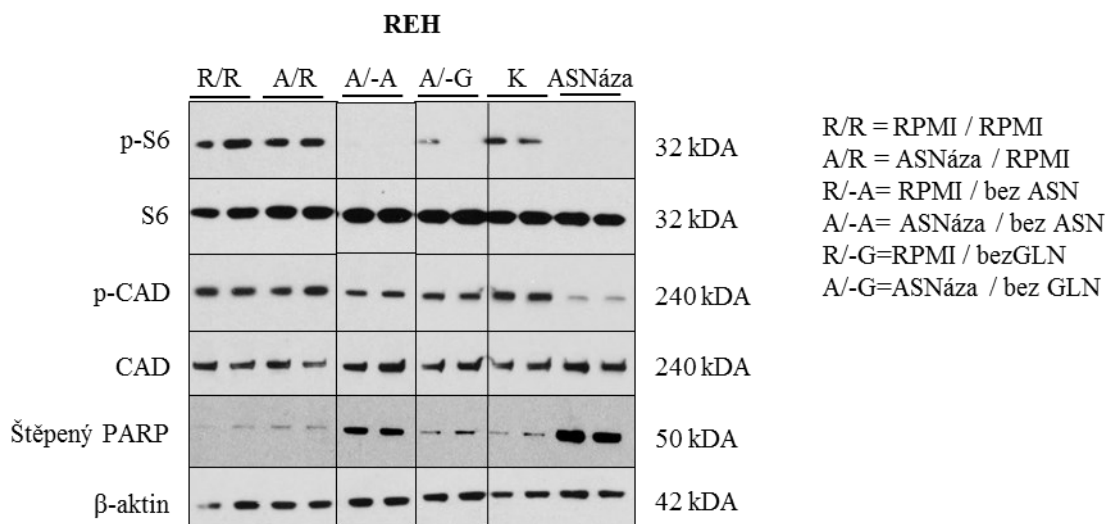
Obr. 55 – Oxidace mastných kyselin buněčné linie NALM-6 po inkubaci v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu, médiu RPMI bez glutaminu a kompletním médiu RPMI s ASNázou



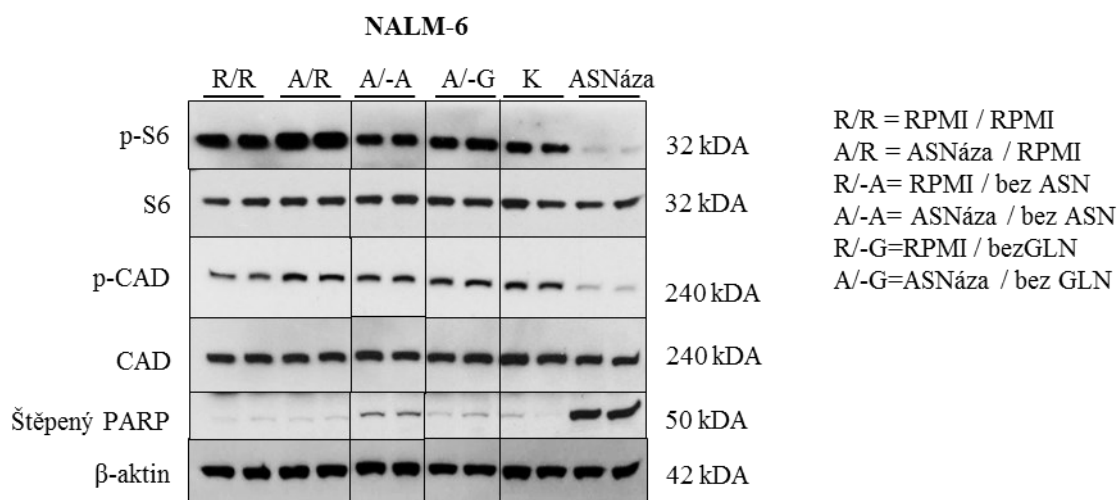
Obr. 56 – Respirace buněčné linie RS4;11 po inkubaci v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu a médiu RPMI bez glutaminu



Obr. 57 – Respirace buněčné linie NALM-6 po inkubaci v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu a médiu RPMI bez glutaminu



Obr. 58 – Hladina proteinů p-S6, S6, p-CAD, CAD, štěpený PARP u buněčné linie REH preinkubované v kompletním médiu s ASNázou a poté inkubované v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu nebo bez glutaminu



Obr. 59 – Hladina proteinů p-S6, S6, p-CAD, CAD, štěpený PARP u buněčné linie NALM-6 preinkubované v kompletním médiu s ASNázou a poté inkubované v kompletním médiu RPMI, médiu RPMI bez asparaginu nebo bez glutaminu

Číslo	věk (měsíce)	pohlaví	diagnóza	mol. aberace	karyotyp	léčebný protokol	výsledek
1	4	m	cALL		56,XY,+X,+Y,+4,+6,+8,+14,+14,+18,+21,+21[5]/46,XY[4]	ALL BFM 2009	CR1
2	2	ž	cALL		53~54,XY,+X,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[cp20]/46,XY[2]	ALL BFM 2009	CR1
3	13	m	praeB ALL		46,XY,?der(7),?der(11) [4]/46,XY[14]	ALL BFM 2009	CR1
4	3	m	cALL	TEL/AML1	46,XY[13]	ALL BFM 2009	CR1
5	5	m	cALL		46,XY[17]	ALL BFM 2009	CR1
6	3	m	cALL		55,XX,+4,+5,+6,+8,+10,+12,+14,+17,+18,+21[cp12]/46,XX[1]	ALL BFM 2009	CR1
7	6	m	cALL		47,XY,?der(5),t(8,12,21),+mar[5]/46,XY,?der(5),t(8,12,21)[7]]/46,XY,t(8,12,21) [5]	ALL BFM 2009	CR1
8	3	m	cALL		84-88, XX [9]	ALL-IC BFM 2002	CR1
9	4	ž	cALL	TEL/AML1	No data	ALL-IC BFM 2002	Relaps,
10	3	ž	cALL	TEL/AML1	46, XX [6]	ALL-IC BFM 2002	CR2
11	8	m	cALL	TEL/AML1	No data	ALL-IC BFM 2002	CR1
12	5	m	cALL	TEL/AML1	46,XY,t(12;21)(p13;q22),del(12)(p13),der(21)t(21;?) [?]	ALL-IC BFM 2002	CR1
13	14	m	cALL		No data	Interim	CR1
14	17	ž	cALL		46, XX [6]	ALL-IC BFM 2002	CR1
15	10	m	cALL		47, XY,+8,del(9)(p11)[12]	Interim	CR1
16	5	m	cALL		58~62,XY,+X,der(1),+4,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+14,i(17q),+18,+21,+21,+21,+2mar[cp9]/59,XY,+X+der(2),+4,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+14,i(17q),+18,+21,+21,+21[2]	Interim	CR1
17	8	ž	praeB ALL	TEL/AML1	No data	Interim	CR1
18	16	ž	cALL		46,XX	Interim	ex.l.
19	18	m	cALL		45,XY,del(9p), -20	Interim	CR1
20	3	m	cALL		58,XXYY,+3,+6,+8,+10,+10,+14,+14,+18,+21,+21 [19]/46,XY [6]	Interim	CR1
21	6	f	cALL		46,XX[12], 47XX,+21[2]	Interim	CR1
22	7	m	cALL		59~63,CY,+X,dup(1)(q21.1q32.2),+4,+5,+der(6)t(X;6)(?;q11),+8,+8,+10,+11,+12,+14,+15,+17,+18,+21,+21,22[12]	Interim	CR1
23	4	f	praeB ALL		59<2n>,XX,+X,+4,+5,+6,+7,+9,+10,+14,+16,+17,+18,+21,+21[13], 46,XX[7]	Interim	CR1
24	2	m	praeB ALL		46,XY[20]	Interim	CR1

Tab. 1 Základních charakteristika pacientů (1. Část)

Číslo	věk (měsíce)	pohlaví	diagnóza	mol. aberace	karyotyp	léčebný protokol	výsledek
25	6	f	cALL		63~65,XX,?der(2),+3,+5,+6,+7,?der(9),+10,+11,+12,+14,+15,+18,+21,+21,+5,-7mar [cp9]	Interim	CR1
26	1	m	proB		No data	Interfant	CR1
27	4	m	cALL		No data	Interim	CR1
28	7	m	cALL		56,XY,+X,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21,+22[4]/46,XY[4]	ALL BFM 2009	CR1
29	3	f	cALL	TEL/AML1	No data	ALL BFM 2009	CR1
30	3	m	cALL		50~54,XY,+X,+18,+21,+21[cp6]/46,XY[3]	ALL BFM 2009	CR1
31	11	F	cALL	mBCR/ABL	46,XX,t(9;22)(q34;q11)der(9)t(1;9)(p?22;p24)[21]	EsPhALL	relaps BM+CNS/early
32	6	M	praeB-ALL	B-other	50,XY,+X,+4,idelic(7)(p11.1),+10,+21[12]/46,XY[8]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
33	4	F	cALL	TEL/AML1	46,XX[10]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
34	6	F	cALL	TEL/AML1	45,X,-X,der(12)t(12;21)(p13;q22)del(12)(p13p13),der(21)t(12;21)(p13;q22)[15]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
35	13	M	cALL		46,XY[18]	AIEOP-BFM ALL 2009	relaps BM/early
36	5	M	cALL	hyperdiploid	46,XY[17]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
37	3	M	cALL	TEL/AML1	46,XY,t(5;13)(q?35;q?13),t(12;21)(p13;q22),del(12)(p13)[9]/46,XY,t(12;21)(p13;q22),del(12)(p13)[8]/46,XY[1]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
38	14	M	cALL	hyperdiploid	46,XY,del(9)(p21),der(9)del(9)(p21)t(1;9)(q?25;p13)[28].ish der(9)del(9)(p21)t(1;9)(INK4A-,ARF-,INK4B-,D9Z1+;wcp1+,wcp9+)	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
39	3	F	cALL	TEL/AML1	46,XX,del(12)(p13)[6]/46,XX[9].ish t(12;21)(ETV6-,RUNX1+;ETV6+,RUNX1+),del(12)(p13)(ETV6-)[12/20]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1
40	2	M	cALL		54,XY,+X,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[15]/46,XY[7]	AIEOP-BFM ALL 2009	CR1

Tab. 1 Základní charakteristika pacientů (2. Část)

Název	Sekvence primerů (5'-3')
ASNS forward primer	AAAGTGGAGCCTTTTCTTCCTG
ASNS reverse primer	AGCCAATCCTTCTGTCTGTCATC
c-Myc forward primer	TCGGATTCTCTGCTCTCCTC
c-Myc reverse primer	TCGGTTGTTGCTGATCTGTC
RagB sekvenační primer (exon 1)	TGAGTAATATCAACCAAATTGCAGACA
RagB sekvenační primer (exon 2)	GCTGTTCCGGGTGAGATCC

Tabulka 2. Sekvence použitých primerů

Název protilátky	Výrobce
anti-Phospho-p70S6K (T389)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-p70S6K	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-S6	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-phospho-S6 (Ser235/236)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-PARP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-c-Myc	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-CAD	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-phospho-CAD (Ser1859)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-RagB	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-LC3	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
anti-Glut-1	Abcam, Cambridge, MA, USA
OXPHOS Blue Native WB Antibody Cocktail	Abcam, Cambridge, MA, USA
anti-Porin	Poskytnuta Prof. De Pintem, University of Catania, Catania, Italy
anti-ASNS	Poskytnuta Dr. Kilbergem, University of Florida College of Medicine, USA
anti-p62/SQSTM1	Abnova, Taipei, Taiwan
anti-β-actin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tabulka 3. Seznam použitých protilátek

Gen	popis	REH vs. rezREH			N6 vs rezN6		
		regulace	p-value	FC Absolute	regulace	p-value	FC Absolute
CTSG	cathepsin G	zvýšení	1,58E-04	6,26	zvýšení	9,45E-04	6,55
RBM3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	zvýšení	7,97E-03	2,67	zvýšení	7,85E-05	2,28
TPMT	thiopurine S-methyltransferase	zvýšení	2,90E-03	2,42	zvýšení	3,98E-03	2,03
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	zvýšení	5,39E-03	2,08	zvýšení	1,01E-05	1,69
CPAMD8	C3 and PZP-like, alpha-2-macroglobulin domain containing 8	snížení	2,23E-03	5,70	snížení	5,56E-03	5,50
LFNG	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	snížení	6,44E-03	4,08	snížení	5,99E-04	1,91
SNAPC3	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3, 50kDa	snížení	8,06E-03	3,33	snížení	5,30E-03	5,30
THAP9	THAP domain containing 9	snížení	8,93E-03	2,48	snížení	8,55E-03	2,55
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	snížení	6,25E-04	2,30	snížení	2,31E-03	3,94
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	snížení	7,04E-03	2,11	snížení	9,06E-05	4,75
CCDC46	coiled-coil domain containing 46	snížení	5,76E-03	1,96	snížení	8,24E-03	1,70
GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	snížení	1,58E-03	1,58	snížení	8,53E-03	1,97
LST1	leukocyte specific transcript 1	snížení	1,29E-03	5,61	zvýšení	8,90E-03	2,94
CCDC69	coiled-coil domain containing 69	snížení	2,12E-03	4,03	zvýšení	1,41E-03	2,69
FAM129C	family with sequence similarity 129, member C	snížení	7,98E-03	3,93	zvýšení	1,69E-03	1,84
LY86	lymphocyte antigen 86	snížení	6,15E-03	2,21	zvýšení	7,61E-03	3,33
EAF2	ELL associated factor 2	snížení	4,32E-03	2,05	zvýšení	5,70E-03	1,64
ABHD14B	abhydrolase domain containing 14B	snížení	9,29E-03	1,88	zvýšení	9,11E-04	1,65
METTL7A	methyltransferase like 7A	snížení	1,14E-03	1,77	zvýšení	2,32E-04	2,77
C15orf37	chromosome 15 open reading frame 37	snížení	5,06E-03	1,73	zvýšení	7,55E-03	1,75
C12orf75	chromosome 12 open reading frame 75	snížení	8,46E-03	1,66	zvýšení	6,00E-07	1,66
SEC31A	SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	snížení	7,01E-03	1,45	zvýšení	2,66E-03	2,00
HIST2H2AA3	histone cluster 2, H2aa3	zvýšení	8,41E-03	2,65	snížení	9,56E-03	1,82
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	zvýšení	7,56E-03	2,34	snížení	2,65E-04	6,21
NXN	nucleoredoxin	zvýšení	3,63E-03	2,10	snížení	6,26E-03	2,90

Tabulka 4 - Seznam genů, jejichž exprese byla změněna po vytvoření rezistence k ASNáze

Gen	Popis genu	Linie	Expres u ALL linií	Expres u BCP-ALL vzorků
LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	rezNALM-6	snížená	zvýšená
FKBP11	FK506 binding protein 11	rezREH	snížená	zvýšená
FBL	fibrillarin	rezREH	zvýšená	zvýšená
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	rezREH	snížená	snížená
CD47	CD47 molecule	rezREH	zvýšená	zvýšená
MAGEH1	melanoma antigen family H1	rezREH	snížená	snížená
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	rezREH	zvýšená	zvýšená
TMEM5	transmembrane protein 5	rezREH	snížená	zvýšená
APOE	apolipoprotein E	rezNALM-6	zvýšená	zvýšená
OTUD4	OTU deubiquitinase 4	rezNALM-6	snížená	snížená
CDC34	cell division cycle 34	rezREH	zvýšená	zvýšená
CCDC69	coiled-coil domain containing 69	průnik	snížená/zvýšená (REH/N6)	zvýšená
PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	rezREH	zvýšená	snížená
NPY	neuropeptide Y	rezNALM-6	zvýšená	snížená
SF3A1	splicing factor 3a, subunit 1	rezREH	snížená	zvýšená
SMEK1	SMEK homolog 1, suppressor of mek1	rezREH	zvýšená	snížená
SFRS14	SURP and G patch domain containing 2	rezNALM-6	snížená	zvýšená
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	rezREH	snížená	zvýšená/snížená
HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	rezREH	snížená	snížená
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	rezNALM-6	snížená	zvýšená
QARS	glutamyl-tRNA synthetase	rezREH	zvýšená	zvýšená
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	rezREH	snížená	snížená
MICAL3	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3	rezREH	zvýšená	zvýšená
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	rezREH	zvýšená	zvýšená
DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23	rezREH	zvýšená	zvýšená
VEZF1	vascular endothelial zinc finger 1	rezNALM-6	zvýšená	snížená
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	rezNALM-6	snížená	zvýšená
TOM1	target of myb1 membrane trafficking protein	rezREH	zvýšená	zvýšená
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	rezNALM-6	snížená	snížená
RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	NALM-6	snížená	snížená
FH	fumarate hydratase	rezREH	snížená	zvýšená
HLA-F	major histocompatibility complex, class I	rezREH	zvýšená	snížená

Tabulka 5. Seznam genů charakterizujících společné znaky ALL linií a BCP ALL pacientů rezistentních k ASNáze

Název biologické dráhy	p
Delta508-CFTR traffic / ER-to-Golgi in CF	9,82E-05
Normal wtCFTR traffic / ER-to-Golgi	9,82E-05
Transport_Rab-9 regulation pathway	1,18E-02
Regulation of lipid metabolism_Regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 activity in lipogenic tissue	2,00E-02
Regulation of lipid metabolism_Regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 activity in keratinocytes	2,00E-02
Development_Glucocorticoid receptor signaling	2,81E-02
Neurophysiological process_nNOS signaling in neuronal synapses	3,39E-02
Regulation of lipid metabolism_RXR-dependent regulation of lipid metabolism via PPAR, RAR and VDR	3,51E-02
Apoptosis and survival_Regulation of Apoptosis by Mitochondrial Proteins	3,62E-02
Cell cycle_Start of DNA replication in early S phase	3,74E-02

Tab. 6. – Výsledek analýzy expresních profilů parentálních a rezistentních ALL linií za použití nástroje „Top GeneGo Pathway Maps“

Název biologické sítě	p
Transcription_Transcription by RNA polymerase II	2,85E-02
Signal transduction_NOTCH signaling	5,86E-02
Protein folding_ER and cytoplasm	7,37E-02
Protein folding_Protein folding nucleus	9,41E-02
Apoptosis_Apoptotic mitochondria	1,23E-01
Proteolysis_ECM remodeling	1,35E-01
Signal transduction_Nitric oxide signaling	1,40E-01
Signal transduction_Leptin signaling	1,61E-01
Proteolysis_Connective tissue degradation	1,84E-01
Protein folding_Folding in normal condition	1,84E-01

Tab. 7. – Výsledek analýzy expresních profilů parentálních a rezistentních ALL linií za použití nástroje „GeneGo Networks“

Název biologické dráhy
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling
Immune response_T cell receptor signaling pathway
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling
Development_MAG-dependent inhibition of neutrite outgrowth
Translation_Regulation of translation initiation
Immune response_CD28 signaling
Signal transduction_Erk Interactions: Inhibition of Erk
Immune response_Fc epsilon RI pathway
Immune response_Histamin H1 receptor signaling in immune response
Apoptosis and survival_BAD phosphorylation

Tab. 8 – Výsledek analýzy expresního profilu BCP ALL vzorků za použití nástroje „Top GeneGo Pathway Maps“

Název biologické sítě
Translation_Translation initiation
Translation_Elongation-Termination
Translation_Elongation-Termination_test
Immune response_Antigen presentation
Immune response_BCR pathway
Immune response_Phagosome in antigen presentation
Inflamation_NK cell cytotoxicity
Signal transduction_WNT signaling
Inflammation_MIF signaling
Cell cycle_G2-M

Tab. 9 – Výsledek analýzy expresního profilu BCP ALL vzorků za použití nástroje „GeneGo Networks“

Název biologické dráhy	p
Immune response_Signaling pathway mediated by IL-6 and IL-1	7,649E-04
Regulation of metabolism_Bile acids regulation of glucose and lipid metabolism via FXR	1,165E-03
Development_FGF-family signaling	2,292E-03
Development_FGFR signaling pathway	2,470E-03
Immune response_CCR3 signaling in eosinophils	4,960E-03
Cell adhesion_Chemokines and adhesion	8,243E-03
Immune response_Antigen presentation by MHC class II	1,668E-02
Development_FGF2-dependent induction of EMT	2,766E-02
Atherosclerosis_Role of ZNF202 in regulation of expression of genes involved in Atherosclerosis	2,903E-02
Development_S1P4 receptor signaling pathway	3,039E-02

Tab. 10. – Výsledek analýzy průniku expresních profilů senzitivních a rezistentních ALL linií a BCP ALL pacientů za použití nástroje „Top GeneGo Pathway Maps“

Název biologické sítě	p
Signal transduction_CREM pathway	2,085E-03
Inflammation_Interferon signaling	2,899E-03
Inflammation_IL-4 signaling	3,288E-03
Translation_Regulation of initiation	4,351E-03
Signal transduction_Neuropeptide signaling pathways	7,578E-03
Cell cycle_G1-S Growth factor regulation	1,416E-02
Regulation of metabolism_Bile acid regulation of lipid metabolism and negative FXR-dependent regulation of bile acids concentration	1,501E-02
Cell cycle_G2-M	1,619E-02
Inflammation_Neutrophil activation	1,930E-02
Proliferation_Positive regulation cell proliferation	1,977E-02

Tab. 11. – Výsledek analýzy průniku expresních profilů senzitivních a rezistentních ALL linií a BCP ALL pacientů za použití nástroje „GeneGo Networks“

Seznam použitých zkratek

2DG	2-deoxyglukóza
2DG6P	2-deoxyglukóza-fosfát
2-HG	2-hydroxyglutarát
ABL	Abelson gene
Ag	stříbro
AgCl	chlorid stříbrný
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
Ala	alanin
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1	acute myeloid leukemia 1 protein
Arg	arginin
ASNase	L-asparaginase
ASNáza	L-asparagináza
ASNS	asparagin syntetáza
Asp	aspartát
ATF5	activating transcription factor 5
ATP	adenosintrifosfát
Baf	bafilomycin A1
BCP	B-cell precursor
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Munster

CaCl ₂	chlorid vápenatý
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2
cALL	common ALL
cDNA	complementary DNA
CLIP	Childhood Leukemia Investigation Prague
CML	chronic myeloid leukemia
CMML	chronická myelomonocytární leukémie
CNS	centrální nervový systém
CO ₂	oxid uhličitý
CPT1	carnitine palmitoyltransferáza I
CPT1	carnitine palmitoyltransferáza II
CR	complete remission
Cys	cystein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidy
DSMZ	Human and Animal Cell Lines Database
E.Coli	Escherichia coli
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EFS	event free survival
eIF2	eukariotický iniciační faktor 2
eIF2	eukariotický iniciační faktor 3

Eto	etomoxir
FADH2	redukovaný flavinadenindinukleotid
FAO	fatty acid oxidation
FBS	fetal bovine serum
FC	fold change
FCCP	carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FN	fakultní nemocnice
G6P	glukóza-fosfát
GCN2	general control nonderepressible kinase 2
Glu	glutamát
Gly	glycin
His/Gln	histidin/glutamin
HLA	human leukocyte antigen
HPLC	high-performance liquid chromatography
IDH	isocitrátdehydrogenáza
Ig	immunoglobulin
Ile	isoleucin
IU	International Unit
KCl	chlorid draselný
KD	kostní dřev
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
LC3	light chain 3
Leu	leucin

Lys	lysin
m	mili
M	molar
Met	methionin
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MgSO ₄	síran hořečnatý
min	minuta
MK	mastné kyseliny
MLL	mixed lineage leukemia
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MRN	minimální reziduální nemoc
MS	mass spectrometry
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
MTT	diphenyltetrazolium bromide
N	počet
Na ₃ VO ₄	ortovanadát sodný
NaCl	chlorid sodný
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADPH	redukovaný nikotinamidadeninindinukleotidfosfát
NaF	fluorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
nASNS	normalizovaná hladina exprese genu pro ASNS
NH ₃	amoniak
OS	overall survival
OXPPOS	oxidativní fosforylace
p	probability
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDGFRB	Beta-type platelet-derived growth factor receptor
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
Phe	phenylalanin
PI	Propidium iodide
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PK	periferní krev
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
Pro	prolin
PSDH	pracovní skupina pro dětskou hematologii
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
Rapa	rapamycin

rezNALM-6	subklon linie NALM-6 rezistentní ASNáze
rezREH	subklon linie REH rezistentní ASNáze
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIN	RNA integrity number
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	revolutions per minute
s	sekunda
SDS	sodiumdodecylsulfát
Ser/Asn	serin/asparagin
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SQSTM1	Sequestosome 1
TCR	T-cell receptor
Thr	threonin
ToF	time to flight
Tyr	tyrozin
UCP2	uncoupling protein 2
ÚHKT	ústav hematologie a krevní transfúze
ULK1	Unc51 like kinase 1
UMP	uridinmonophosphate
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USA	United States of America
Val	valin

VSV-G	virus envelope G protein
wt	wild type
α -KG	α -ketoglutarát
β 2M	β_2 microglobulin

Citovaná literatura

1. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011 Feb 10; **29**(5): 551-565.
2. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008 Mar 22; **371**(9617): 1030-1043.
3. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet Oncology* 2010 May; **11**(5): 429-438.
4. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, *et al.* Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007 Aug 15; **110**(4): 1112-1115.
5. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, *et al.* Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009 Nov 1; **27**(31): 5175-5181.
6. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, *et al.* High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 2005 May; **19**(5): 734-740.
7. Frohling S, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *The New England journal of medicine* 2008 Aug 14; **359**(7): 722-734.
8. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 2004 Apr 8; **350**(15): 1535-1548.
9. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007 Apr 12; **446**(7137): 758-764.
10. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988 Aug 4; **334**(6181): 395-402.
11. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; **6 Suppl 1**: 47-59.

12. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1991 Apr; **198**(1-2): 1-91.
13. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, *et al.* Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007 Feb 1; **109**(3): 896-904.
14. Pession A, Valsecchi MG, Masera G, Kamps WA, Magyarosy E, Rizzari C, *et al.* Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005 Oct 1; **23**(28): 7161-7167.
15. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001 Mar 1; **97**(5): 1211-1218.
16. Appel IM, Kazemier KM, Boos J, Lanvers C, Huijmans J, Veerman AJ, *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamic and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study. *Leukemia* 2008 Sep; **22**(9): 1665-1679.
17. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Smets LA, Van Wering ER, *et al.* In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 Oct 1; **90**(7): 2723-2729.
18. Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, *et al.* Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1991 Aug 17; **338**(8764): 399-403.
19. Miller HK, Balis ME. Glutaminase activity of L-asparagine amidohydrolase. *Biochemical pharmacology* 1969 Sep; **18**(9): 2225-2232.
20. Krasotkina J, Borisova AA, Gervaziev YV, Sokolov NN. One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biotechnology and applied biochemistry* 2004 Apr; **39**(Pt 2): 215-221.
21. Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *The Journal of experimental medicine* 1953 Dec; **98**(6): 565-582.
22. Neuman RE, McCoy TA. Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine. *Science* 1956 Jul 20; **124**(3212): 124-125.
23. Haley EE, Fischer GA, Welch AD. The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. *Cancer research* 1961 May; **21**: 532-536.

24. Domenech C, Thomas X, Chabaud S, Baruchel A, Gueyffier F, Mazingue F, *et al.* L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *British journal of haematology* 2011 Apr; **153**(1): 58-65.
25. Offman MN, Krol M, Patel N, Krishnan S, Liu J, Saha V, *et al.* Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* 2011 Feb 3; **117**(5): 1614-1621.
26. Miller HK, Salser JS, Balis ME. Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy. *Cancer research* 1969 Jan; **29**(1): 183-187.
27. Ohnuma T, Holland JF, Freeman A, Sinks LF. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer research* 1970 Sep; **30**(9): 2297-2305.
28. Kiriya Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, *et al.* Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia* 1989 Apr; **3**(4): 294-297.
29. Richards NG, Kilberg MS. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annual review of biochemistry* 2006; **75**: 629-654.
30. Richards NG, Schuster SM. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 1998; **72**: 145-198.
31. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, *et al.* Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *The New England journal of medicine* 2004 Aug 5; **351**(6): 533-542.
32. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, *et al.* TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000 Aug 1; **96**(3): 1094-1099.
33. Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, *et al.* Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 2004 Mar; **18**(3): 434-441.
34. Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER, *et al.* Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood* 2003 Apr 1; **101**(7): 2743-2747.
35. Fine BM, Kaspers GJ, Ho M, Loonen AH, Boxer LM. A genome-wide view of the in vitro response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research* 2005 Jan 1; **65**(1): 291-299.
36. Rousseau J, Gagne V, Labuda M, Beaubois C, Sinnott D, Laverdiere C, *et al.* ATF5 polymorphisms influence ATF function and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011 Nov 24; **118**(22): 5883-5890.

37. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 kinase GCN2 is essential for the murine immune system to adapt to amino acid deprivation by asparaginase. *The Journal of nutrition* 2010 Nov; **140**(11): 2020-2027.
38. Bunpo P, Dudley A, Cundiff JK, Cavener DR, Wek RC, Anthony TG. GCN2 protein kinase is required to activate amino acid deprivation responses in mice treated with the anti-cancer agent L-asparaginase. *The Journal of biological chemistry* 2009 Nov 20; **284**(47): 32742-32749.
39. Patel N, Krishnan S, Offman MN, Krol M, Moss CX, Leighton C, *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *The Journal of clinical investigation* 2009 Jul; **119**(7): 1964-1973.
40. van der Meer LT, Waanders E, Levers M, Venselaar H, Roeleveld D, Boos J, *et al.* A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. *Blood* 2014 Nov 6; **124**(19): 3027-3029.
41. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *The Journal of clinical investigation* 2007 Apr; **117**(4): 1049-1057.
42. Tong WH, Pieters R, Hop WC, Lanvers-Kaminsky C, Boos J, van der Sluis IM. No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatric blood & cancer* 2013 Feb; **60**(2): 258-261.
43. Ehsanipour EA, Sheng X, Behan JW, Wang X, Butturini A, Avramis VI, *et al.* Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer research* 2013 May 15; **73**(10): 2998-3006.
44. Killander D, Dohlwitz A, Engstedt L, Franzen S, Gahrton G, Gullbring B, *et al.* Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* 1976 Jan; **37**(1): 220-228.
45. Kawedia JD, Liu C, Pei D, Cheng C, Fernandez CA, Howard SC, *et al.* Dexamethasone exposure and asparaginase antibodies affect relapse risk in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012 Feb 16; **119**(7): 1658-1664.
46. Warrell RP, Jr., Arlin ZA, Gee TS, Chou TC, Roberts J, Young CW. Clinical evaluation of succinylated Acinetobacter glutaminase-asparaginase in adult leukemia. *Cancer treatment reports* 1982 Jul; **66**(7): 1479-1485.
47. Warrell RP, Jr., Chou TC, Gordon C, Tan C, Roberts J, Sternberg SS, *et al.* Phase I evaluation of succinylated Acinetobacter glutaminase-asparaginase in adults. *Cancer research* 1980 Dec; **40**(12): 4546-4551.
48. Haskell CM, Canellos GP, Leventhal BG, Carbone PP, Block JB, Serpick AA, *et al.* L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *The New England journal of medicine* 1969 Nov 6; **281**(19): 1028-1034.

49. Oettgen HF, Stephenson PA, Schwartz MK, Leeper RD, Tallai L, Tan CC, *et al.* Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. *Cancer* 1970 Feb; **25**(2): 253-278.
50. Parsons SK, Skapek SX, Neufeld EJ, Kuhlman C, Young ML, Donnelly M, *et al.* Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 Mar 15; **89**(6): 1886-1895.
51. Rytting M. Peg-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. *Expert opinion on biological therapy* 2010 May; **10**(5): 833-839.
52. Tanaka R, Osumi T, Miharu M, Ishii T, Hasegawa T, Takahashi T, *et al.* Hypoglycemia associated with L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia treatment: a case report. *Experimental hematology & oncology* 2012; **1**(1): 8.
53. Willems L, Jacque N, Jacquel A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 2013 Nov 14; **122**(20): 3521-3532.
54. McCredie KB, Ho DH, Freireich EJ. L-asparaginase for the treatment of cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 1973 Jul-Aug; **23**(4): 220-227.
55. Lorenzi PL, Llamas J, Gonsior M, Ozbun L, Reinhold WC, Varma S, *et al.* Asparagine synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 2008 Oct; **7**(10): 3123-3128.
56. Lorenzi PL, Reinhold WC, Rudelius M, Gonsior M, Shankavaram U, Bussey KJ, *et al.* Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2006 Nov; **5**(11): 2613-2623.
57. Taylor CW, Dorr RT, Fanta P, Hersh EM, Salmon SE. A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2001; **47**(1): 83-88.
58. Hays JL, Kim G, Walker A, Annunziata CM, Lee JM, Squires J, *et al.* A phase II clinical trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced ovarian cancer: Early closure for safety. *Molecular and clinical oncology* 2013 May; **1**(3): 565-569.
59. Dufour E, Gay F, Aguera K, Scoazec JY, Horand F, Lorenzi PL, *et al.* Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. *Pancreas* 2012 Aug; **41**(6): 940-948.
60. Sircar K, Huang H, Hu L, Cogdell D, Dhillon J, Tzelepi V, *et al.* Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer. *The American journal of pathology* 2012 Mar; **180**(3): 895-903.
61. Tardito S, Chiu M, Uggeri J, Zerbini A, Da Ros F, Dall'Asta V, *et al.* L-Asparaginase and inhibitors of glutamine synthetase disclose glutamine addiction of beta-catenin-

- mutated human hepatocellular carcinoma cells. *Current cancer drug targets* 2011 Oct; **11**(8): 929-943.
62. Zhang B, Dong LW, Tan YX, Zhang J, Pan YF, Yang C, *et al.* Asparagine synthetase is an independent predictor of surgical survival and a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer* 2013 Jul 9; **109**(1): 14-23.
 63. Panosyan EH, Wang Y, Xia P, Lee WN, Pak Y, Laks DR, *et al.* Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Mol Cancer Res* 2014 May; **12**(5): 694-702.
 64. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery* 2012 Oct; **2**(10): 881-898.
 65. Wong KM, Hudson TJ, McPherson JD. Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond. *Annual review of genomics and human genetics* 2011; **12**: 407-430.
 66. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4; **144**(5): 646-674.
 67. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956 Aug 10; **124**(3215): 269-270.
 68. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956 Feb 24; **123**(3191): 309-314.
 69. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal* 2007 Mar; **274**(6): 1393-1418.
 70. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* 2008 Jan; **7**(1): 11-20.
 71. Knox WE, Horowitz ML, Friedell GH. The proportionality of glutaminase content to growth rate and morphology of rat neoplasms. *Cancer research* 1969 Mar; **29**(3): 669-680.
 72. Linder-Horowitz M, Knox WE, Morris HP. Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas. *Cancer research* 1969 Jun; **29**(6): 1195-1199.
 73. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 2009 Apr 9; **458**(7239): 762-765.
 74. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Marquez J, Nunez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *The Biochemical journal* 2000 Jun 1; **348 Pt 2**: 257-261.

75. Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer cell* 2010 Sep 14; **18**(3): 207-219.
76. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010 Jan 21; **29**(3): 313-324.
77. Gaglio D, Soldati C, Vanoni M, Alberghina L, Chiaradonna F. Glutamine deprivation induces abortive s-phase rescued by deoxyribonucleotides in k-ras transformed fibroblasts. *PloS one* 2009; **4**(3): e4715.
78. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV, Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism* 2013 Aug 6; **18**(2): 153-161.
79. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 2013 Apr; **13**(4): 227-232.
80. Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Journal of inherited metabolic disease* 2010 Oct; **33**(5): 469-477.
81. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004 Feb; **271**(3): 462-469.
82. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *The Journal of clinical investigation* 2010 Jan; **120**(1): 142-156.
83. Samudio I, Fiegl M, McQueen T, Clise-Dwyer K, Andreeff M. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer research* 2008 Jul 1; **68**(13): 5198-5205.
84. Skrtic M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, *et al.* Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 2011 Nov 15; **20**(5): 674-688.
85. Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer research* 2009 Mar 15; **69**(6): 2163-2166.
86. Velez J, Hail N, Jr., Konopleva M, Zeng Z, Kojima K, Samudio I, *et al.* Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells. *Frontiers in oncology* 2013; **3**: 67.
87. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009 Dec 10; **462**(7274): 739-744.
88. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic

- enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell* 2010 Mar 16; **17**(3): 225-234.
89. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 2010 Dec 14; **18**(6): 553-567.
 90. McKenney AS, Levine RL. Isocitrate dehydrogenase mutations in leukemia. *The Journal of clinical investigation* 2013 Sep; **123**(9): 3672-3677.
 91. Samuels AL, Heng JY, Beesley AH, Kees UR. Bioenergetic modulation overcomes glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 2014 Apr; **165**(1): 57-66.
 92. Mussai F, Egan S, Higginbotham-Jones J, Perry T, Beggs A, Odintsova E, *et al.* Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood* 2015 Apr 9; **125**(15): 2386-2396.
 93. Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, *et al.* (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 2013 Mar 29; **339**(6127): 1621-1625.
 94. Popovici-Muller J, Saunders JO, Salituro FG, Travins JM, Yan S, Zhao F, *et al.* Discovery of the First Potent Inhibitors of Mutant IDH1 That Lower Tumor 2-HG in Vivo. *ACS medicinal chemistry letters* 2012 Oct 11; **3**(10): 850-855.
 95. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, *et al.* An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 2013 May 3; **340**(6132): 626-630.
 96. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, *et al.* Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013 May 3; **340**(6132): 622-626.
 97. Staubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, Broom OJ, Zhu Y, Islam S, *et al.* Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: a metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. *The Journal of biological chemistry* 2015 Mar 27; **290**(13): 8348-8359.
 98. Ng KP, Manjeri A, Lee KL, Huang W, Tan SY, Chuah CT, *et al.* Physiologic hypoxia promotes maintenance of CML stem cells despite effective BCR-ABL1 inhibition. *Blood* 2014 May 22; **123**(21): 3316-3326.
 99. Fuka G, Kantner HP, Grausenburger R, Inthal A, Bauer E, Krapf G, *et al.* Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. *Leukemia* 2012 May; **26**(5): 927-933.
 100. Silva A, Girio A, Cebola I, Santos CI, Antunes F, Barata JT. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2011 Jun; **25**(6): 960-967.

101. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 2010 Jul 1; **466**(7302): 68-76.
102. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004 Aug 15; **18**(16): 1926-1945.
103. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 2005 Nov 18; **123**(4): 569-580.
104. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* 2008 Aug; **10**(8): 935-945.
105. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2010 Jun 13; **320**(5882): 1496-1501.
106. Robitaille AM, Christen S, Shimobayashi M, Cornu M, Fava LL, Moes S, *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* 2013 Mar 15; **339**(6125): 1320-1323.
107. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 2010 Oct 22; **40**(2): 280-293.
108. Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends in molecular medicine* 2013 Jul; **19**(7): 428-446.
109. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008 Jan 11; **132**(1): 27-42.
110. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, *et al.* The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology* 2007 Feb; **9**(2): 218-224.
111. Marino G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, *et al.* Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Molecular cell* 2014 Mar 6; **53**(5): 710-725.
112. Sakaki K, Wu J, Kaufman RJ. Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 2008 May 30; **283**(22): 15370-15380.
113. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004 Sep 9; **431**(7005): 200-205.

114. Iiboshi Y, Papst PJ, Hunger SP, Terada N. L-Asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Jul 5; **260**(2): 534-539.
115. Yu M, Henning R, Walker A, Kim G, Perroy A, Alessandro R, *et al.* L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012 Oct; **16**(10): 2369-2378.
116. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* 2007 Aug 17; **282**(33): 24131-24145.
117. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, *et al.* The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry* 1977 May; **28**(5): 897-916.
118. Lanza IR, Nair KS. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods in enzymology* 2009; **457**: 349-372.
119. Su N, Pan YX, Zhou M, Harvey RC, Hunger SP, Kilberg MS. Correlation between asparaginase sensitivity and asparagine synthetase protein content, but not mRNA, in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Pediatric blood & cancer* 2008 Feb; **50**(2): 274-279.
120. Muller HJ, Beier R, Loning L, Blutters-Sawatzki R, Dorffel W, Maass E, *et al.* Pharmacokinetics of native Escherichia coli asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *British journal of haematology* 2001 Sep; **114**(4): 794-799.
121. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 1998 Feb; **23**(1): 33-42.
122. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 2012 May 31; **485**(7400): 661-665.
123. Tung S, Shi Y, Wong K, Zhu F, Gorczynski R, Laister RC, *et al.* PPARalpha and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013 Aug 8; **122**(6): 969-980.
124. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006 Sep; **58**(3): 621-681.
125. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994 Sep 22; **371**(6495): 346-347.

126. Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *The Biochemical journal* 2001 Jul 1; **357**(Pt 1): 321-328.
127. Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM, Kilberg MS. Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *The American journal of physiology* 1997 May; **272**(5 Pt 1): C1691-1699.
128. Haskell CM, Canellos GP. l-asparaginase resistance in human leukemia--asparagine synthetase. *Biochemical pharmacology* 1969 Oct; **18**(10): 2578-2580.
129. Drexler HG, Macleod RA. History of leukemia-lymphoma cell lines. *Human cell* 2010 Aug; **23**(3): 75-82.
130. Leupin N, Kuhn A, Hugli B, Grob TJ, Jaggi R, Tobler A, *et al.* Gene expression profiling reveals consistent differences between clinical samples of human leukaemias and their model cell lines. *British journal of haematology* 2006 Nov; **135**(4): 520-523.
131. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, *et al.* Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *The Journal of biological chemistry* 2000 Sep 1; **275**(35): 26976-26985.
132. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 2011 Sep; **10**(9): 671-684.
133. Carracedo A, Weiss D, Lelijaert AK, Bhasin M, de Boer VC, Laurent G, *et al.* A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 2012 Sep 4; **122**(9): 3088-3100.
134. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, *et al.* A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 2012 Sep; **18**(9): 1350-1358.
135. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, *et al.* Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 2009 Sep 3; **461**(7260): 109-113.
136. Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, *et al.* Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell* 2012 Oct 16; **22**(4): 547-560.
137. Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2011 Jun; **1807**(6): 726-734.

138. Tirado-Velez JM, Joumady I, Saez-Benito A, Cozar-Castellano I, Perdomo G. Inhibition of fatty acid metabolism reduces human myeloma cells proliferation. *PLoS one* 2012; **7**(9): e46484.
139. Li J, Zhao S, Zhou X, Zhang T, Zhao L, Miao P, *et al.* Inhibition of lipolysis by mercaptoacetate and etomoxir specifically sensitize drug-resistant lung adenocarcinoma cell to paclitaxel. *PLoS one* 2013; **8**(9): e74623.
140. Barger JF, Gallo CA, Tandon P, Liu H, Sullivan A, Grimes HL, *et al.* S6K1 determines the metabolic requirements for BCR-ABL survival. *Oncogene* 2013 Jan 24; **32**(4): 453-461.
141. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 2009 Dec 1; **19**(22): R1046-1052.
142. Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 2010 Dec 23; **468**(7327): 1100-1104.
143. Cory JG, Cory AH. Critical roles of glutamine as nitrogen donors in purine and pyrimidine nucleotide synthesis: asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *In vivo* 2006 Sep-Oct; **20**(5): 587-589.
144. Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nature reviews Endocrinology* 2014 Jun; **10**(6): 322-337.
145. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell* 2006 Jul; **10**(1): 51-64.
146. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell* 2014 Dec 4; **159**(6): 1263-1276.
147. Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, *et al.* mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell metabolism* 2013 Nov 5; **18**(5): 726-739.
148. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 2010 Apr 1; **48**(7): 905-914.
149. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, *et al.* AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* 2015 Mar 26; **125**(13): 2120-2130.
150. Chan WK, Lorenzi PL, Anishkin A, Purwaha P, Rogers DM, Sukharev S, *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 2014 Jun 5; **123**(23): 3596-3606.

P1. Hermanova I, Zaliova M, Trka J, Starkova J. 2012. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp Hematol.* 40(8):657-65.

(IF=2,475)

Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase

Ivana Hermanova, Marketa Zaliouva, Jan Trka, and Julia Starkova

Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

(Received 10 January 2012; revised 16 March 2012; accepted 18 April 2012)

Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is treated with combined chemotherapy, including L-asparaginase (L-asp). Recent studies question the traditional view that the level of asparagine synthetase (ASNS), an enzyme producing the intracellular asparagine, correlates with the response to L-asp treatment. However, the importance of ASNS in response to L-asp has neither been confirmed nor refuted so far. In this study, we wanted to elucidate the effect of ASNS expression level on the sensitivity of ALL cells to L-asp treatment. We used four ALL cell lines (NALM-6, RS4;11, REH, and UOCB6) and 30 diagnostic bone marrow samples of ALL patients to study the relationship between ASNS expression and sensitivity to L-asp using MTS proliferation assay. RNA interference was used to study the effect of a range of ASNS levels on the response to L-asp treatment. Using a cell line model with a gradually knocked-down ASNS gene, we defined a cutoff level below which ASNS gene expression does not correlate with sensitivity to L-asp. Importantly, ASNS gene expression in patients' ALL blasts is below this level. We confirmed that there was no correlation between ASNS gene expression and sensitivity to L-asp in ALL blasts. In addition, we show that cells with low ASNS expression level do not respond to asparagine deprivation by upregulation of ASNS gene expression. In conclusion, the ASNS expression level does not predict sensitivity to L-asp in leukemic blasts. Moreover, cell lines with high basal expression of ASNS cannot serve as a valid model for studies on the relationship between the ASNS and L-asp cytotoxic effect. © 2012 ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematological malignancy in childhood [1]. Treatment requires a combination of chemotherapeutics with the critical component L-asparaginase (L-asp). L-asp administration significantly improves patient outcomes [2–6]. L-asp depletes asparagine and glutamine in plasma [7,8]. The antileukemic effect is based on the decreased activity of the enzyme asparagine synthetase (ASNS) in leukemic cells compared to their healthy counterparts. Consequently, malignant lymphoblasts cannot face the extracellular depletion of asparagine and undergo apoptosis [9–12]. In vitro resistance to L-asp correlates with an increase in the cellular ASNS activity, messenger RNA (mRNA) and protein level in model systems [13,14]. Based on these findings, ASNS mRNA level seemed to be a promising marker of patients' sensitivity to L-asp. However, recent studies on

patients' samples have questioned the attractive general applicability of this hypothesis. Chronologically, in a gene expression study by Holleman et al. [15], ASNS was not among the 35 most discriminating genes for L-asp sensitivity, even though it was significantly overexpressed in resistant ALL. In addition, we and others have shown that TEL/AML1-positive ALL patients, although significantly more sensitive to L-asp [16], have higher expression of ASNS mRNA than TEL/AML1-negative patients [17–19]. This seeming paradox had led to the search for a specific mechanism of response to L-asp in TEL/AML1-positive ALL. However, further studies on the relationship between ASNS mRNA expression and ALL blasts' sensitivity to L-asp revealed that the problem is more complex, comprising other genetic ALL subtypes. Fine et al. have not seen consistent basal expression patterns of ASNS that would be associated with sensitivity to L-asp in ALL blasts [20]. In particular, the basal expression of ASNS was not predictive of the response to L-asp. In the same line, upregulation of ASNS expression was not linked to the clinical response

Offprint requests to: Jan Trka, M.D., Ph.D., Childhood Leukaemia Investigation Prague, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, V Uvalu 84, Prague 15006, Czech Republic; E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

to L-asp [21]. As these data exclusively reflect the mRNA levels of ASNS, it is of interest that Su et al. have observed a correlation between L-asp sensitivity and ASNS protein content, rather than ASNS mRNA level, in leukemic cell lines [22]. This complicates the situation even further because, generally, ASNS protein levels in patient samples are so low that they cannot be ascertained by Western blot and are therefore linked to the relative sensitivity or resistance to L-asp.

Although the information coming from the studies mentioned does suggest that ASNS does not play a central role in the response of ALL blasts to L-asp, this presumption has so far not been confirmed experimentally, and it is rather the expression of ASNS mRNA that is still referred to as a key factor. Therefore, we concentrated on the functional relationship between ASNS expression and sensitivity to L-asp in ALL cells with the aim to elucidate to what extent ASNS expression is important for sensitivity to L-asp and, more specifically, whether the differences in ASNS mRNA level measured in patient samples have biological and clinical consequences.

Materials and methods

Patient samples

Bone marrow samples from 30 untreated children initially diagnosed with B-cell precursor ALL were collected from the Czech Pediatric Hematology Centers. Within 24 hours after aspiration, mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and then stored at -80°C . All samples were obtained with the informed consent of the children's parents or guardians. Table 1 shows the characteristics of these patients.

Cell culture

REH (human B-cell precursor leukemia, TEL/AML1-positive), RS4;11 (human B-cell precursor leukemia, MLL/AF4-positive), and NALM-6 (human B-cell precursor leukemia TEL/PDGFRB1-positive) cell lines were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and cultivated according to producer's instructions. UOCB6 (human B-cell precursor leukemia, TEL/AML1-positive) [23] was cultivated under the same conditions as other studied cell lines.

RNA extraction, complementary DNA synthesis, and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Total cellular RNA was extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions and converted to complementary DNA using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The ASNS transcript was detected using the Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, Foster City, CA, USA). The primer sequences of ASNS (5'-3') were as follows: forward primer AAAGTGGAGCCTTTCTTCCTG, reverse primer AGCCAATCCTTCTGTCTGTCATC. The polymerase chain reaction (PCR) reaction was performed in the Light-Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostic GmbH,

Manheim, Germany) according to manufacturer's instructions. Oligonucleotide hybridization probes were used in the system for quantification of $\beta 2$ microglobulin, which served as a housekeeping gene. The PCR reaction was performed in LightCycler Rapid Thermal Cycler System (Roche Diagnostic GmbH, Manheim, Germany). Raw data were normalized against $\beta 2$ microglobulin, that is, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct-specific gene} - \text{Ct } \beta 2 \text{ microglobulin}$.

Protein detection

Cells were washed twice by centrifugation in phosphate-buffered saline and lysed in RIPA buffer. The lysate was sonicated and then centrifuged at 7500 rpm for 3 minutes at 4°C . Protein concentration was determined spectrophotometrically on each sample of supernatant using Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad). Proteins were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Nonspecific binding on the membrane was blocked with TBS containing 5% dry milk. The membrane was probed overnight with ASNS (kindly provided by Dr. Kilberg, University of Florida College of Medicine, Gainesville, FL, USA) or β -actin (Sigma, St Louis, MO, USA) antibodies in phosphate-buffered saline containing 5% and 1% dry milk, respectively. The bound antibody was detected with the appropriate secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase and visualized using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate or SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific, Logan, UT, USA), followed by exposition to x-ray film.

Short interfering RNA transfection

REH, UOCB6, and RS4;11 cells were transfected via electroporation performed on EPI2500 electroporator (Dr. L. Fischer, Heidelberg, Germany) using 0.4-cm gap Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes (Bio-Rad) under the following conditions: 1,000,000 cells/100 μL culture medium, one pulse of 10 ms, 350 V, and 1200 μF . Cells that were transfected by the ON-TARGETplus Non-Targeting Pool siRNAs (siNon-T; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) served as a negative control. The negative control is designed by producers to have the minimal sequence homology to any known human transcript and have the same chemical structure as the corresponding targeting short interfering RNAs (siRNAs). ASNS-targeting ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs (siASNS; Dharmacon) at concentrations 0.78 μmol , 1.56 μmol , 3.13 μmol , 6.25 μmol , and 9.38 μmol were used for ASNS knockdown. The volume of siASNS was kept the same by the addition of siNon-T. ASNS mRNA expression was measured 24 and 48 hours after the knockdown.

In vitro L-asp cytotoxicity assay

In vitro L-asp (Medac, Wedel, Germany) cytotoxicity was determined using AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI, USA). Cells were cultured in 96-well microtiter plates in the presence of eight different concentrations of L-asp (4 to $4^{\text{E-07}}$ IU/mL in decimal dilution) in triplicate. Control cells were cultured without L-asp. Cell lines were incubated for 72 hours. ALL primary cells show a low control cell viability [24,25]. Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) [26] was therefore used during a 96-hour long incubation with L-asp. Afterward, MTS reagent was added for 3 hours. The amount of rising formazan was spectrophotometrically measured and thereby cell viability was determined.

Table 1. Characteristics of acute lymphoblastic leukemia patients

Patient no.	Age (month)	Sex	Diagnosis	Fused gene	Karyotype	Treatment protocol	Outcomes
1	4	M	cALL		56,XY,+X,+Y,+4,+6,+8,+14,+14,+18,+21,+21[5]/4 6,XY[4]	ALL BFM 2009	CR1
2	2	F	cALL		53~54,XY,+X,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[cp20]/46,XY[2]	ALL BFM 2009	CR1
3	13	M	praeb ALL		46,XY,?der(7),?der(11) [4]/46,XY[14]	ALL BFM 2009	CR1
4	3	M	cALL	TEL/AML1	46,XY[13]	ALL BFM 2009	CR1
5	5	M	cALL		46,XY[17]	ALL BFM 2009	CR1
6	3	M	cALL		55,XX,+4,+5,+6,+8,+10,+12,+14,+17,+18,+21[cp12]/46,XX[1]	ALL BFM 2009	CR1
7	6	M	cALL		47,XY,?der(5),t(8,12,21),+mar[5]/46,XY,?der(5), t(8,12,21)[7]/46, XY,t(8,12,21) [5]	ALL BFM 2009	CR1
8	3	M	cALL		84-88, XX [9]	ALL-IC BFM 2002	CR1
9	4	F	cALL	TEL/AML1	No data	ALL-IC BFM 2002	Relapse CR2
10	3	F	cALL	TEL/AML1	46, XX [6]	ALL-IC BFM 2002	CR1
11	8	M	cALL	TEL/AML1	No data	ALL-IC BFM 2002	CR1
12	5	M	cALL	TEL/AML1	46,XY,t(12;21)(p13;q22),del(12)(p13),der(21)t(21;?) [?]	ALL-IC BFM 2002	CR1
13	14	M	cALL		No data	Interim	CR1
14	17	F	cALL		46, XX [6]	ALL-IC BFM 2002	CR2
15	10	M	cALL		47, XY,+8,del(9)(p11)[12]	Interim	CR1
16	5	M	cALL		58~62,XY,+X,der(1),+4,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+14,i(17q),+18,+21,+21,+21,+2mar[cp9]/59,XY,+X+der(2),+4,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+14,i(17q),+18,+21,+21,+21[2]	Interim	CR1
17	8	F	praeb ALL	TEL/AML1	No data	Interim	CR1
18	16	F	cALL		46,XX	Interim	death
19	18	M	cALL		45,XY,del(9p), -20	Interim	CR1
20	3	M	cALL		58,XXYY,+3,+6,+8,+10,+10,+14,+14,+18,+21,+21[19]46,XY [6]	Interim	CR1
21	6	F	cALL		46,XX[12], 47XX,+21[2]	Interim	CR1
22	7	M	cALL		59~63,CY,+X,dup(1)(q21.1q32.2),+4,+5,+der(6)t (X;6)(?:q11), +8,+8,+10,+11,+12,+14,+15,+17,+18,+21,+21,22[12]	Interim	CR1
23	4	F	praeb ALL		59<2n>,XX,+X,+4,+5,+6,+7,+9,+10,+14,+16,+17, +18,+21,+21[13], 46,XX[7]	Interim	CR1
24	2	M	praeb ALL		46,XY[20]	Interim	CR1
25	6	F	cALL		63~65,XX,?der(2),+3,+5,+6,+7,?der(9),+10,+11,+12,+14,+15,+18,+21,+21,+5,-7mar [cp9]	Interim	CR1
26	1	M	proB ALL		No data	Interfant	CR1
27	4	M	cALL		No data	Interim	CR1
28	7	M	cALL		56,XY,+X,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21,+22[4]/46,XY[4]	ALL BFM 2009	CR1
29	3	F	cALL	TEL/AML1	No data	ALL BFM 2009	CR1
30	3	M	cALL		50~54,XY,+X,+18,+21,+21[cp6]/46,XY[3]	ALL BFM 2009	CR1

ALL = acute lymphoblastic leukemia; ALL BFM 2009 = International MRD-based BFM protocol; ALL-IC BFM 2002 = International non-MRD-based BFM protocol; cALL = intra-IgM+; CR = complete remission; F = Female; Interfant = International protocol for infant leukemia; Interim = Czech version of MRD-based BFM 2000 protocol; M = Male; praeb ALL = intra-IgM+; proB = CD10– Intra-IgM– CD20–.

Statistical analysis

Student *t* test and Spearman nonparametric test using GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA) were performed for statistical analyses.

Results

ASNS knockdown in ALL cells with low basal ASNS expression does not increase sensitivity to L-asp

Baseline ASNS mRNA expression was measured by real-time quantitative PCR in four human B-precursor leukemic cell lines (i.e., REH, UOCB6, RS4;11, and NALM-6). UOCB6, with the highest expression of ASNS (normalized ASNS [nASNS] = 4.225), was followed by NALM-6 (nASNS = 3.640), REH (nASNS = 2.336), and RS4;11 (nASNS = 0.058). We chose UOCB6, REH, and RS4;11

to perform silencing of ASNS gene. Using increasing concentrations of siRNA specific for ASNS, we achieved a spectrum of ASNS mRNA expression levels in these cell lines starting at 4.40 to 0.008 nASNS expression (Fig. 1A). We subsequently tested sensitivity of the cells to the L-asp using MTS Cell Proliferation Assay (Fig. 1B). Gradual ASNS gene silencing in UOCB6 led to an increase of sensitivity to L-asp. REH cell line with decreased ASNS mRNA expression from nASNS = 1.010 to nASNS = 0.749 increased sensitivity to L-asp. Further knockdown did not cause another change in the sensitivity. Importantly, decreased ASNS mRNA expression in RS4;11 cell line did not increase the sensitivity to L-asp. We concluded that what we found was a clear cutoff of ASNS gene expression level that discriminated among the samples' high and low ASNS mRNA expression. These two groups differed in

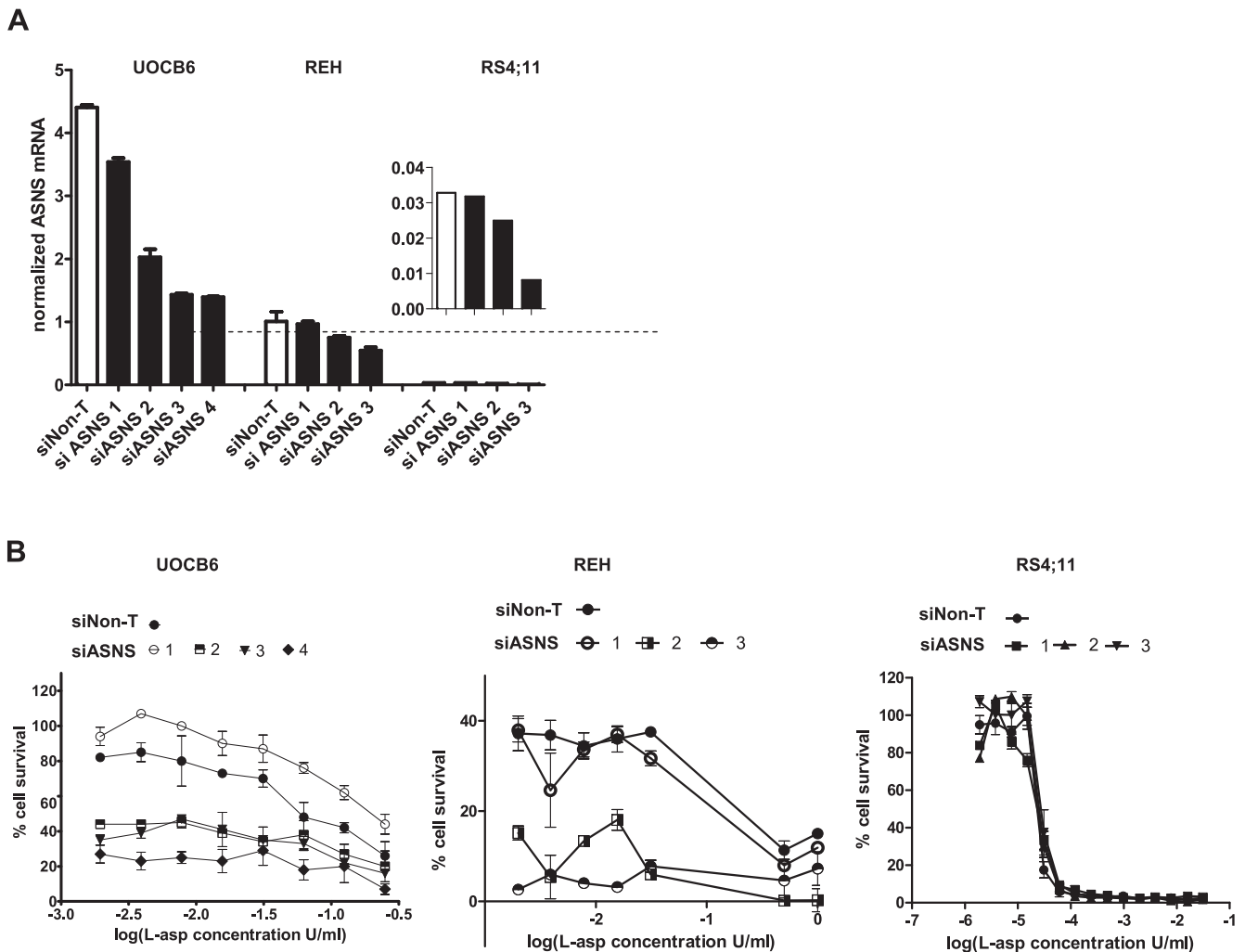


Figure 1. Response of UOCB6, REH, and RS4;11 cells with downregulated ASNS to L-asp treatment. **(A)** ASNS in UOCB6, REH, and RS4;11 was down-regulated using increasing concentration of siRNA specific for ASNS (siASNS 1 = 0.78 μmol , siASNS 2 = 3.13 μmol l, siASNS3 = 6.25 μmol , siASNS 4 = 9.38 μmol in UOCB6; siASNS 1 = 0.78 μmol , siASNS 2 = 1.56 μmol l, siASNS 3 = 6.25 μmol in REH and RS4;11). siNon-T served as a control. Normalized levels of ASNS mRNA measured 24 hours after electroporation are shown. The discontinuous line shows ASNS cutoff level. **(B)** Sensitivity of cells (MTS assay) with gradual knockdown of ASNS expression, using siRNA, was monitored 72 hours after L-asp treatment. Experiments were performed in triplicate, and the standard deviation was calculated. UOCB6 cells with gradually decreased ASNS expression displayed a gradual increase in sensitivity to L-asp. REH cells exhibited an increased sensitivity to L-asp after siASNS treatment. RS4;11 cells with ASNS knockdown did not display an increase in sensitivity to L-asp.

their response to L-asp treatment. While ASNS mRNA expression above this level negatively correlated with sensitivity to L-asp, below this cutoff there was no correlation between ASNS mRNA level and sensitivity to L-asp.

ASNS mRNA and protein level is substantially lower in patient samples compared to cell lines

ASNS mRNA levels were measured in 30 B-precursor ALL diagnostic specimens. Twenty-nine of 30 patients had a very low level of ASNS mRNA, which is in concordance with data reported previously by Su et al. [22]. A median of 0.18 was well below the cutoff determined in the previous experiment. The median ASNS mRNA expression of REH, UOCB6, NALM-6, and RS4;11 (2.99) was significantly

higher compared to ALL primary blasts ($p < 0.0001$) (Fig. 2). ASNS protein content, analyzed by Western blot, correlated with mRNA levels in all four cell lines. ASNS protein level in patient samples remained undetectable, despite the use of three different antibodies specific for ASNS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; Abcam, Cambridge, MA, USA; and the in-house antibody kindly provided by Dr. Kilberg, University of Florida College of Medicine) and precise optimization.

ALL primary blasts do not show a correlation between sensitivity to L-asp and ASNS expression

In vitro resistance to L-asp of children with newly diagnosed ALL is associated with worse clinical outcomes after

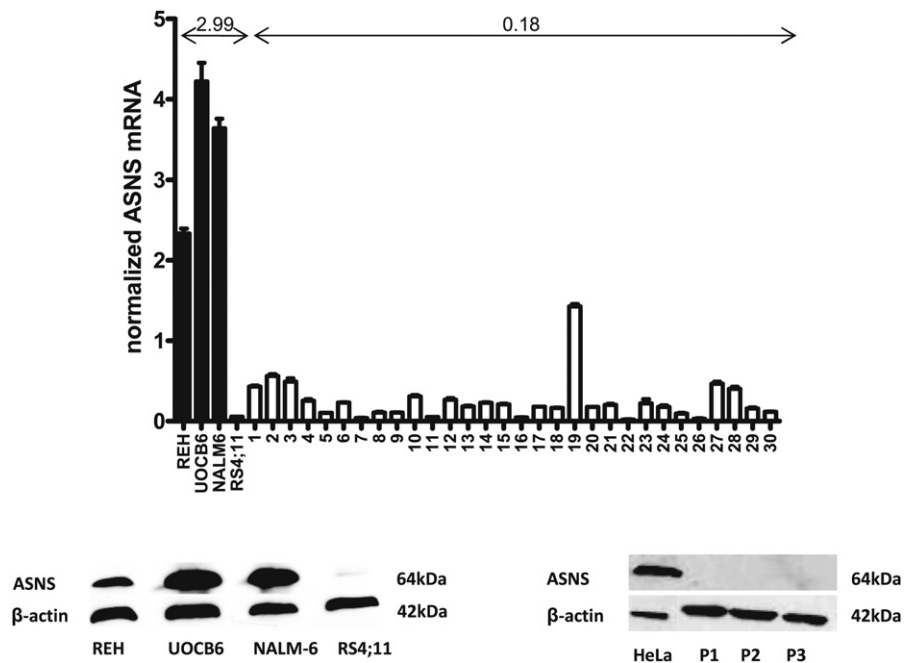


Figure 2. The basal ASNS expression of ALL cells. ASNS mRNA expression was measured in REH, UOCB6, NALM-6, and RS4;11 cell lines and leukemic blasts isolated from the bone marrow cells of ALL patients. Data were normalized to the $\beta 2$ microglobulin level. Medians calculated from group of cell lines and group of patient samples are shown. Whole cell extracts were collected, subjected to Western blot analysis, and probed for ASNS or β -actin, which served as a loading control. As a reference for relative abundance in Western blot of patient samples, a HeLa cell extract was included.

combination chemotherapy [27]. The sensitivity of leukemic cells to L-asparaginase was measured by MTS Cell Proliferation Assay (Fig. 3). Cells were cultured in the presence of eight different concentrations of L-asparaginase (4 to 4^{E-07} IU/mL in decimal dilution). Control cells were cultured without L-asparaginase. RS4;11 cells were the most sensitive, with IC_{50} of 2.5×10^{-3} U/mL. REH, NALM-6, and UOCB6 cells had an IC_{50} of 0.15 U/mL, 0.3 U/mL, and 0.9 U/mL, respectively. There was a correlation between ASNS mRNA expression and IC_{50} with Spearman correlation coefficient of 1.00 ($p = 0.0833$). Next, we studied the sensitivity of 7 (1–7) ALL diagnostic samples with ASNS mRNA expression 0.4319, 0.5621, 0.4944, 0.2559, 0.2315, 0.1029, and 0.0421, respectively. The response of ALL blasts to L-asparaginase treatment was independent of the ASNS basal level. The Spearman correlation test showed no correlation between ASNS basal level and sensitivity to L-asparaginase in ALL patient samples with Spearman correlation coefficient of 0.2242 ($p = 0.5367$). The calculation was based on absolute IC_{50} and normalized ASNS mRNA expression.

Low-expressing RS4;11 cell line does not upregulate ASNS mRNA expression after L-asparaginase treatment

REH, UOCB6, NALM-6, and RS4;11 cells were incubated with L-asparaginase (concentration at 4 U/mL) for 6, 24, and 48 hours (Fig. 4). The induced relative expression of ASNS mRNA reached statistical significance at all three time points in REH, NALM-6, and UOCB6 cells, with a peak at 6 hours after the addition of L-asparaginase. In rapid response cor-

responding to 6 hours, REH achieved a 7.6-fold increase ($p = 2.34 \times 10^{-4}$) of ASNS mRNA, NALM-6 displayed a 6.8-fold increase ($p = 7.4 \times 10^{-6}$), and UOCB6 showed a 4.3-fold increase ($p = 7.1 \times 10^{-7}$). RS4;11 did not respond in the acute phase of treatment by the elevation of ASNS mRNA. In addition, at none of the time points did the induced expression of ASNS in this cell line reach levels comparable with basal levels in all other cell lines. Changes in the ASNS protein amount varied greatly among the cell lines. REH and UOCB6 cells exhibited a significant increase of ASNS protein, whereas NALM-6 cells did not show any changes in protein expression. ASNS protein in RS4;11 cells remained undetectable.

Discussion

Low ASNS mRNA expression was traditionally linked to the sensitivity of ALL cells to L-asparaginase. Recent studies indicated that the straightforward correlation between L-asparaginase sensitivity and ASNS mRNA expression was not sufficient to explain the differences in patient response to the treatment with L-asparaginase. Nevertheless, as the relationship has not been clearly explained, the ASNS mRNA expression level was still referred to as an important factor influencing the response to L-asparaginase treatment. Based on these findings, we decided to elucidate whether the differences in ASNS mRNA expression levels can cause inter-individual variations in sensitivity to L-asparaginase.

Using RNA interference, ASNS mRNA expression was gradually decreased in three ALL cell lines. We found the

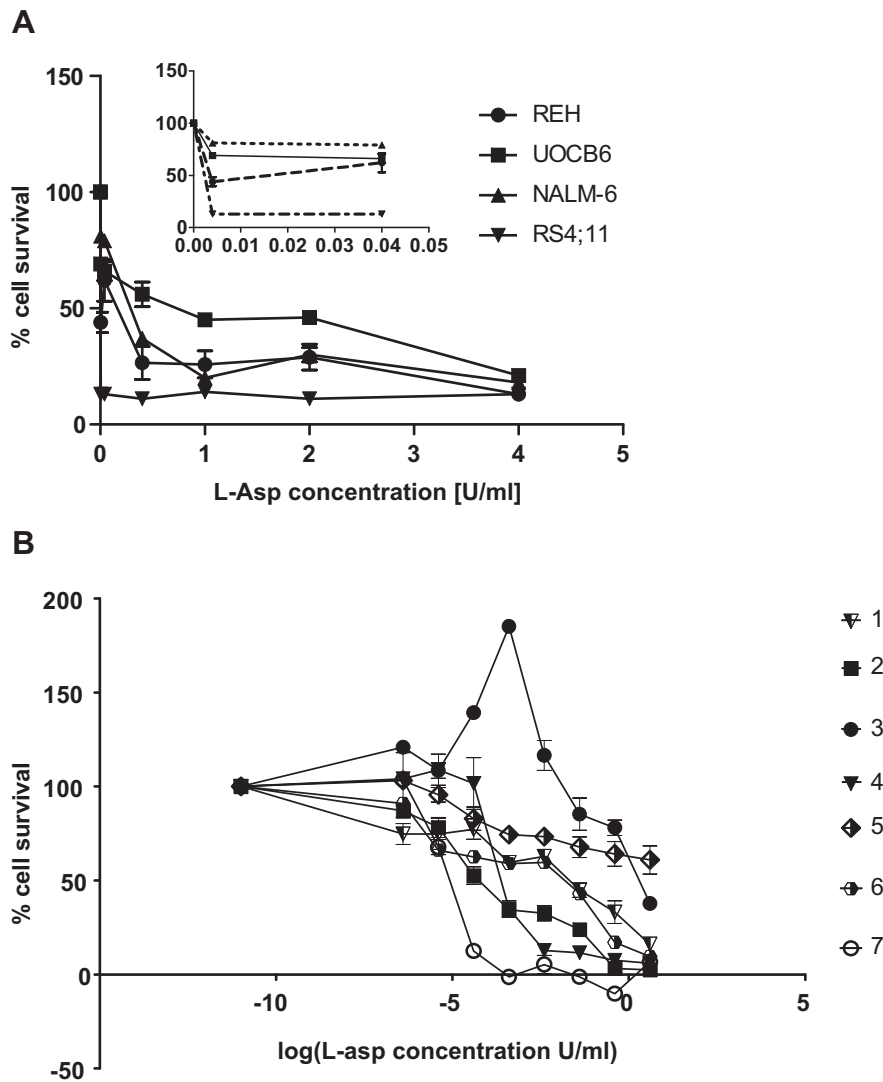


Figure 3. Sensitivity of ALL cells to L-asp. (A) Sensitivity of four leukemic cell lines to L-asp was determined by MTS assay. Cell lines were treated with a range of L-asp concentrations for 72 hours. Experiments were done in triplicate and the standard deviation was calculated. The magnified portion of the graph shows data from treatments with 0 to 0.04 U/mL L-asp. (B) Sensitivity of seven primary ALL samples determined by MTS assay. Cells were treated with a range of L-asp concentrations for 96 hours. Experiments were done in triplicate and the standard deviation was calculated.

cutoff in ASNS mRNA expression level that discriminated among our samples. Suppression of ASNS above this cutoff increased sensitivity to L-asp. ASNS gene knockdown that was under the cutoff did not cause increase sensitivity to L-asp. Importantly, 29 of 30 ALL patients studied had very low ASNS mRNA expression, below the cutoff. These results show that ALL patients cannot be characterized as resistant or sensitive to L-asp treatment on the basis of ASNS mRNA expression. We confirmed these findings by MTS cytotoxic assay. There was no significant correlation found between ASNS gene expression and IC_{50} in patient samples.

The original hypothesis on the relationship between the sensitivity to L-asp and ASNS expression was confirmed in cell line models. Indeed, in the selected cell lines, the high

ASNS expression was linked to the resistant phenotype. However, studies trying to apply this theory to patients' samples had led to controversial or paradoxical results, including Stam et al.'s reports and our own on TEL/AML1-positive patients [17–19]. Our data clearly indicate that this model did not take into account the simple fact that patients' ALL blasts have generally much lower (up to 20 times) basal expression of ASNS. In the patients' blasts expression range of the ASNS expression differences are not linked to the distinct sensitivity to L-asp. Comparison of primary samples with cell lines is always debatable. The possible mechanism that could explain the high ASNS expression in ALL cell lines compared to patients' ALL cells might consist of faster metabolic and proliferative rates in *in vitro* conditions. Under optimal cell culture

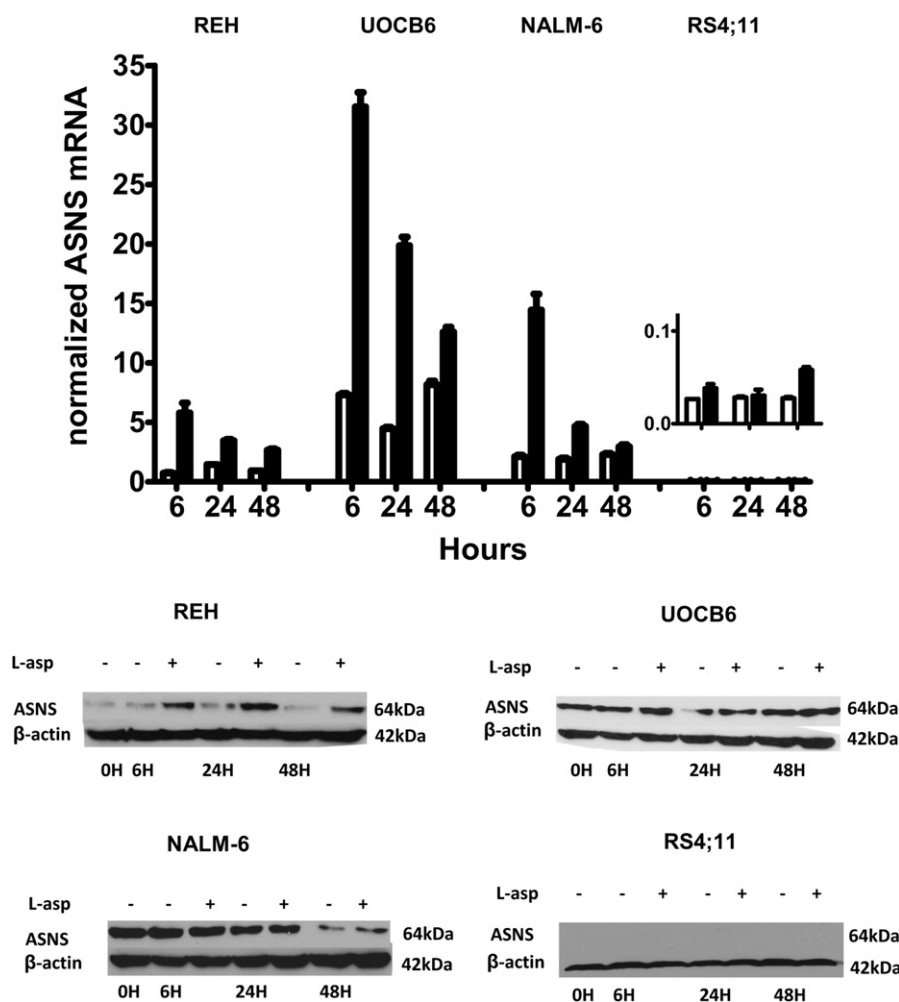


Figure 4. Expression of ASNS in leukemic cells treated with L-asparaginase. Graphs describe normalized expression of ASNS mRNA in REH, UOCB6, NALM-6, and RS4;11 cells after L-asparaginase (4 U/mL) treatment and untreated control cells. All measurements were done in triplicate at 6, 24, and 48 hours after treatment. ASNS protein content was measured by Western blot analysis. REH cells displayed an increase in ASNS protein at all three time points. UOCB6 cells exhibited an increase in ASNS protein at 24 hours after L-asparaginase addition. NALM-6 cells did not increase ASNS protein at any time point. The ASNS protein levels in RS4;11 cells were not detectable.

conditions, leukemic cell lines very stably retain the major features of their original cells as major oncogenic features [28]. Nevertheless, because the cells need the whole spectrum of supplements, they might respond by over-regulation of enzymes involved in amino acid metabolism. In addition, it has been shown that gene expression profiling reveals consistent differences between clinical samples of human leukemias and their model cell lines. In detail, chronic myeloid leukemia in chronic phase, acute promyelocytic leukemia, and acute monocytic leukemia cell lines chiefly overexpressed genes related to macromolecular metabolism, whereas in clinical samples, genes related to the immune response were abundantly expressed [29].

Su et al. reported that it is not the mRNA expression but rather the ASNS protein level that correlates with sensitivity to L-asparaginase in ALL cell lines. We tested four ALL cell lines and the ASNS mRNA expression correlated with protein level.

Next, we analyzed ASNS protein amounts in patient samples. ASNS protein remained undetectable in the tested samples of the ALL patients and were not reproducibly detectable in the low-expressing cell line, RS4;11. Induction of ASNS mRNA level is among the first steps of amino acid stress response [14,30]. Moreover, short-term treatment of cells with L-asparaginase caused induction of ASNS expression [13,14,17]. As we have shown before, the absolute level of induced ASNS depended on the initial level [17]. Our recent data show a discrepancy in response to L-asparaginase between cells with ASNS level above and below the certain cutoff. L-asparaginase significantly induced ASNS mRNA level in three cell lines-REH, NALM-6, and UOCB6. Baseline ASNS mRNA expression of all the three cell lines was above this cutoff. RS4;11 cells with low ASNS levels did not respond in the acute phase of treatment by an elevation of ASNS. At none of the time points did the induced expression of

ASNS reach levels above the cutoff, where ASNS expression correlates with sensitivity to L-asp. We assume that cells with the ASNS expression level below the defined cutoff use an alternative mechanism of response to amino acid deprivation stress. One of the possible scenarios is the loss of GCN2, eIF2 kinase essential for adaptation to amino acid deprivation studied in mice treated with L-asp [31,32]. Other explanation of various responses to L-asp treatment can consist of degradation of L-asp by lysosomal cysteine proteases [33] or ATF5 polymorphism [34]. As shown by Iwamoto et al., microenvironment could also be involved in response to L-asp by secretion of asparagine by bone marrow mesenchymal cells [35].

Conclusions

Although ASNS enzyme may be involved in the mechanisms by which the primary leukemic cells respond to L-asp, it is not possible to use the basal ASNS mRNA expression as a marker of sensitivity to L-asp. In addition, cell lines with high basal expressions of ASNS cannot serve as a valid model for studies on the relationship between ASNS and L-asp cytotoxic effect.

Acknowledgments

I.H., J.T., and J.S. were supported by MSM002162081, GAUK 92710, and IGA NT12429. We thank professor Michael S. Kilberg for providing us with asparagine synthetase antibody. The collaboration of all Czech Pediatric Hematology Centers is greatly appreciated.

Conflict of interest disclosure

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

References

- Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339:605–615.
- Amylon MD, Shuster J, Pullen J, et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 1999;13:335–342.
- Sallan SE, Hitchcock-Bryan S, Gelber R, Cassady JR, Frei E 3rd, Nathan DG. Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1983;43:5601–5607.
- Tallal L, Tan C, Oettgen H, et al. E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer*. 1970;25:306–320.
- Jaffe N, Traggis D, Das L, et al. L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res*. 1971;31:942–949.
- Sutow WW, Garcia F, Starling KA, Williams TE, Lane DM, Gehan EA. L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia. The Southwest Cancer Chemotherapy Study Group. *Cancer*. 1971;28:819–824.
- Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, et al. L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med*. 1971;74:893–901.
- Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE. Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. *Cancer Res*. 1970;30:929–935.
- Asselin BL, Ryan D, Frantz CN, et al. In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. *Cancer Res*. 1989;49:4363–4368.
- Holleman A, den Boer ML, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Pieters R. Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003;102:4541–4546.
- Haskell CM, Canellos GP. L-asparaginase resistance in human leukemia—asparagine synthetase. *Biochem Pharmacol*. 1969;18:2578–2580.
- Leslie M, Case MC, Hall AG, Coulthard SA. Expression levels of asparagine synthetase in blasts from children and adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;132:740–742.
- Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J*. 2001;357:321–328.
- Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM, Kilberg MS. Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am J Physiol*. 1997;272:C1691–C1699.
- Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*. 2004;351:533–542.
- Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:1094–1099.
- Krejci O, Starkova J, Otova B, et al. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia*. 2004;18:434–441.
- Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood*. 2003;101:2743–2747.
- Stams WA, den Boer ML, Holleman A, et al. Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005;105:4223–4225.
- Fine BM, Kaspers GJ, Ho M, Loonen AH, Boxer LM. A genome-wide view of the in vitro response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005;65:291–299.
- Appel IM, den Boer ML, Meijerink JP, Veerman AJ, Reniers NC, Pieters R. Up-regulation of asparagine synthetase expression is not linked to the clinical response L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107:4244–4249.
- Su N, Pan YX, Zhou M, Harvey RC, Hunger SP, Kilberg MS. Correlation between asparaginase sensitivity and asparagine synthetase protein content, but not mRNA, in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:274–279.
- Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, et al. TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood*. 1996;88:785–794.
- Bird MC, Bosanquet AG, Forskitt S, Gilby ED. Semi-micro adaptation of a 4-day differential staining cytotoxicity (DiSC) assay for determining the in-vitro chemosensitivity of haematological malignancies. *Leuk Res*. 1986;10:445–449.
- Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 1989;59:217–220.

26. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*. 1990;76:2327–2336.
27. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, et al. In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997;90:2723–2729.
28. Drexler HG, Macleod RA. History of leukemia-lymphoma cell lines. *Hum Cell*. 2010;23:75–82.
29. Leupin N, Kuhn A, Hugli B, et al. Gene expression profiling reveals consistent differences between clinical samples of human leukaemias and their model cell lines. *Br J Haematol*. 2006;135:520–523.
30. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, et al. Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem*. 2000;275:26976–26985.
31. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 kinase GCN2 is essential for the murine immune system to adapt to amino acid deprivation by asparaginase. *J Nutr*. 2010;140:2020–2027.
32. Bunpo P, Dudley A, Cundiff JK, et al. GCN2 protein kinase is required to activate amino acid deprivation responses in mice treated with the anti-cancer agent L-asparaginase. *J Biol Chem*. 2009;284:32742–32749.
33. Patel N, Krishnan S, Offman MN, et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J Clin Invest*. 2009;119:1964–1973.
34. Rousseau J, Gagne V, Labuda M, et al. ATF5 polymorphisms influence ATF function and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118:5883–5890.
35. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007;117:1049–1057.

P2. Heřmanová I, Arruabarrena-Aristorena A, Vališ K, Nůsková H, Alberich Jorda M, Fišer K, Fernández-Ruiz S, Kavan D, Pecinová A, Niso-Santano M, Žaliová M, Novák P, Houšťek J, Mráček T, Kroemer G, Carracedo A, Trka J, Starková J. 2015. Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia*; (IF=10,431)

Dear Dr. Hermanova:

Here is a copy of the decision letter for manuscript "Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells" by Ivana Hermanova, Amaia Arruabarrena-Aristorena, Karel Valis, Hana Nuskova, Meritxell Alberich-Jorda, Karel Fiser, Sonia Fernández-Ruiz, Daniel Kavan, Alena Pecinova, Mireia Niso-Santano, Marketa Zaliova, Petr Novak, Josef Houstek, Tomas Mracek, Guido Kroemer, Arkaitz Carracedo, Jan Trka, and Julia Starkova [Paper #15-LEU-0275RR], for which you were a Contributing Author.

Sincerely,

The Leukemia Editorial Office
The Macmillan Building
4 Crinan Street
London
N1 9XW
leukemia@nature.com

Subject: 15-LEU-0275RR - Editorial Decision

Manuscript Number: 15-LEU-0275RR
Title: Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells
Corresponding Author: Prof Trka

Dear Prof Trka,

We are pleased to advise you your manuscript (15-LEU-0275RR) is accepted for publication in *Leukemia*.

Sincerely,

Andreas Hochhaus
Editor, *Leukemia*

Leukemia Editorial Office
The Macmillan Building
4 Crinan Street
London
N1 9XW
Tel: +44 (0)20 7843 4870
Fax: +44 (0)1256 321531
Email: leukemia@nature.com

1 **Title:**

2 Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-
3 asparaginase in childhood ALL cells

4

5 **Authors:**

6 Ivana Heřmanová¹, Amaia Arruabarrena-Aristorena², Karel Vališ^{3,4}, Hana Nůsková⁵, Meritxell
7 Alberich Jorda⁶, Karel Fišer¹, Sonia Fernández-Ruiz², Daniel Kavan^{3,4}, Alena Pecinová⁵, Mireia
8 Niso-Santano^{7,8}, Markéta Žaliová¹, Petr Novák^{3,4}, Josef Houštěk⁵, Tomáš Mráček⁵, Guido
9 Kroemer^{7,8,9,10}, Arkaitz Carracedo^{2,11,12}, Jan Trka^{1, 13} and Júlia Starková¹

10

11 **Affiliations:**

12 ¹CLIP-Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric
13 Hematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

14 ²CIC bioGUNE Technology Park of Bizkaia, Derio, Bizkaia, Spain

15 ³Laboratory of Structural Biology and Cell Signaling, Institute of
16 Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech
17 Republic

18 ⁴Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University,
19 Prague, Czech Republic

20 ⁵Department of Bioenergetics, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences,
21 Prague, Czech Republic

22 ⁶Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy
23 of Sciences, Prague, Czech Republic

24 ⁷Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer; INSERM U1138; Centre de
25 Recherche des Cordeliers; Paris, France

26 ⁸Metabolomics and Molecular Cell Biology Platforms; Gustave Roussy; Villejuif, France

27 ⁹Pôle de Biologie; Hôpital Européen Georges Pompidou; AP-HP; Paris, France

28 ¹⁰Université Paris Descartes; Sorbonne Paris Cité; Paris, France

29 ¹¹Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

30 ¹²Department of Biochemistry and Molecular biology, University of the Basque Country,
31 Leioa, Spain

32 ¹³University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

33

34 **Corresponding author:**

35 Jan Trka, Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric
36 Hematology/Oncology, V Úvalu 84, 15006, Prague, Czech Republic, Tel: +420224436580,
37 Fax: +42022443-6417, E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

38 **Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

39 **Running title:** L-asparaginase alters metabolism of leukemic cells

40

41 **Abstract**

42 L-asparaginase (ASNase), a key component in the treatment of childhood acute lymphoblastic
43 leukemia (ALL), hydrolyzes plasma asparagine and glutamine and thereby disturbs metabolic
44 homeostasis of leukemic cells. The efficacy of such therapeutic strategy will depend on the
45 capacity of cancer cells to adapt to the metabolic challenge, which could relate to the activation
46 of compensatory metabolic routes. Therefore, we studied the impact of ASNase on the main
47 metabolic pathways in leukemic cells. Treating leukemic cells with ASNase increased fatty acid
48 oxidation (FAO) and cell respiration and inhibited glycolysis. FAO, together with the decrease
49 in protein translation and pyrimidine synthesis, was positively regulated through inhibition of
50 the RagB-mTORC1 pathway, whereas the effect on glycolysis was RagB-mTORC1
51 independent. Since FAO has been suggested to have a pro-survival function in leukemic cells,
52 we tested its contribution to cell survival following ASNase treatment. Pharmacological
53 inhibition of FAO significantly increased the sensitivity of ALL cells to ASNase. Moreover,
54 constitutive activation of the mTOR pathway increased apoptosis in leukemic cells treated with
55 ASNase, but did not increase FAO. Our study uncovers a novel therapeutic option based on the
56 combination of ASNase and FAO inhibitors.

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70 **Introduction**

71 L-asparaginase (ASNase) is an essential component in the treatment of childhood acute
72 lymphoblastic leukemia (ALL).¹ Intensified use of ASNase increases event-free survival in
73 children with ALL by 10 % to 15 %.^{2, 3} ASNase has the potential to be used in other types of
74 cancers besides childhood ALL - currently, it is already used in the treatment protocol of adult
75 T-ALL and lymphomas.^{4, 5} There are also ongoing in vitro studies on its use in solid tumors
76 (brain, prostate, and ovarian cancers).⁶⁻¹⁰ Although ASNase has been in clinical use for the
77 treatment of childhood ALL for several decades, our knowledge of mechanisms behind its
78 therapeutic effect is still incomplete. ASNase catalyzes deamination of asparagine (Asn) and
79 glutamine (Gln).^{11, 12} Intracellular Asn is typically produced by asparagine synthetase (ASNS).
80 The cytotoxic effect of ASNase on leukemic cells was traditionally explained by the lower
81 activity of ASNS in leukemic cells compared with healthy cells.^{13, 14} However, recent studies
82 reported that basal ASNS expression does not predict resistance to ASNase among ALL
83 patients¹⁵⁻¹⁸ and has no biological or clinical consequences in ALL patients.¹⁹ These findings
84 indicate that the mechanism of action of ASNase is more complex and cannot be explained by
85 the expression of a single gene.

86 Proliferating cancer cells are characterized by considerably different metabolic requirements
87 compared with normal differentiated cells.^{20, 21} Cancer cell metabolism is therefore studied with
88 a focus on potential therapeutic targets. Since metabolic modulators are widely used for
89 pathologies beyond cancer, drug repurposing has become a very appealing concept in the field,
90 as exemplified by metformin, an antidiabetic that has been newly investigated for its inhibitory
91 effect on cancer progression.²²⁻²⁴ By deaminating Asn and Gln, ASNase obviously also perturbs
92 metabolism, but these metabolic consequences have not yet been described. The main sensor of
93 amino acid deprivation is mammalian target of rapamycin (mTOR), which has been associated
94 with the activity of ASNase.²⁵ Moreover, it has been shown that Gln depletion can efficiently
95 inhibit downstream mTOR signaling in acute myeloid leukemia (AML) and ovarian cancer
96 cells.^{26, 27} Under nutrient-rich conditions, mTORC1 promotes cell growth by stimulating
97 biosynthetic pathways. Meanwhile, cellular catabolism, such as autophagy, is inhibited.
98 Signaling via mTOR also influences a wide range of metabolic mechanisms²⁸⁻³¹ and the impact
99 of ASNase on the downstream mTOR targets that are involved in metabolic processes has not
100 yet been studied thoroughly. This study for the first time describes the profound effect of
101 ASNase on the metabolism of lymphoid leukemic cells that is driven by mTOR. The
102 characterization of these cellular processes reveals novel potential targets for the treatment of
103 ALL to enhance the effects of chemotherapy and improve clinical outcome in patients.

104

105 **Materials and methods**

106 **Cell culture.** REH (human B-cell precursor leukemia, TEL/AML1-positive) , NALM-6 (human
107 B-cell precursor leukemia, TEL/PDGFRB1-positive) and RS4;11 (human B-cell precursor
108 leukemia, MLL/AF4-positive) cell lines were purchased from German Collection of
109 Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
110 Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and cultivated according to the producer's
111 instructions. Cell lines were negative for mycoplasma contamination.

112

113 **Patient samples.** Bone marrow samples from untreated children initially diagnosed with B-cell
114 precursor ALL were collected from the Czech Pediatric Hematology Centers. Within 24 hours
115 after aspiration, mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-
116 Paque PLUS (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Ethical committee approved the study #
117 NT12429. All samples were obtained with the informed consent of the children's parents or
118 guardians. Isolated blasts were maintained in RPMI media with 10% FBS (Life Technologies,
119 Carlsbad, CA, USA) and insulin-transferrin-sodium selenite supplement (Sigma-Aldrich, St
120 Louis, MO, USA).³² The characteristics of the patients whose samples were used for western
121 blot analysis (1-3), Annexin V/DAPI staining (4-8) and measurement of respiration (9-11) are
122 listed in Supplemental Table 1.

123

124 **Isolation of B-lymphocytes.** Human B Cell Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies,
125 Vancouver, BC, Canada) was used according to the manufacturer's instructions to isolate B
126 cells from the buffy coat of healthy donors. B cells were incubated in RPMI media
127 supplemented with 10% FBS, IL-21 (50 ng/ml) and IL-2 (50 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis,
128 MO, USA). B cells were isolated from three healthy donors.

129

130 **Electrophoresis and western blotting.** Protein lysates were prepared as previously described.¹⁹
131 Proteins (10-40 ug per well) were resolved by NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gels (Life
132 Technologies, Carlsbad, CA, USA) and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad,
133 Hercules, CA, USA). The membrane was probed overnight with primary antibodies listed in
134 Supplementary Table 2. The bound antibodies were detected with the appropriate secondary
135 antibodies (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) conjugated with horseradish peroxidase and
136 visualized using ECL reagent followed by exposure to x-ray film (Kodak, Rochester, NY,
137 USA). Rapamycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) served as a positive control of
138 mTORC1 inhibition. Densitometry was performed using Image J software. The densitometry
139 value was normalized against the value for β -actin.

140

141 **RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR.** Total cellular RNA was extracted using the
142 RNeasy mini-kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's
143 instructions and converted to cDNA using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules,
144 CA, USA). The c-Myc transcript was detected using the Power SYBR Green PCR Master Mix
145 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The primer sequences of c-Myc is listed in
146 Supplementary Table 3. β 2 microglobulin (β 2m), served as a house-keeping gene. PCR
147 reactions were performed in a LightCycler®480 Real-Time PCR machine (Roche Diagnostics
148 GmbH, Germany).

149

150 **Assessment of cell death.** Cells were treated with ASNase (Medac GmbH, Hamburg,
151 Germany), etomoxir (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or both and apoptosis was quantified
152 by Annexin V-FITC (Exbio Praha, a.s., Czech Republic) and DAPI (Life Technologies,
153 Carlsbad, CA, USA) or PI (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) staining using flow
154 cytometer. Measurements were performed in triplicate.

155

156 **Combination index (CI) calculation.** CI values were calculated using CompuSyn software
157 (www.combosyn.com). The calculation of dose-effect relationship for each drug we used was
158 done via serial dilution. CI was calculated from serial dilution of ASNase and each dose of
159 etomoxir. CI was used to express synergism ($CI < 1$), additive effect ($CI = 1$), or antagonism
160 ($CI > 1$).³³

161

162 **Assessment of autophagic flux.** Cells were treated with ASNase and bafilomycin (Sigma-
163 Aldrich, St Louis, MO, USA) for 6, 12 and 24 hours. Autophagic flux was quantified by
164 western blotting.

165

166 **Detection of de novo intermediates of pyrimidine synthesis by UPLC-ToF-MS.** The cells
167 were seeded to fresh media and incubated O.N. Next we treated the cells with ASNase (4
168 IU/ml) for 24 h. Five millions of cells were harvest for each condition and washed in PBS.
169 Dried cell pellets were resuspended in 500 μ L of a methanol/water (50/50; v/v%) mixture
170 containing 10 mM acetic acid. After precipitation of the protein content, the supernatant was
171 evaporated. The dried pellets were resuspended in 150 μ l of water/acetonitrile/formic acid
172 (39.9/60/0.1 v/v/v%) and centrifuged. The resulting extracts were injected into the LC-MS
173 system using ACQUITY UPLC with Acquity UPLC amide column 1.7 μ m (2.1 \times 100 mm) and
174 ToF MS, SYNAPT G2 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Retention time for uridine
175 monophosphate (UMP) and uridine was 2.95 min and 1.68 min respectively. The limit of
176 detection of those compounds: UMP 0.5 μ M, Uridine 0.05 μ M. The measurement was
177 performed in three independent experiments.

178 **HPLC analysis.** HPLC analysis of amino acids was performed using Waters AccQ-Tag(TM)
179 Chemistry Package (WAT052875) on two pump Beckman Coulter Gold chromatograph with
180 Merck-Hitachi F-1080 fluorescence detector (ex.250nm, em. 395nm). Data were collected and
181 evaluated with DataApex CSW32 chromatography software.

182

183 **Glucose-uptake measurement.** Cells were washed twice with Krebs-Ringer-HEPES (KRH)
184 buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25mM MgSO₄, 1.25mM CaCl₂),
185 resuspended in 900 µl of KRH buffer and incubated for 15 minutes at 37 °C. Next, we added
186 100 µl of 10x START solution (1 mM 2-deoxyglucose, 5 µCi/ml [³H]-2-deoxyglucose,
187 PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) and incubated the cells for 10 minutes at 37
188 °C. Cells were washed with PBS, collected by centrifugation, and the cell pellet was solubilized
189 in 1 ml of 0.03% SDS for 10 minutes at 37 °C. Radioactivity was measured using a 1900TR
190 liquid scintillation analyzer (Packard). The measurement was performed in four independent
191 experiments.

192

193 **Extracellular lactate.** Extracellular lactate was measured using the Lactate Kit (Trinity
194 Biotech, Bray, Ireland) according to the manufacturer's directions. Changes in lactate
195 production were normalized to the protein content. The measurement was performed in five
196 independent experiments.

197

198 **Fatty acid oxidation (FAO) measurement.** Cells were incubated for 4 hours in culture
199 medium containing 100 µM palmitic acid, 1 mM carnitine and 1.7 µCi [9,10(n)-³H]palmitic acid
200 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in the presence or absence of etomoxir (100 µM,
201 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and the medium was collected to analyze the amount of
202 released ³H₂O that was formed during the cellular oxidation of [³H]-palmitate.³⁴⁻³⁶ Medium was
203 precipitated with 10% TCA, and supernatants were neutralized with 6 M NaOH and loaded onto
204 ion exchange columns packed with DOWEX 1X2-400 resin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,
205 USA). ³H₂O was eluted with water and quantitated by liquid scintillation counting. The
206 oxidation of [³H]-palmitate was normalized to the protein content, as determined using a DC
207 Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Non-mitochondrial FAO and background signal
208 (FAO measured in samples after incubation with etomoxir) was extracted, and mitochondrial
209 FAO (etomoxir counts extracted from total counts) was presented in nCi/mg protein/h. The
210 measurement was performed in four independent experiments.

211

212 **Respiration.** The endogenous respiration of intact cells was measured in the culture medium at
213 37 °C using Oxygraph-2k-respirometer (OROBOROS Instruments Corporation, Innsbruck,
214 Austria). Respiratory rates were determined in both coupled and uncoupled states, the latter

215 after titration of the uncoupler FCCP (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone;
216 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Inhibition by ATP synthase inhibitor oligomycin (Sigma-
217 Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to verify dependence of coupled respiration on
218 mitochondrial F₀F₁-ATP synthase. The following concentrations of cells and respiratory
219 inhibitors were applied: 0.4 mg/mL cells, 1 μM oligomycin, 200-300 nM FCCP, and 0.5 μM
220 antimycin A (respiratory chain inhibitor; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The
221 measurement was performed in four (REH, NALM-6) and three (healthy B-lymphocytes, BCP-
222 ALL) independent experiments.

223

224 **NAD⁺/NADH ratio.** The NAD⁺/NADH ratio was measured using the NAD⁺/NADH Glo assay
225 (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. The ratio was
226 measured in three independent experiments.

227

228 **Lentiviral RagB cell models.** We have used Flag pLJM1 RagB wild-type (RagB wt; Addgene
229 plasmid 19313) and and Flag pLJM1 RagB 99L (Addgene plasmid 19315) lentiviral constructs
230 (Addgene, Cambridge, MA, USA).³⁷ Lentiviral particles were produced as previously
231 described³⁸ and used for the transduction of NALM-6 cells. Positive clones were selected by
232 puromycin resistance and further used for experiments.

233

234 **Statistical analysis.** Student's *t*-tests were performed in GraphPad Prism software (GraphPad
235 Software, Inc., San Diego, CA) for statistical analyses.

236

237 **Results**

238 **ASNase treatment extensively alters cellular metabolism**

239 Since ASNase disrupts nutrient homeostasis, we studied its effect on key metabolic pathways in
240 leukemic cells. Effect of applied ASNase dosage (RS4;11: 0.5 IU/ml; REH, NALM-6: 4 IU/ml
241 chosen according to the pharmacokinetics of ASNase³⁹ was confirmed as a change in
242 extracellular amino acid levels by HPLC (Supplementary Figure S1). First, we focused on the
243 impact of ASNase on FAO. We incubated REH, NALM-6 and RS4;11 B-precursor leukemic
244 cells with ASNase for 18 hours and measured the activity of FAO. ASNase treatment
245 significantly increased FAO in these cell lines (Figure 1a). The effect of etomoxir on FAO in
246 ALL cells is shown in Supplementary Figure S2. Next, we determined the effect of ASNase on
247 glucose metabolism in REH and NALM-6 cells and observed that ASNase treatment
248 significantly reduced glucose uptake in both cell lines (Figure 1b). This was accompanied by
249 decreased lactate production in NALM-6 cells (Supplementary Figure S3). Lactate production
250 in RS4;11 was also significantly reduced after ASNase treatment. There were no observable

251 changes in REH cells; however, the basal lactate level was substantially lower in REH cells
252 compared to NALM-6 (data not shown). Furthermore, we determined the levels of the
253 glycolysis regulator c-Myc and glucose transporter type 1 (GLUT1). As shown in
254 Supplementary Figure S4, ASNase significantly decreased c-Myc mRNA expression in ALL
255 cell lines with a concomitant decrease in the protein levels of c-Myc and GLUT1. Consistent
256 with these results observed in ALL cell lines, we detected decreased c-Myc protein levels also
257 in some primary ALL cells following ASNase treatment (Supplementary Figure S4).
258 Both FAO and glucose oxidation yield reduced NADH, which is then oxidized by
259 mitochondrial respiratory chain. In the subsequent experiment we therefore investigated the
260 impact of ASNase on the mitochondrial respiration in ALL cells. ASNase significantly
261 increased basal oxygen consumption (routine respiration) of REH cells ($p=0.0276$) (Figure 1c
262 and Supplementary Figure S5). In the uncoupled state, which serves as a measure of the
263 maximum capacity of the respiratory chain, we observed a significant increase in oxygen
264 consumption in ALL cell lines (Figure 1c and Supplementary Figure S5). More interestingly,
265 we observed significant increase of the spare respiratory capacity (uncoupled/coupled
266 respiration) in REH and NALM-6 cell lines treated with ASNase (Figure 1d). The increase of
267 spare respiratory capacity was borderline significant ($p=0.062$) in RS4;11 cell line. We found a
268 similar increase in the spare respiratory capacity also in the primary ALL cells upon ASNase
269 treatment (Figure 1d). In contrast, this was not the case for the control B-lymphocytes isolated
270 from peripheral blood of healthy subjects (Figure 1d), indicating that the effect of ASNase is
271 specific to leukemic cells. The increase in the respiratory capacity was not accompanied by a
272 change in the content of oxidative phosphorylation (OXPHOS) proteins (Supplementary Figure
273 S6), meaning that it likely represents a shift in the balance of available substrates. Indeed, we
274 detected a significant increase in the NAD^+/NADH ratio in ALL cell lines following ASNase
275 treatment (Supplementary Figure S7).

276

277 **ASNase modulates pyrimidine synthesis and autophagy via mTORC1 inhibition**

278 Our previous experiments have shown that ASNase treatment affects key metabolic pathways in
279 ALL cells. Based on the sensitivity of mTORC1 to amino acids levels and the evidence that
280 ASNase treatment inhibits mTORC1 signaling,²⁵ we hypothesized that the effect of ASNase on
281 metabolism is driven through mTORC1. First we confirmed the effect of ASNase on main
282 mTORC1 targets. We detected dephosphorylated p-P70S6K and p-S6 in ALL cell lines and
283 some primary ALL samples treated with ASNase (Figure 2a and Supplementary Figure S8).
284 Furthermore, we detected dephosphorylated carbamoyl phosphate synthase II (p-CAD),
285 suggesting a decrease in the de novo synthesis of pyrimidines (Figure 2a).⁴⁰ Similar effect on p-
286 CAD status was also observed using specific mTOR inhibitor rapamycin (Figure 2a). We also
287 measured the intermediates of de novo pyrimidine synthesis using UPLC-ToF-MS in REH and

288 NALM-6 cells treated with ASNase. In concordance with the dephosphorylation of p-CAD, we
289 observed significantly decreased synthesis of uridine monophosphate (UMP) and uridine in
290 REH and NALM-6 cells treated with ASNase (Figure 2b). Another mechanism that may be
291 activated upon mTORC1 inhibition is autophagy. To investigate whether ASNase treatment
292 augments autophagic flux, we detected the conversion (LC3-I to LC3-II) of the marker of
293 autophagosome, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) by western blot. Treatment
294 with ASNase induced a time-dependent increase in the expression of LC3-II in the NALM-6
295 cell line (Figure 2c), indicating that ASNase activates autophagy. Consistent with increased
296 autophagic flux following treatment with ASNase, there was a time-dependent decrease in the
297 level of p62 (selective substrate of autophagy). LC3-II accumulation following ASNase
298 treatment was intensified in the NALM-6 cell line after treatment with Bafilomycin A1 (BafA1)
299 (Figure 2c). BafA1 is an inhibitor of the vacuolar ATPase, which blocks the fusion of
300 autophagosomes with lysosomes, leading to an accumulation of autophagosomes.⁴¹ This result
301 confirms that the observed increase in LC3-II after ASNase treatment was due to increased
302 autophagic flux and not because of decreased degradation of lipidated LC3.

303 **ASNase acts through the RagB-mTORC1 pathway**

304 Next, we investigated the mechanism whereby ASNase inhibits the mTORC1 pathway. The
305 activation of mTORC1 in the presence of amino acids is mediated by the Rag GTPases A, B, C
306 and D. A key event in the amino acid-dependent activation of mTORC1 is the conversion of
307 RagA or RagB from a GDP- to GTP-bound state.^{31, 37, 42} To determine whether ASNase inhibits
308 mTORC1 by the same mechanism as general amino acid deprivation, we established RagB
309 wild-type (RagB wt) and RagB mutant (RagB 99L) cells (Figure 3). The mutation of RagB
310 causes constitutive activation of mTORC1 by permanent conversion to GTP and localization of
311 mTOR in the vesicle compartments regardless amino acid deprivation.³⁷ We used a lentiviral
312 system to achieve permanent expression of RagB in the NALM-6 cell line. The resistance of the
313 mTOR pathway inhibition to amino acid deprivation by ASNase treatment was confirmed in
314 RagB 99L. There was no change in p-S6 level in the RagB 99L cells whereas ASNase treatment
315 inhibited p-S6 protein in RagB wt cells. Concordantly, p-CAD protein was inhibited more
316 extensively in RagB wt cells than in RagB 99L cells (Figure 3a). Importantly, the ability to
317 enhance FAO was impaired in RagB 99L cells exposed to ASNase (Figure 3b). These results
318 suggest that the effect of ASNase on protein translation, de novo pyrimidine synthesis and FAO
319 is mediated through the RagB-mTORC1 pathway. By contrast, c-Myc expression was decreased
320 in both RagB wt and RagB 99L cells (Figure 3a). Consistent with this result, there was a
321 significant decrease in the level of extracellular lactate in RagB 99L cells (Supplementary
322 Figure S9), indicating that ASNase inhibits glycolysis in a RagB-mTORC1-independent
323 manner. To test whether c-Myc inhibition following ASNase treatment is mTORC1

324 independent, we detected the c-Myc protein level in REH and NALM-6 cells treated with the
325 mTORC1 inhibitor rapamycin. Contrary to the effects of ASNase, inhibition of mTORC1 by
326 rapamycin did not cause a substantial decrease in c-Myc (Supplementary Figure S10).

327 These results suggest that ASNase inhibits protein translation and DNA synthesis directly
328 through RagB-mTORC1, and inhibition of the mTORC1 pathway also causes enhancement of
329 FAO. However, glycolysis seems to be regulated through a different mechanism.

330

331 **Inhibition of FAO increases the cytotoxic effect of ASNase in ALL cells**

332 The activation of FAO has been suggested to exert a pro-survival function in leukemic cells
333 under nutrient stress conditions. We tested whether the increase of FAO upon ASNase treatment
334 allows leukemic cells to cope with metabolic stress. We treated REH and NALM-6 cells with
335 the FAO inhibitor etomoxir, ASNase, or both drugs, and measured its effect on the viability of
336 the cells. The concentrations of etomoxir were 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. The range of
337 etomoxir was chosen according to previous publications.^{43, 44} Pharmacological inhibition of
338 FAO in combination with ASNase increased apoptosis in REH and NALM-6 cells. As shown in
339 Figure 4a, combination indices (CI) for etomoxir with ASNase were less than 1, indicating
340 synergistic mode of action in both cell lines.³³ Complete data on the effect of both drugs is
341 shown in Supplementary Figure S11. The most effective concentrations of etomoxir in the
342 combination with ASNase were 100 and 200 μ M. Importantly, similar results were obtained in
343 primary diagnostic ALL patient samples co-treated with ASNase and etomoxir. Etomoxir
344 increased the cytotoxic effect of ASNase in ex vivo conditions in four out of five diagnostic
345 BCP-ALL patient samples (Figure 4b). These results reveal that increased FAO is crucial for the
346 survival of ALL cells treated with ASNase. Moreover, cells with the inability to induce FAO
347 (RagB 99L) were significantly more sensitive to ASNase compared with RagB wt cells, shown
348 by the cleavage of PARP (Figure 3a) and the assessment of apoptosis by Annexin V/DAPI
349 staining (Figure 4c). Altogether, our results revealed enhanced cytotoxic effect of ASNase due
350 to FAO inhibition.

351

352 **Distinct effect of Asn and Gln on mTOR downstream targets and FAO activity**

353 Lastly, we examined the individual roles of Gln and Asn on cellular processes. We cultured
354 ALL cell lines under four different conditions: complete media, media without Asn, media
355 without Gln and complete media treated with ASNase. In REH and NALM-6 p-S6 and c-Myc
356 protein levels were decreased after cultivation in media without Asn or Gln but the effect of Gln
357 depletion was more pronounced in NALM-6 cells. On the other hand, in RS4;11 we detected a
358 substantial reduction of p-S6 and c-Myc in the cells cultured in media without Asn. Apoptosis
359 detected by cleaved PARP was not increased by depletion of any amino acid in NALM-6,
360 whereas in REH and RS4;11 apoptosis was triggered by Asn depletion. Depletion of either Asn

361 or Gln had similar impact on p-CAD levels in all studied cell lines (Figure 5a). RS4;11 cells are
362 dependent on Asn presence as also documented by a significant increase of FAO in this cell line
363 after cultivation in media without Asn. FAO was significantly increased after cultivation in Gln-
364 depleted media in NALM-6 cells (Figure 5b). Cell respiration did not follow the FAO activation
365 upon individual amino acids depletion (Supplementary Figure S12). In general, Gln depletion
366 causes suppression of NADH production which, in our experiments, was reflected as the
367 inhibition of maximum capacity of cell respiration. Moreover, we studied the rescue effect of
368 Asn and Gln after ASNase treatment. We pre-treated NALM-6 and REH cell line with ASNase
369 for 8 hours and then changed the media to complete RPMI media, RPMI media without Asn or
370 without Gln, respectively. Media without Asn represent addition of Gln and vice versa, media
371 without Gln represent addition of Asn. After O.N. cultivation we detected mTOR targets (p-S6,
372 S6) and PARP cleavage. Rescue effect of Asn after ASNase treatment is more evident in REH
373 cells. There is an increase in p-S6 as well as a decrease of cleaved PARP compared to addition
374 of Gln in the media. In the NALM-6 cell line though, p-S6 was increased by addition of either
375 Asn or Gln after ASNase treatment. Apoptosis was decreased after addition of both amino acids
376 (Supplementary Figure S13).

377

378 **Discussion**

379 ASNase was incorporated into the treatment protocol for childhood ALL in 1970. Despite the
380 successful use of this drug for decades, the mechanism underlying its cytotoxic effect remains
381 surprisingly obscure. ASNase depletes two extracellular amino acids, Asn and Gln. The
382 depletion of amino acids changes nutrient availability and consequently influences metabolic
383 signaling. Metabolic pathways in malignant cells can be rewired depending on the cellular
384 availability of the nutrients⁴⁵ and thus participate in the mechanisms of drug resistance. This
385 study, for the first time, presents evidence that ASNase triggers extensive metabolic
386 reprogramming in leukemic cells and reveals the adaptive activation of pro-survival metabolic
387 pathways following ASNase treatment. Our data show increased levels of FAO, inhibition of
388 glycolysis and elevated respiratory activities after ASNase treatment. FAO serves as a source of
389 NADH, FADH₂ and acetyl-CoA feeding the Krebs cycle and mitochondrial OXPHOS.
390 Utilization of FAO for energy provision is thus important for the growth and survival of cancer
391 cells under both normal and metabolic-stress conditions.^{36, 46-50} The metabolic rescue role of
392 FAO has been described in different tumors such as diffuse large B cell lymphoma, multiple
393 myeloma and glioblastoma.⁵⁰⁻⁵² Moreover, FAO can contribute to chemoresistance.^{51,52}
394 Pharmacological inhibition of FAO showed a therapeutic benefit in combination with
395 chemotherapy in mouse models of human myeloid leukemia, suggesting that the shift toward
396 FAO could be a target for the treatment of hematological malignancies.^{53, 54} In this study, we

397 combined ASNase and the FAO inhibitor etomoxir in the treatment of childhood ALL samples
398 for the first time. Our experiments showed an increase in FAO after ASNase treatment,
399 providing a rationale for the combination treatment. Etomoxir sensitized leukemic cells to
400 ASNase in two leukemic cell lines in vitro as well as under ex vivo conditions when treating
401 BCP-ALL patient samples. These data support the pro-survival effect of FAO in the treatment
402 of ALL cells with ASNase and demonstrate the potential of this combination treatment.
403 Previous studies have described a negative association between mTOR and FAO and a positive
404 relation of mTOR upregulation with fatty acid synthesis.⁵⁵⁻⁵⁷ Our results show that ASNase
405 inhibited mTORC1 through RagB (Ras-related GTPase), which is a mediator of amino acid
406 signaling.³⁷ Importantly, in the presence of ASNase, RagB mutant cells with the constitutively
407 activated mTOR pathway exhibited a reduction of FAO compared with the significant FAO
408 elevation observed in RagB wt cells. Accordingly, RagB mutant cells were significantly more
409 sensitive to ASNase than RagB wt cells. These results demonstrate that RagB-mTOR inhibition
410 senses metabolic stress, which induces FAO. We hypothesize that the limited elevation of FAO
411 after ASNase treatment in RagB mutant cells was not sufficient to protect these cells from
412 amino acid deprivation.

413 Since ASNase treatment inhibited mTORC1, we focused on the downstream targets of
414 mTORC1 that are involved in cellular metabolism. ASNase treatment inhibited protein
415 translation and pyrimidine synthesis in ALL cells as part of the apoptotic process. Concurrently,
416 leukemic cells treated with ASNase increased autophagy as has been already shown in other
417 cancer type.^{10, 26} Autophagy may serve to maintain intracellular metabolic homeostasis through
418 the degradation of unfolded or aggregated proteins and organelles.⁵⁸ Thus, autophagy may serve
419 as another rescue mechanism by producing amino acids or even fatty acids⁵⁹ that restore the
420 nutrient balance disrupted by ASNase. Glycolysis was yet another metabolic pathway affected
421 by ASNase. ASNase inhibited c-Myc, but it is not clear if this was a direct effect or a feedback
422 loop resulting from the inhibition of glycolysis. Of particular note is our finding that treatment
423 with ASNase increases spare respiration exclusively in leukemic cells. Increase in respiration
424 may reflect increased flux of nutrients that can be oxidized by mitochondria. While this could
425 be both FAO-dependent and FAO-independent, the observed increase in FAO (involving the
426 whole pathway from uptake of palmitate from culture media to its final oxidation to water)
427 argues that at least substantial part of these fatty acids originated from extracellular environment
428 and was oxidized by mitochondria. The increased ratio of NAD⁺/NADH measured after
429 ASNase treatment further supports the increased mitochondrial oxidation of reducing
430 equivalents.

431 The role of individual amino acids in these cellular processes is cell line specific. The tested
432 leukemic cell lines differ in their sensitivity to ASNase and also in ASNS protein level. RS4;11

433 cells are the most sensitive with undetectable ASNS protein, REH cells are intermediate
434 sensitive and have higher ASNS protein levels and NALM-6 cells are the most resistant of the
435 studied cell lines with higher ASNS protein level.^{19, 60} Most importantly, we did not see any
436 differences in the effect of ASNase in ALL cell lines on mTOR targets and metabolic processes.
437 Next, we propose that the higher the sensitivity, the deeper the cells' dependence on Asn. In
438 other words, the cells' dependence on Asn is inversely proportional to the ASNS protein
439 expression. Accordingly, the rescue effect of Asn was pronounced in sensitive cells (REH) after
440 ASNase treatment whereas in NALM-6 cells both amino acids displayed rescue properties. Our
441 data support previous finding presenting that glutaminase activity of ASNase is not essential in
442 anti-cancer effect of ASNS-negative cancer cells.⁶⁰

443 In conclusion, our results demonstrate that ASNase has a strong effect on the bioenergetics and
444 biosynthesis in leukemic cells. Our data further show that increased FAO has a pro-survival
445 effect on leukemic cells. Moreover, our results also suggest that pharmacological blocking of
446 FAO sensitizes leukemic cells to ASNase treatment. Metabolic changes similar to those
447 described here in acute leukemia cells are rather frequent among other cancer subtypes;
448 therefore, using ASNase in combination with etomoxir may represent a treatment option not
449 only for ALL but also for other types of cancers.

450 **Acknowledgements**

451 This work was supported by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic
452 (NT12429) (I.H., J.S., J.T.), (NT12370-5) (T.M.); The Charles University Grant Agency
453 (632513) (I.H., J.S., J.T.), (14-21095P) (K.V.); UNCE 204025/2012 (K.V., P.N.); Ministry of
454 Health, Czech Republic, (00064203 University Hospital Motol, Prague, Czech Republic) (I.H.,
455 J.S., J.T., K.F.); Czech Science Foundation (P302/12/G01) (M.Z.); MSMT Navrat grant
456 LK21307 (M.A.J); the Grant Agency of the Czech Republic (14-36804G) (T.M.); the Ramón y
457 Cajal award, the Basque Department of Industry, Tourism and Trade (Etortek), health
458 (2012111086) and education (PI2012-03), Marie Curie (277043), Movember, ISCIII
459 (PI10/01484, PI13/00031) and ERC (336343) (A.C.); The Basque Government of education
460 (A.A.A.).

461
462 **Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

463
464 Supplementary information is available at Leukemia's website

465
466

467 **References**

- 468 1. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006 Jan
469 12; **354**(2): 166-178.
- 470
471 2. Amylon MD, Shuster J, Pullen J, Berard C, Link MP, Wharam M, *et al.* Intensive high-
472 dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell
473 acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a
474 Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1999 Mar; **13**(3): 335-342.
- 475
476 3. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, *et al.* Results of the Dana-
477 Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute
478 lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007 Feb 1; **109**(3): 896-904.
- 479
480 4. Jaccard A, Gachard N, Marin B, Rogez S, Audrain M, Suarez F, *et al.* Efficacy of L-
481 asparaginase with methotrexate and dexamethasone (AspaMetDex regimen) in
482 patients with refractory or relapsing extranodal NK/T-cell lymphoma, a phase 2 study.
483 *Blood* 2011 Feb 10; **117**(6): 1834-1839.
- 484
485 5. Douer D, Yampolsky H, Cohen LJ, Watkins K, Levine AM, Periclou AP, *et al.*
486 Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction
487 in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic
488 leukemia. *Blood* 2007 Apr 1; **109**(7): 2744-2750.
- 489
490 6. Lorenzi PL, Llamas J, Gunsior M, Ozbun L, Reinhold WC, Varma S, *et al.* Asparagine
491 synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell
492 lines. *Mol Cancer Ther* 2008 Oct; **7**(10): 3123-3128.
- 493
494 7. Panosyan EH, Wang Y, Xia P, Lee WN, Pak Y, Laks DR, *et al.* Asparagine depletion
495 potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Mol Cancer Res*
496 2014 May; **12**(5): 694-702.
- 497
498 8. Purwaha P, Lorenzi PL, Silva LP, Hawke DH, Weinstein JN. Targeted metabolomic
499 analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells. *Metabolomics*
500 2014; **10**(5): 909-919.
- 501
502 9. Sircar K, Huang H, Hu L, Cogdell D, Dhillon J, Tzelepi V, *et al.* Integrative molecular
503 profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate
504 cancer. *Am J Pathol* 2012 Mar; **180**(3): 895-903.
- 505
506 10. Yu M, Henning R, Walker A, Kim G, Perroy A, Alessandro R, *et al.* L-asparaginase
507 inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. *J Cell*
508 *Mol Med* 2012 Oct; **16**(10): 2369-2378.

509

- 510 11. Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, *et al.* L-asparaginase:
511 clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med*
512 1971 Jun; **74**(6): 893-901.
- 513
514 12. Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE. Evaluation of L-asparagine metabolism in
515 animals and man. *Cancer Res* 1970 Apr; **30**(4): 929-935.
- 516
517 13. Miller HK, Salser JS, Balis ME. Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase
518 (EC.3.5.1.1) therapy. *Cancer Res* 1969 Jan; **29**(1): 183-187.
- 519
520 14. Ohnuma T, Holland JF, Freeman A, Sinks LF. Biochemical and pharmacological studies
521 with asparaginase in man. *Cancer Res* 1970 Sep; **30**(9): 2297-2305.
- 522
523 15. Fine BM, Kaspers GJ, Ho M, Loonen AH, Boxer LM. A genome-wide view of the in vitro
524 response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005 Jan 1;
525 **65**(1): 291-299.
- 526
527 16. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, *et al.* Gene-
528 expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response
529 to treatment. *N Engl J Med* 2004 Aug 5; **351**(6): 533-542.
- 530
531 17. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Smets LA, Van Wering ER, *et al.* In
532 vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute
533 lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 Oct 1; **90**(7): 2723-2729.
- 534
535 18. Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, *et al.* Upregulation of
536 asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in
537 TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 2004 Mar; **18**(3): 434-441.
- 538
539 19. Hermanova I, Zaliova M, Trka J, Starkova J. Low expression of asparagine synthetase in
540 lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp Hematol* 2012
541 Aug; **40**(8): 657-665.
- 542
543 20. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the
544 metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009 May 22; **324**(5930): 1029-
545 1033.
- 546
547 21. Boag JM, Beesley AH, Firth MJ, Freitas JR, Ford J, Hoffmann K, *et al.* Altered glucose
548 metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2006 Oct;
549 **20**(10): 1731-1737.
- 550

- 551 22. Scotland S, Saland E, Skuli N, de Toni F, Boutzen H, Micklow E, *et al.* Mitochondrial
552 energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in
553 human leukemic cells. *Leukemia* 2013 Nov; **27**(11): 2129-2138.
- 554
555 23. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, *et al.* Systemic
556 treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient
557 tumor cell growth. *Cancer Res* 2007 Jul 15; **67**(14): 6745-6752.
- 558
559 24. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem
560 cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong
561 remission. *Cancer Res* 2009 Oct 1; **69**(19): 7507-7511.
- 562
563 25. Iiboshi Y, Papst PJ, Hunger SP, Terada N. L-Asparaginase inhibits the rapamycin-
564 targeted signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Jul 5; **260**(2): 534-539.
- 565
566 26. Willems L, Jacque N, Jacquel A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, *et al.* Inhibiting
567 glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid
568 leukemia. *Blood* 2013 Nov 14; **122**(20): 3521-3532.
- 569
570 27. Yang L, Moss T, Mangala LS, Marini J, Zhao H, Wahlig S, *et al.* Metabolic shifts toward
571 glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol*
572 *Syst Biol* 2014; **10**: 728.
- 573
574 28. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human
575 autophagy system. *Nature* 2010 Jul 1; **466**(7302): 68-76.
- 576
577 29. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004 Aug 15;
578 **18**(16): 1926-1945.
- 579
580 30. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the
581 translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered
582 phosphorylation events. *Cell* 2005 Nov 18; **123**(4): 569-580.
- 583
584 31. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag
585 GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008 Aug; **10**(8): 935-945.
- 586
587 32. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MW, Heyenbrok MW, *et al.*
588 In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with
589 improved culture conditions. *Blood* 1990 Dec 1; **76**(11): 2327-2336.
- 590
591 33. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of
592 synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* 2006
593 Sep; **58**(3): 621-681.

- 594
595 34. Deberardinis RJ, Lum JJ, Thompson CB. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent
596 modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism
597 during hematopoietic cell growth. *The Journal of biological chemistry* 2006 Dec 8;
598 **281**(49): 37372-37380.
- 599
600 35. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, *et al.* Metabolic
601 control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-
602 1alpha. *EMBO J* 2007 Apr 4; **26**(7): 1913-1923.
- 603
604 36. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, *et al.* A PML-PPAR-delta pathway
605 for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 2012
606 Sep; **18**(9): 1350-1358.
- 607
608 37. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, *et al.* The Rag
609 GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008 Jun
610 13; **320**(5882): 1496-1501.
- 611
612 38. Alberich-Jorda M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, *et al.*
613 C/EBPgamma deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. *J*
614 *Clin Invest* 2012 Dec 3; **122**(12): 4490-4504.
- 615
616 39. Muller HJ, Beier R, Loning L, Blutters-Sawatzki R, Dorffel W, Maass E, *et al.*
617 Pharmacokinetics of native Escherichia coli asparaginase (Asparaginase medac) and
618 hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *British journal of*
619 *haematology* 2001 Sep; **114**(4): 794-799.
- 620
621 40. Robitaille AM, Christen S, Shimobayashi M, Cornu M, Fava LL, Moes S, *et al.*
622 Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine
623 synthesis. *Science* 2013 Mar 15; **339**(6125): 1320-1323.
- 624
625 41. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1
626 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between
627 autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct*
628 *Funct* 1998 Feb; **23**(1): 33-42.
- 629
630 42. Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, *et al.*
631 Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Molecular cell* 2012 Aug 10; **47**(3):
632 349-358.
- 633
634 43. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, *et al.*
635 Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to
636 apoptosis induction. *J Clin Invest* 2010 Jan; **120**(1): 142-156.
- 637

- 638 44. Estan MC, Calvino E, Calvo S, Guillen-Guio B, Boyano-Adanez Mdel C, de Blas E, *et al.*
639 Apoptotic efficacy of etomoxir in human acute myeloid leukemia cells. Cooperation
640 with arsenic trioxide and glycolytic inhibitors, and regulation by oxidative stress and
641 protein kinase activities. *PLoS one* 2014; **9**(12): e115250.
- 642
643 45. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat*
644 *Rev Drug Discov* 2011 Sep; **10**(9): 671-684.
- 645
646 46. Lumeng L, Bremer J, Davis EJ. Suppression of the mitochondrial oxidation of (-)-
647 palmitylcarnitine by the malate-aspartate and alpha-glycerophosphate shuttles. *The*
648 *Journal of biological chemistry* 1976 Jan 25; **251**(2): 277-284.
- 649
650 47. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, *et al.* Antioxidant and
651 oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*
652 2009 Sep 3; **461**(7260): 109-113.
- 653
654 48. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the
655 limelight. *Nat Rev Cancer* 2013 Apr; **13**(4): 227-232.
- 656
657 49. Carracedo A, Weiss D, Leliaert AK, Bhasin M, de Boer VC, Laurent G, *et al.* A metabolic
658 pro-survival role for PML in breast cancer. *J Clin Invest* 2012 Sep 4; **122**(9): 3088-3100.
- 659
660 50. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour
661 cell survival during energy stress. *Nature* 2012 May 31; **485**(7400): 661-665.
- 662
663 51. Li J, Zhao S, Zhou X, Zhang T, Zhao L, Miao P, *et al.* Inhibition of lipolysis by
664 mercaptoacetate and etomoxir specifically sensitizes drug-resistant lung
665 adenocarcinoma cell to paclitaxel. *PLoS one* 2013; **8**(9): e74623.
- 666
667 52. Tung S, Shi Y, Wong K, Zhu F, Gorczynski R, Laister RC, *et al.* PPARalpha and fatty acid
668 oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*
669 2013 Aug 8; **122**(6): 969-980.
- 670
671 53. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, *et al.*
672 Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to
673 apoptosis induction. *J Clin Invest* 2008 Jan; **120**(1): 142-156.
- 674
675 54. Barger JF, Gallo CA, Tandon P, Liu H, Sullivan A, Grimes HL, *et al.* S6K1 determines the
676 metabolic requirements for BCR-ABL survival. *Oncogene* 2013 Jan 24; **32**(4): 453-461.
- 677
678 55. Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. mTORC1 controls fasting-
679 induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 2010 Dec 23; **468**(7327):
680 1100-1104.

- 681
682 56. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, *et al.* Absence of S6K1
683 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity.
684 *Nature* 2004 Sep 9; **431**(7005): 200-205.
- 685
686 57. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol*
687 2009 Dec 1; **19**(22): R1046-1052.
- 688
689 58. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, *et al.* Autophagy
690 promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis.
691 *Cancer Cell* 2006 Jul; **10**(1): 51-64.
- 692
693 59. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell* 2014
694 Dec 4; **159**(6): 1263-1276.
- 695
696 60. Chan WK, Lorenzi PL, Anishkin A, Purwaha P, Rogers DM, Sukharev S, *et al.* The
697 glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against
698 ASNS-negative cells. *Blood* 2014 Jun 5; **123**(23): 3596-3606.

699

700

701 **Figure Legends**

702 **Figure 1.** Effect of ASNase on the metabolism of leukemic cells. (a) ALL cell lines were
703 cultured for 18 hours with or without ASNase and the rate of fatty acid oxidation was assessed.
704 The concentration of ASNase was 4IU/ml (REH, NALM-6) and 0.5 IU/ml (RS4;11) The
705 experiment was performed in quadruplicate. (b) ALL cell lines were cultured overnight with or
706 without ASNase (4 IU/ml). Changes in glucose-uptake were measured by the accumulation of
707 [³H]-2-deoxyglucose in cells. (c) ALL cell lines (d) healthy B-lymphocytes and BCP-ALL
708 patient samples were cultured with or without ASNase for 24 hours. The dose of ASNase was 4
709 IU/ml for all samples except of RS4;11 (0.5 IU/ml). The endogenous respiratory rates were
710 determined in both coupled and uncoupled states (the latter after titration of the uncoupler
711 FCCP) and also after the addition of oligomycin. The spare respiratory capacity was calculated.
712 The following concentrations of cells and respiratory inhibitors were applied: 0.4 mg/mL cells,
713 1 μM oligomycin, 200 - 300 nM FCCP. Asterisks represent significant changes. *** p<0.001;
714 ** p<0.01; * p<0.05.

715 **Figure 2.** Effect of ASNase on mTORC1 targets. (a) ALL cell lines were cultured for 24 hours
716 with or without ASNase (4 IU/ml). Levels of phospho-CAD and CAD proteins were measured
717 by immunoblotting, with β-actin used as a loading control. Rapamycin (Rapa; 10 nM) served as
718 a positive control of mTORC1 inhibition. Phospho-S6 and phospho-CAD proteins were

719 measured in ASNase-treated cells (4 IU/ml; 24 hours) from 3 different patients by
720 immunoblotting, using β -actin as a loading control. **(b)** ALL cell lines were cultured for 24
721 hours with or without ASNase (4 IU/ml). Uridine monophosphate (UMP) and uridine levels
722 were measured using UPLC-ToF-MS. **(c)** NALM-6 cells were cultured with or without ASNase
723 (4 IU/ml) in the presence or absence of bafilomycin A1 (Baf A1, 100 nM) for 6, 12 and 24
724 hours to analyze autophagic flux. LC3 I/II and p62 protein levels were measured by
725 immunoblotting, with β -actin used as a loading control. Asterisks represent significant changes.
726 ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

727 **Figure 3.** Effect of ASNase on RagB wild-type and RagB mutant cells. **(a)** RagB wild-type
728 (RagB wt) and mutant (RagB 99L) NALM-6 cells were cultured with or without ASNase (4
729 IU/ml) for 24 hours. Expression levels of phospho-S6, S6, phospho-CAD, CAD, c-Myc,
730 cleaved PARP and RagB proteins were measured by immunoblotting, with β -actin used as a
731 loading control and quantified by densitometry (lower graph). The measurement was performed
732 in three independent experiments. **(b)** RagB wt and RagB 99L cells were cultured overnight
733 with or without ASNase (4 IU/ml) and the rate of fatty acid oxidation was measured. The
734 experiment was performed in quadruplicate. Asterisks represent significant changes. * $p < 0.05$.

735 **Figure 4.** Effect of FAO inhibition on ASNase-mediated cytotoxicity. **(a)** REH and NALM-6
736 cells were treated with ASNase (1, 2, 4, 8 and 16 IU/ml) in combination with etomoxir (Eto1,
737 100 μ M; Eto2, 200 μ M) for 24 hours. The percentage of cell death was determined by Annexin
738 V/PI staining followed by FACS analysis. Combination indexes (CI) were obtained by entering
739 the resulting specific death values into the CompuSyn program. Fraction affected (FA;
740 Percentage of Annexin V/PI positive cells)-CI plots indicate that the combinations of ASNase
741 with etomoxir are synergistic ($CI < 1$). **(b)** Leukemic blasts isolated from the bone marrow of
742 patients with ALL were cultivated with or without ASNase (4 IU/ml) in the presence or absence
743 of the FAO inhibitor etomoxir (Eto1, 100 μ M; Eto2, 200 μ M) for 24 hours. **(c)** RagB wt and
744 RagB 99L NALM-6 cells were cultivated with or without ASNase (4IU/ml) for 24 hours. The
745 percentage of cell death was determined by Annexin V/DAPI staining followed by FACS
746 analysis. Values represent the mean of triplicate measurements. Asterisks represent significant
747 changes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

748 **Figure 5.** Effect os Asn and Gln depletion on ALL cells. **(a)** ALL cell lines were incubated in
749 complete RPMI media (Ctrl), RPMI media without Asn (-ASN), RPMI media without Gln (-
750 GLN) or complete RPMI media with ASNase for 24 hours. The concentration of ASNase was
751 4IU/ml (REH, NALM-6) and 0.5 IU/ml (RS4;11). Levels of phospho-S6, S6, phospho-CAD,
752 CAD, c-Myc, cleaved PARP (cl.PARP), ASNS proteins were measured by immunoblotting,
753 with β -actin used as a loading control. **(b)** ALL cell lines were incubated in complete RPMI

754 media (Ctrl), RPMI media without Asn (-ASN), RPMI media without Gln (-GLN) or complete
755 RPMI media with ASNase for 18 hours and the rate of fatty acid oxidation was assessed.
756 Asterisks represent significant changes. **** p<0.0001; * p<0.05.

757 **Supplementary Figure Legends**

758 Supplementary Figure S1. Detection of amino acids was performed in RPMI media after
759 incubation with or without ASNase (0.5, 1 and 4 IU/ml) for 18 hours. ALL cell lines were
760 incubated with or without ASNase (4 IU/ml) for 18 hours and the media was collected for
761 HPLC analysis of the content of extracellular aminoacids.

762 Supplementary Figure S2. ALL cell lines were incubated for 4 hours in culture medium
763 containing 100 μ M palmitic acid, 1 mM carnitine and 1.7 μ Ci [9,10(n)-³H]palmitic acid and the
764 rate of fatty acid oxidation was assessed.

765 Supplementary Figure S3. ALL cell lines were cultured with or without ASNase (4 IU/ml) for
766 24 hours. The lactate yield was determined by measuring the amount of lactate in the culture
767 medium at the endpoint. All data are shown as the average of five experiments.

768 Supplementary Figure S4. ALL cell lines were incubated with or without ASNase for 24 hours.
769 c-Myc transcript levels (relative to β 2 microglobulin) were determined using quantitative PCR.
770 Expression levels of c-Myc and GLUT1 proteins were measured by immunoblotting, with β -
771 actin used as a loading control. The level of c-Myc protein was measured in ASNase-treated
772 cells (4 IU/ml; 24 hours) from 3 different patients by immunoblotting, using β -actin as a loading
773 control.

774 Supplementary Figure S5. The oxygen consumption trace shows representative results of
775 oxygraphic analysis of REH and NALM-6 cells.

776 Supplementary Figure S6. REH and NALM-6 cells were cultured with or without ASNase (4
777 IU/ml) for 24 hours. The expression levels of succinate dehydrogenase complex, subunit A
778 (SDHA), NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9 (NDUFA9), Complex III
779 subunit Core 2 (Core 2), subunit IV of cytochrome c oxidase (COX4), subunit F1- α of ATP
780 synthase (F1- α) and Porin proteins were measured by immunoblotting, with β -actin used as a
781 loading control.

782 Supplementary Figure S7. REH and NALM-6 cells were cultured with or without ASNase (4
783 IU/ml) for 24 hours. The ratio of NAD⁺/NADH was measured by the detection of luminescence.
784 The experiment was performed three times in duplicate. Asterisks represent significant changes.
785 * p<0.05.

786 Supplementary Figure S8. ALL cell lines were cultured for 24 hours with or without ASNase.
787 The concentration of ASNase was 4IU/ml (REH, NALM-6) and 0.5 IU/ml (RS4;11). Levels of
788 phospho-p70S6K, p70S6K, phospho-S6, S6, cleaved PARP (cl.PARP), phospho-CAD and
789 CAD proteins were measured by immunoblotting, with β -actin used as a loading control.

790 Supplementary Figure S9. RagB wt and RagB 99L cells were cultured with or without ASNase
791 (4 IU/ml) for 24 hours. The lactate yield was determined by measuring the amount of lactate in
792 the culture medium at the endpoint. The experiment was performed in five independent
793 experiments. Asterisks represent significant changes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

794 Supplementary Figure S10. REH and NALM-6 cell lines were incubated with or without
795 ASNase (4 IU/ml) and rapamycin (Rapa; 10 nM) for 24 hours. The expression levels of c-Myc
796 and phospho-CAD proteins were measured by immunoblotting, with β -actin used as a loading
797 control. Phospho-CAD served as a positive control of mTORC1 inhibition.

798 Supplementary Figure S11. REH and NALM-6 cells were treated with ASNase (1, 2, 4, 8 and
799 16 IU/ml) in combination with etomoxir (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) for 24
800 hours. The percentage of cell death was determined by Annexin V/PI staining followed by
801 FACS analysis. Asterisks represent significant changes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

802 Supplementary Figure S12. ALL cell lines were incubated in complete RPMI media (Ctrl),
803 RPMI media without Asn (-ASN) or RPMI media without Gln (-GLN). The endogenous
804 respiratory rates were determined in both coupled and uncoupled states (the latter after titration
805 of the uncoupler FCCP) and also after the addition of oligomycin. Graphs represent uncoupled
806 respiration.

807 Supplementary Figure S13. ALL cell lines were incubated with or without ASNase (4 IU/ml)
808 for 8 hours, washed in PBS and seeded into complete RPMI, RPMI media without Asn (no
809 ASN) or RPMI media without Gln (no GLN). Control and treated cells (ASNase; 4 IU/ml) were
810 maintained in media without washing in PBS (Ctrl, ASNase). The samples were collected after
811 18 hours. Levels of phospho-S6, S6, phospho-CAD, CAD and cleaved PARP (cl.PARP) were
812 measured by immunoblotting, with β -actin used as a loading control.

813 **Supplementary Table Legends**

814 Supplementary Table 1. Characteristics of the patients with ALL included in the study.

815 Supplementary Table 2. List of antibodies used in western blotting

816 Supplementary Table 3. c-Myc primer sequence

FIGURE 1

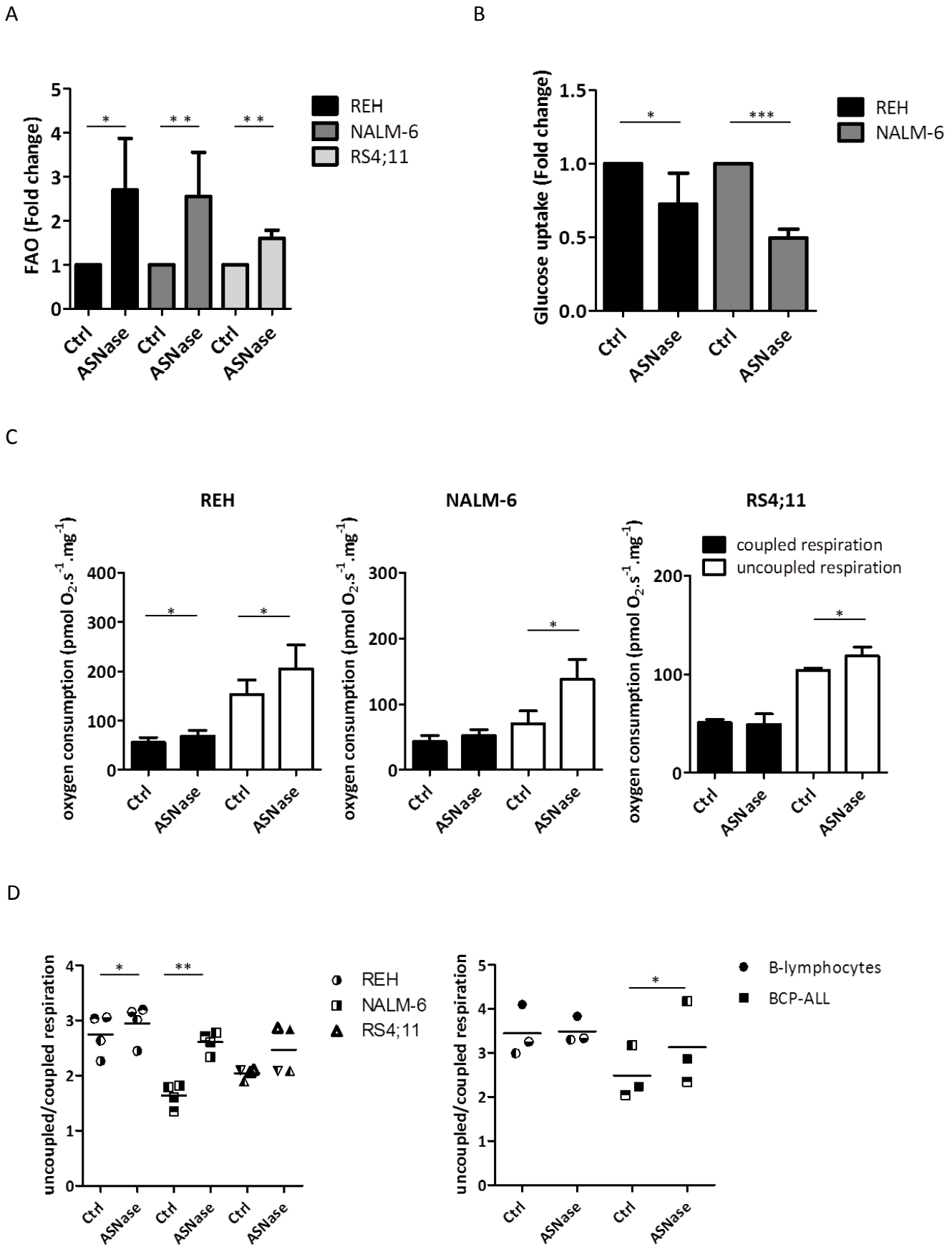
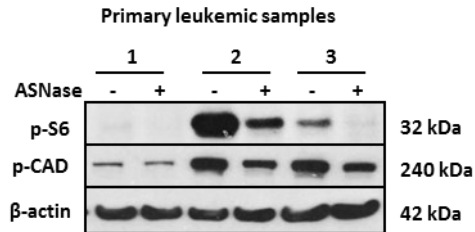
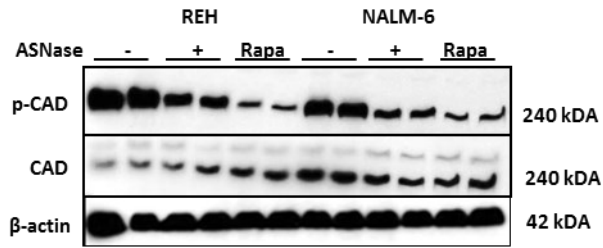
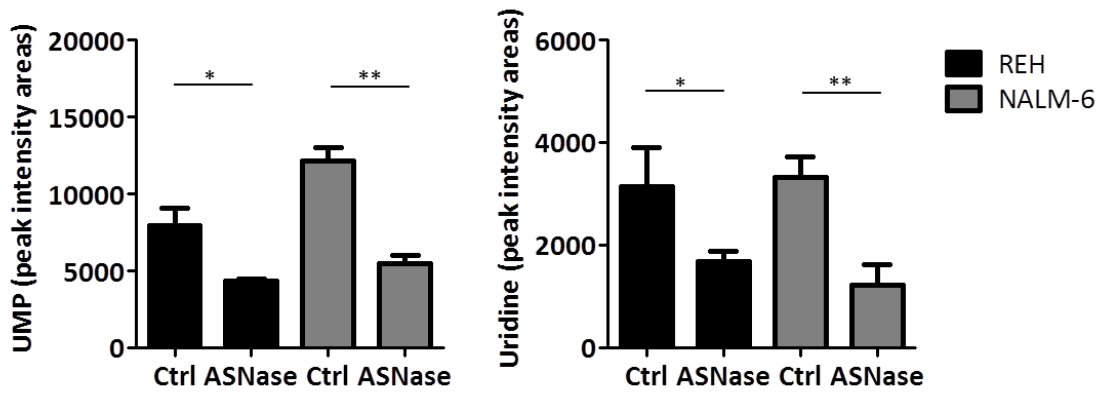


FIGURE 2

A



B



C

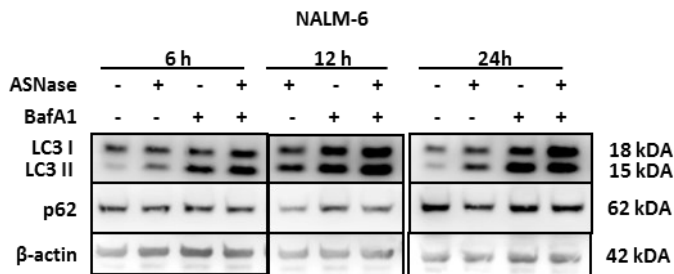


FIGURE 3

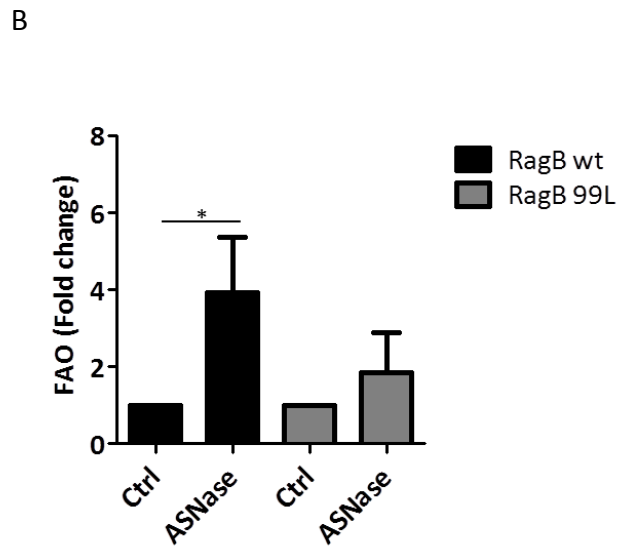
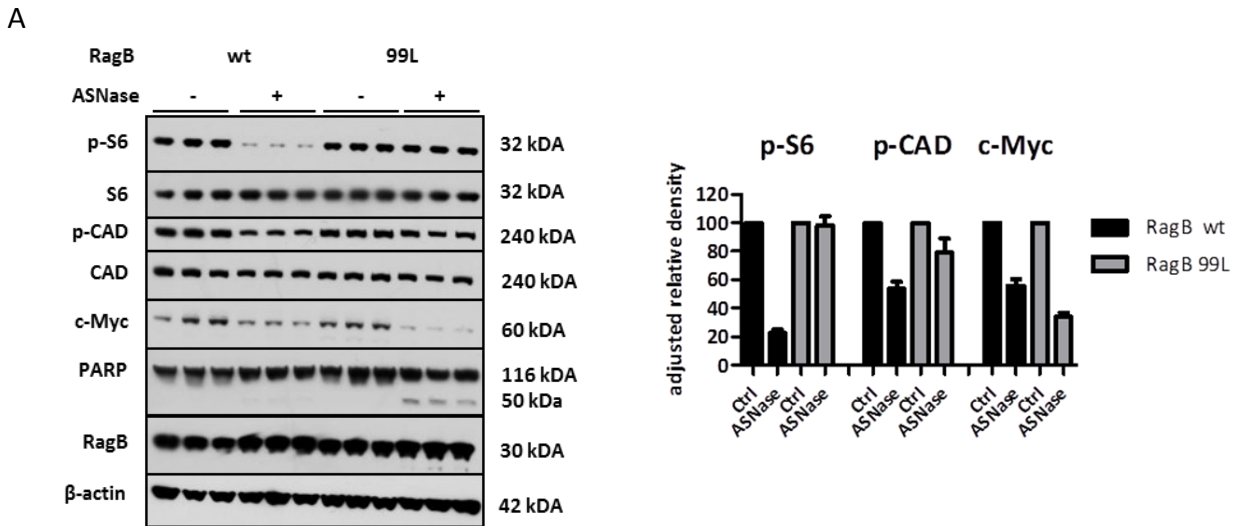


FIGURE 4

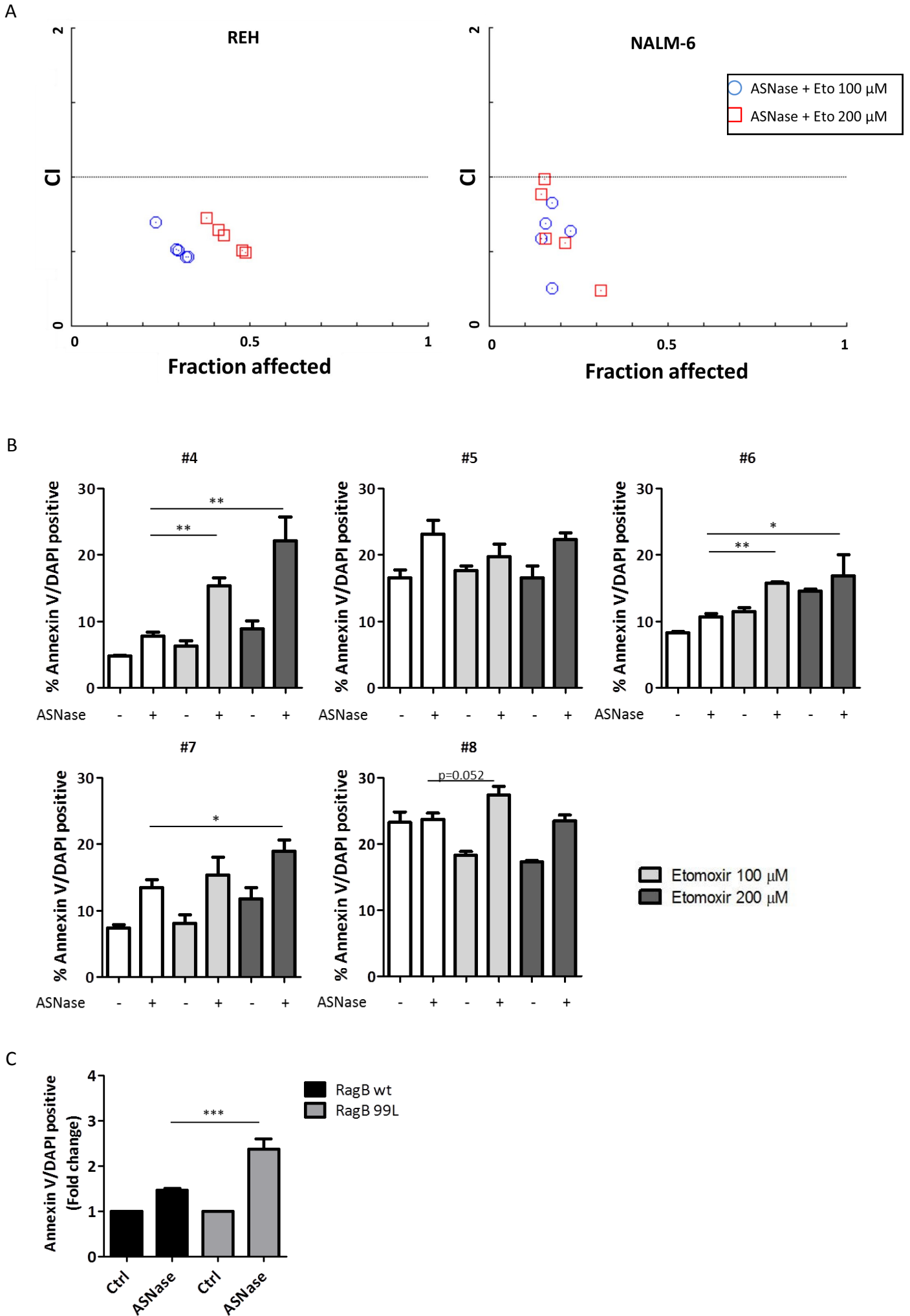
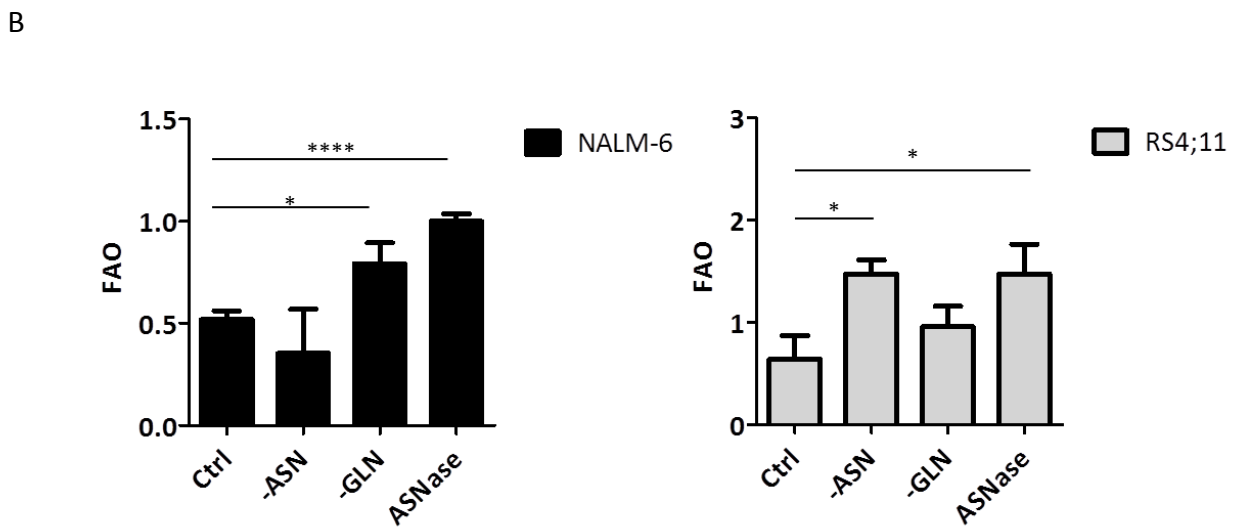
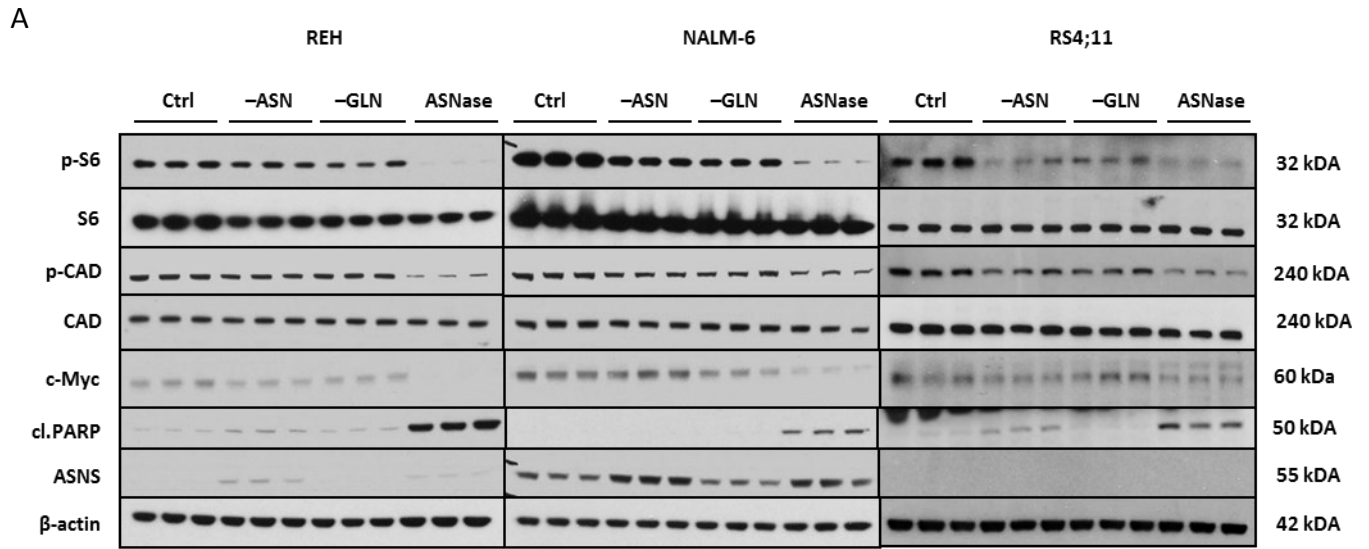
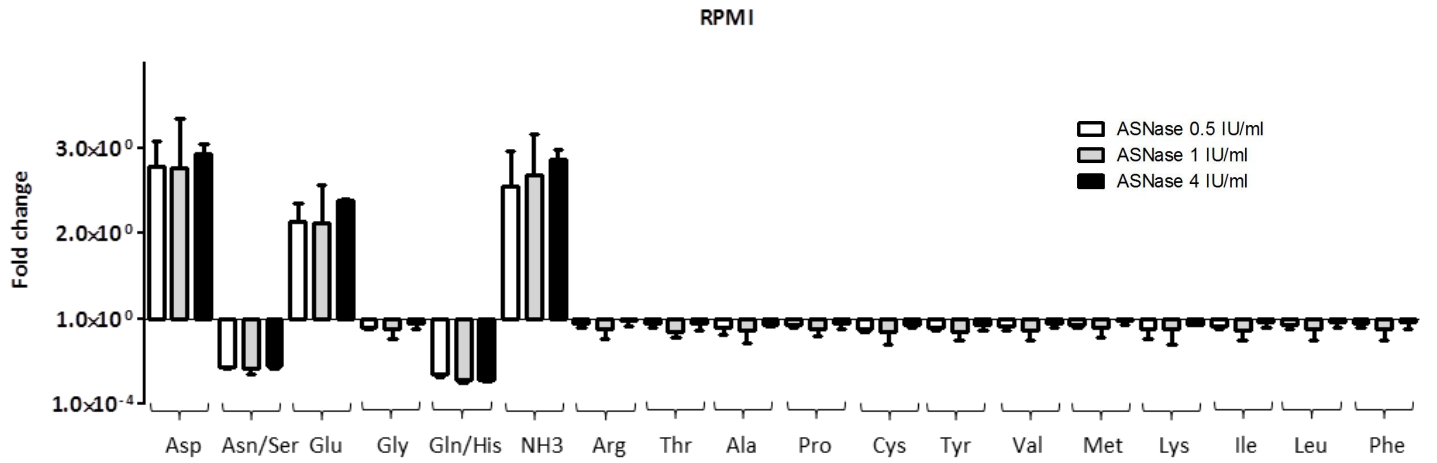


FIGURE 5

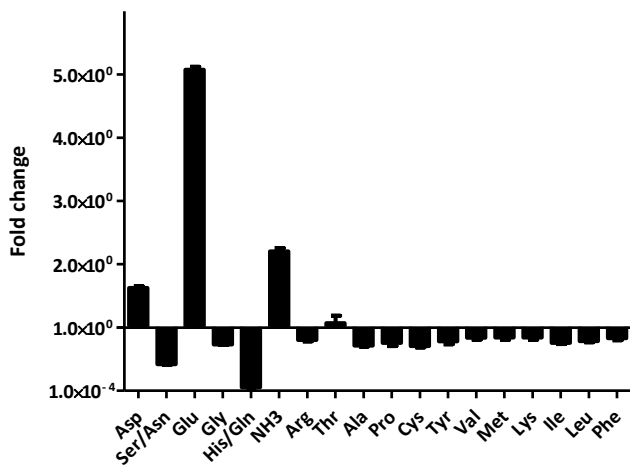


Supplementary Figures

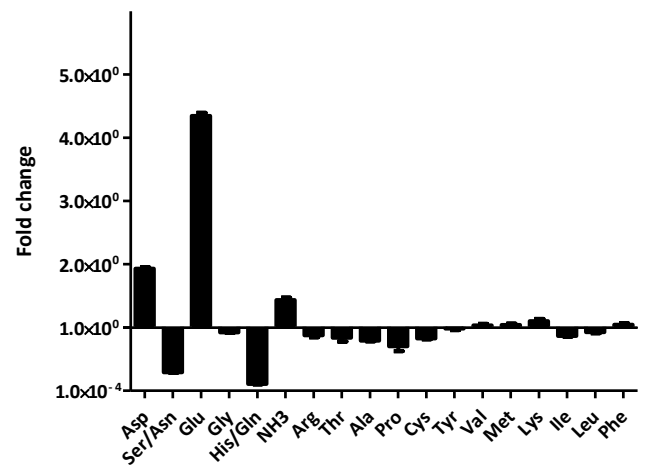
S1



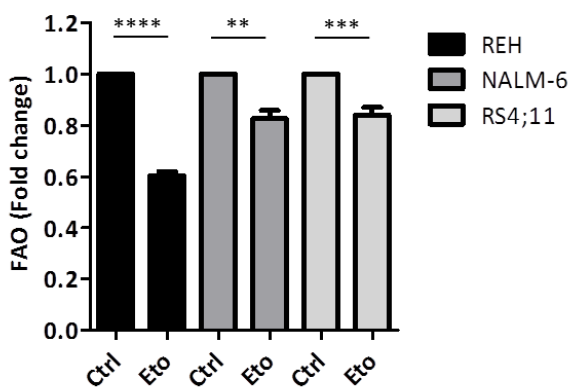
REH



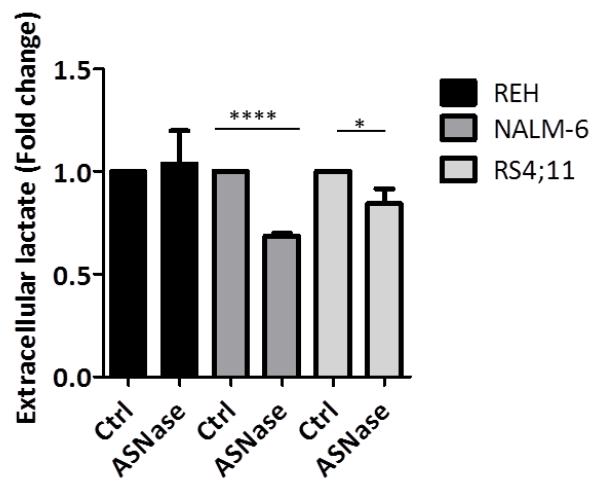
NALM-6



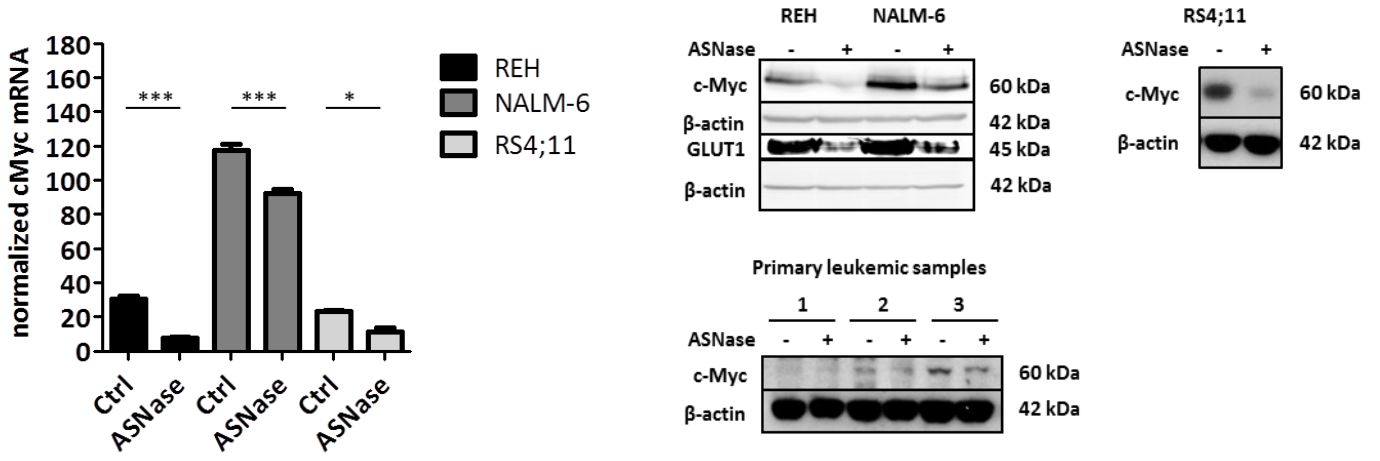
S2



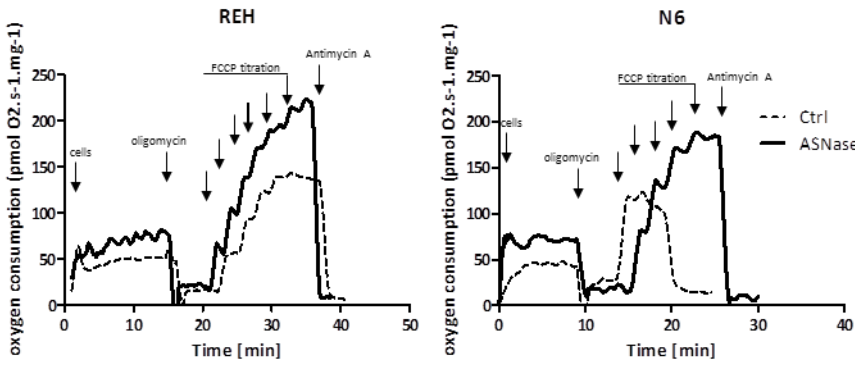
S3



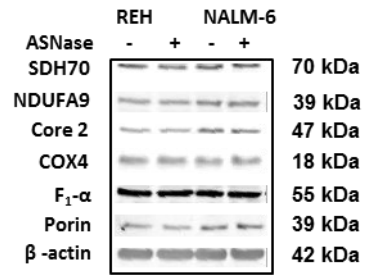
S4



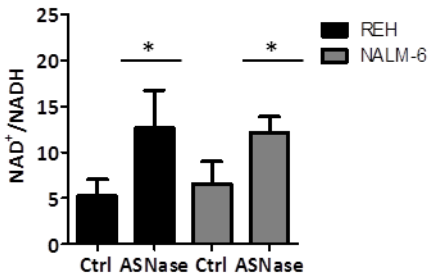
S5



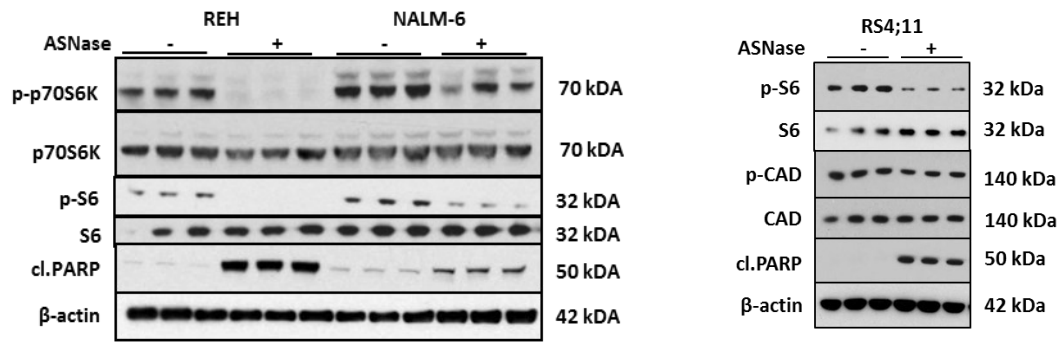
S6



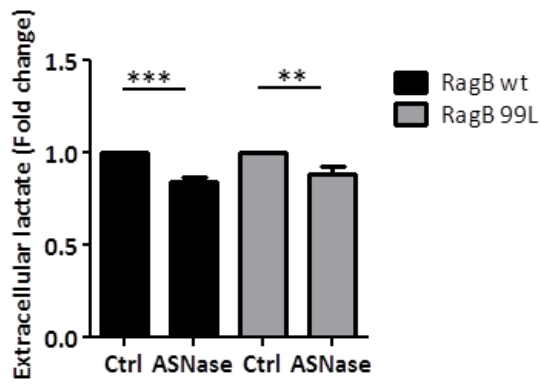
S7



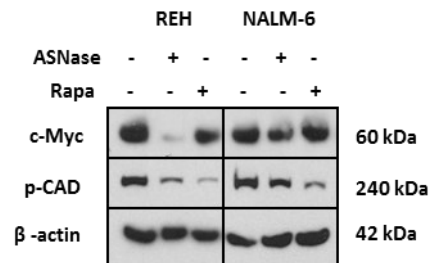
S8



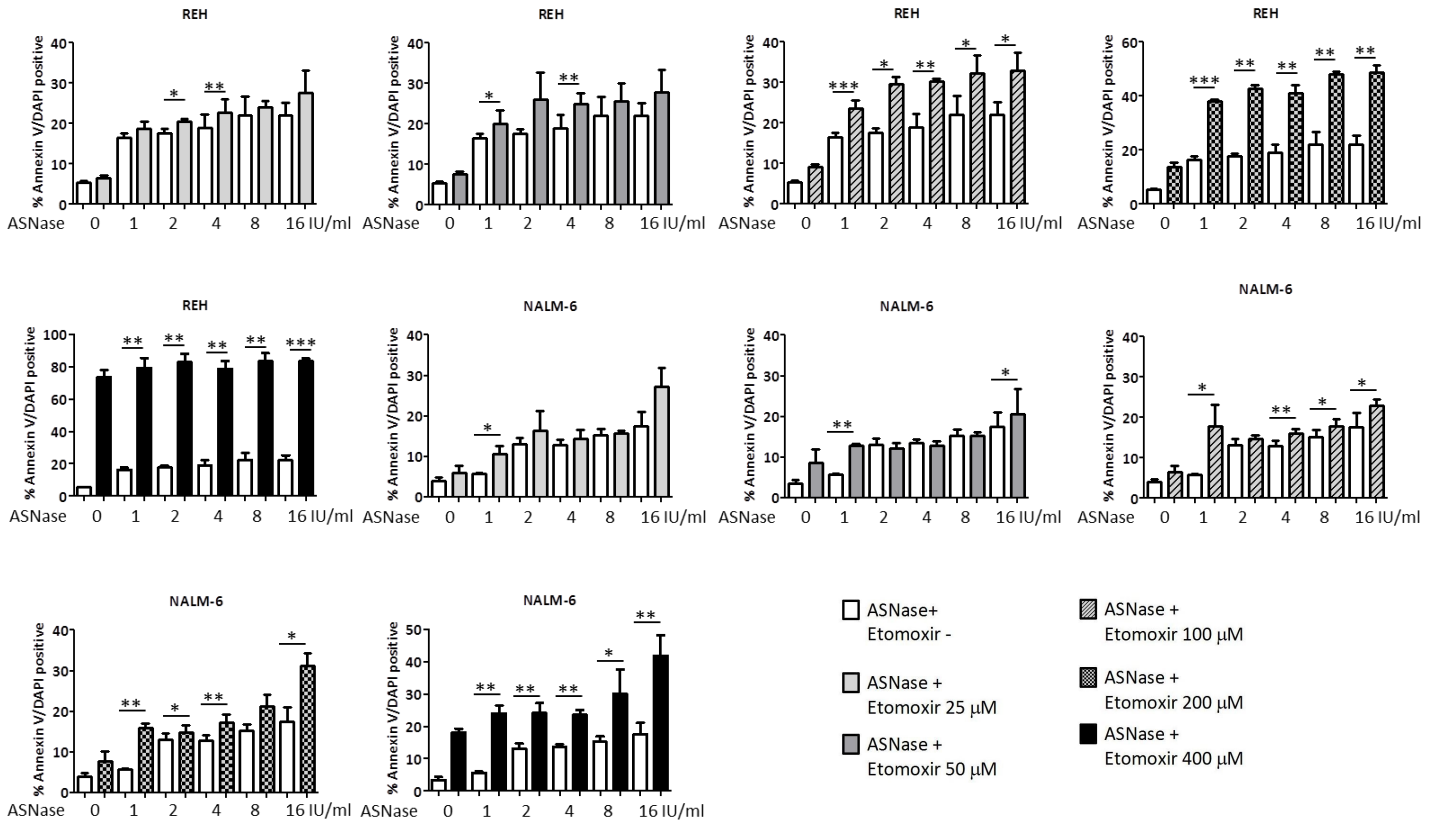
S9



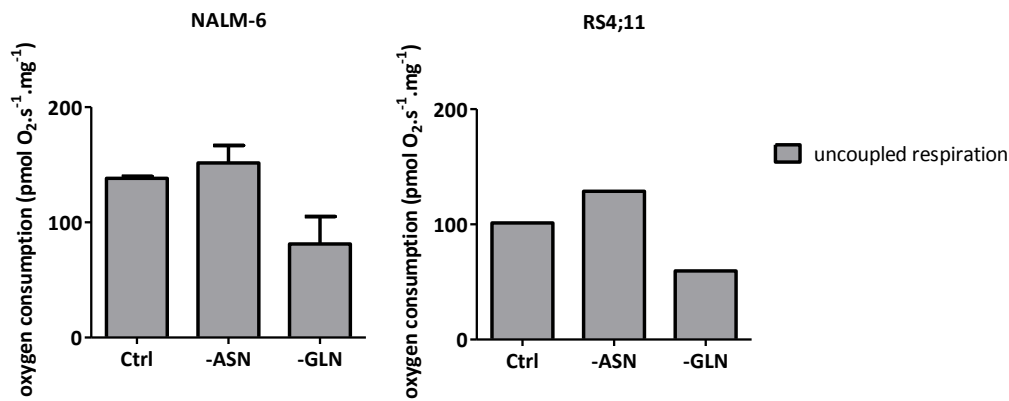
S10



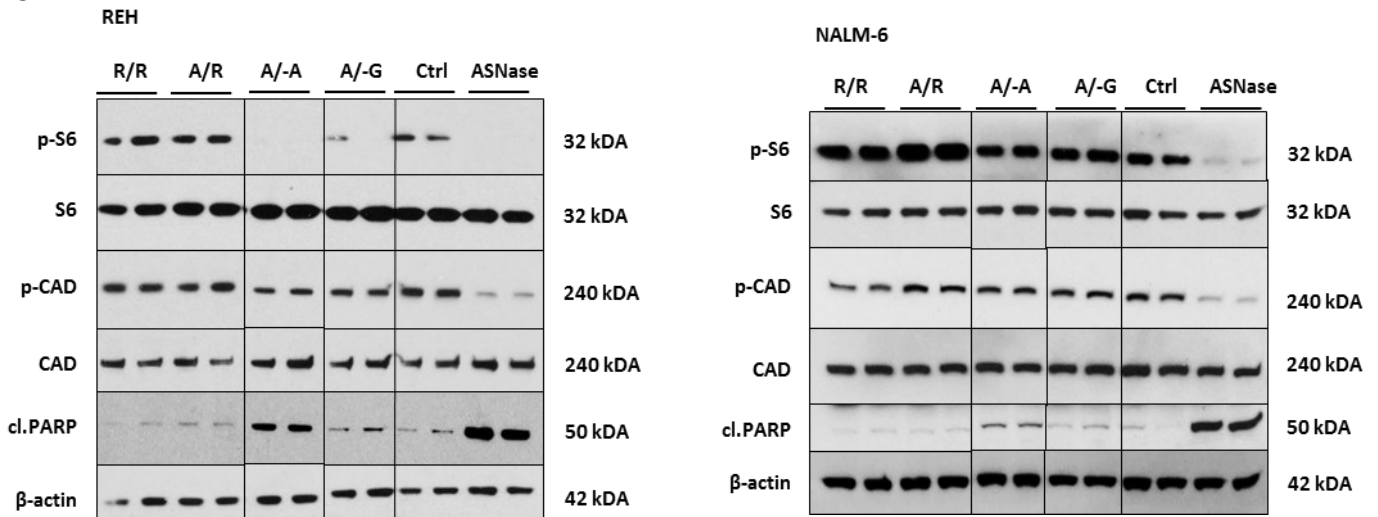
S11



S12



S13



Supplementary Table 1

Characteristics of ALL patients				
Patient #	age (years)	Sex	Diagnosis	molecular genetic subgroup
1	11	F	cALL	mBCR/ABL
2	6	M	praeB-ALL	B-other
3	4	F	cALL	TEL/AML1
4	6	F	cALL	TEL/AML1
5	13	M	cALL	
6	5	M	cALL	hyperdiploid
7	3	M	cALL	TEL/AML1
8	14	M	cALL	hyperdiploid
9	60	M	cALL	mBCR/ABL
10	3	F	cALL	TEL/AML1
11	2	M	cALL	

Supplementary table 2. List of antibodies used in western blotting		
Antibody name	Company	Catalogue number
anti-Phospho-p70S6K (T389)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	9234
anti-p70S6K	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	2708
anti-S6	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	2217
anti-phospho-S6 (Ser235/236)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	4858
anti-PARP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	9532
anti-c-Myc	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	9402
anti-CAD	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	11933
anti-phospho-CAD (Ser1859)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	12622
anti-RagB	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	8150
anti-LC3	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	NB 100-2220
anti-Glut-1	Abcam, Cambridge, MA, USA	652
OXPPOS Blue Native WB Anti-body Cocktail	Abcam, Cambridge, MA, USA	110412
anti-Porin	kindly provided by Prof. De Pinto, University of Catania, Catania, Italy	
anti-ASNS	kindly provided by Dr. Kilberg, University of Florida College of Medicine, USA	
anti-p62/SQSTM1	Abnova, Taipei, Taiwan	H00008878-MO1
anti- β -actin	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	A1978

Supplementary Table 3. c-Myc primer sequence (5'-3')	
Forward primer	TCGGATTCTCTGCTCTCCTC
Reverse primer	TCGGTTGTTGCTGATCTGTC

P3. Přehled publikací, abstrakt a přednášek

Seznam publikací:

Heřmanová I, Arruabarrena-Aristorena A, Vališ K, Nůsková H, Alberich Jorda M, Fišer K, Fernández-Ruiz S, Kavan D, Pecinová A, Niso-Santano M, Žaliová M, Novák P, Houštěk J, Mráček T, Kroemer G, Carracedo A, Trka J, Starková J. 2015.

Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia*. **IF**=10,431

Meissner B, Bartram T, Eckert C, Trka J, Panzer-Grümayer R, Hermanova I, Ellinghaus E, Franke A, Möricke A, Schrauder A, Teigler-Schlegel A, Dörge P, von Stackelberg A, Basso G, Bartram CR, Kirschner-Schwabe R, Bornhäuser B, Bourquin JP, Cazzaniga G, Hauer J, Attarbaschi A, Izraeli S, Zaliova M, Cario G, Zimmermann M, Avigad S, Sokalska-Duhme M, Metzler M, Schrappe M, Koehler R, Te Kronnie G, Stanulla M. 2014. Frequent and sex-biased deletion of SLX4IP by illegitimate V(D)J-mediated recombination in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hum Mol Genet*. 23(3):590-601. **IF**=6,393

Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, Fialova A, Sojka L, Cartron PF, Houska M, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. 2014. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer*. 135(5):1165-77. **IF**=5,085

Hermanova I, Zaliova M, Trka J, Starkova J. 2012. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp Hematol*. 40(8):657-65. **IF**=2,475

Starkova J, Gadgil S, Qiu YH, Zhang N, Hermanova I, Kornblau SM, Drabkin HA. 2011. Up-regulation of homeodomain genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 signaling. *Haematologica*. 96(6):820-8. **IF**=5,868

Heřmanová I, Trka J, Starková J. Odlišné hladiny asparagin syntetázy nejsou zodpovědné za rozdílnou senzitivitu leukemických blastů k L-Asparagináze. Transfúze a hematologie dnes. 2010, sv. 3/2010, s.133-140. ISSN 1803-6597

Abstrakta v časopisech s IF:

Hermanova I, Valis K, Nuskova H, Alberich-Jorda M, Arruabarrena-Aristorena A, Fernández-Ruiz S, Bartova S, Pecinova A, Kavan D, Fiser K, Kuzma M, Novak P, Mracek T, Carracedo A, Trka J, Starkova J. L-Asparaginase Causes Metabolic Reprogramming in ALL Cells. *Blood* 2014 124:922; *published ahead of print December 5, 2014*

Hermanova I, Valis K, Fiser K, Nuskova H, Trka J, Starkova J. L-Asparaginase Strongly Affects Bioenergetics in Leukemic Cells. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2012; 120: 779.

Meissner B, Bartram T, Eckert C, Koehler R, Trka J, Hermanova I, Breithaupt P, Zimmermann M, Cario G, Schrauder A, Möricke A, Cazzaniga G, Kronnie G, Kirschner-Schwabe R, von Stackelberg A, Harbott J, Panzer-Gruemayer R, Bourquin JP, Franke A, Ellinghaus E, Schreiber S, Bartram CR, Schrappe M, Stanulla M. C20orf94 deletion Is Strongly Associated with TEL/AML1 Rearrangement and Links Illegitimate V(D)J Recombination with Gender Bias In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 1718.

Hermanova I, Trka J, Starkova J. Diverse asparagine synthetase expression in lymphoid blasts is not relevant to the sensitivity to L-asparaginase. *Haematologica*, June 2010

Hermanova I, Trka J, Starkova J. Association of Asparagine Synthetase Expression and Sensitivity to L-Asparaginase in Cell Lines and Primary Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Samples. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2009; 114: 2738.

Seznam přednášek

Hermanova I, Valis K, Nuskova H, Houstek J, Carracedo A, Trka J, Starkova J. The effect of L-asparaginase on mTORC1 pathway in leukemic cells. 7th Symposium on Advances in Molecular Hematology, Olomoucké hematologické dny. Olomouc. ČR (2014)

Hermanova I, Valis K, Nuskova H, Fiser K, Trka J, Starkova J. L-asparaginase strongly affects bioenergetics in leukemic cells. 6th Symposium on Advances in Molecular Hematology, Olomoucké hematologické dny. Olomouc. ČR (2013)

Heřmanová I, Nůsková H, Vališ K, Fišer K, Trka J, Starková J. L-asparagináza ovlivňuje bioenergetiku leukemických buněk. Vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR (2013)

Hermanova I, Valis K, Fiser K, Nuskova H, Trka J, Starkova J. L-Asparaginase Strongly Affects Bioenergetics in Leukemic Cells. 54th ASH Annual Meeting, Atlanta, USA (2012)

Heřmanová I, Trka J, Starková J. Odlišné hladiny asparagin syntetázy nejsou zodpovědné za rozdílnou senzitivitu leukemických blastů k L-asparagináze. Vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR (2011)

Hermanova I, Trka J, Starkova J. Odlišné hladiny asparagin syntetázy nejsou zodpovědné za rozdílnou senzitivitu leukemických blastů k L-asparagináze. 3rd Symposium on Advances in Molecular Hematology, Olomoucké hematologické dny. Olomouc. ČR (2010)

Heřmanová I, Trka J, Starková J. Odlišné hladiny asparagin syntetázy nejsou zodpovědné za rozdílnou senzitivitu leukemických blastů k L-asparagináze. Výjezdní zasedání pracovní skupiny CLIP. Měříň, ČR (2010)

Heřmanová I, Trka J, Starková J. Odlišné hladiny asparagin syntetázy nejsou zodpovědné za rozdílnou senzitivitu leukemických blastů k L-asparagináze. 20. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky. Praha ČR. (2010)