

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



MUDr. Bc. Petr Staněk

Role fúzního proteinu ETV6-RUNX1 v citlivosti leukemických buněk na L-asparaginázu

The role of ETV6-RUNX1 fusion protein in the sensitivity of leukemic cells to L-asparaginase

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.12.2017

Petr Staněk

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Julii Starkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, poskytnutí cenných rad a zkušeností. Pracovišti Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR jsem vděčný za poskytnutí přístrojového vybavení a instruktáže k provedení metabolických experimentů. Děkuji také celému týmu z laboratoře molekulární biologie pracoviště CLIP za pomoc, ochotu a trpělivost. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině a přítelkyni za neocenitelnou podporu při mém studiu.

ABSTRAKT

Translokace t(12;21) s přítomností fúzního genu *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*) je nejčastější chromozomová aberace nacházená u akutní lymfoidní leukemie v dětském věku. Výskyt *ETV6-RUNX1* se pojí s výborným výhledem a vysokou citlivostí na léčbu enzymem L-asparaginázou (ASNázou), která deaminuje aminokyseliny glutamin a asparagin. Rezistence na toto léčivo zhoršuje prognózu a zvyšuje riziko selhání léčby, proto se pracovní skupina CLIP věnuje určení mechanismu účinku ASNázy a příčin vzniku rezistence. Tato práce na dřívější poznatky skupiny navazuje a věnuje se analýze významu fúzního proteinu a signalizačním a metabolickým změnám doprovázející posuny v citlivosti leukemických buněk na L-asparaginázu.

V první části práce se vytvořením posunu čtecího rámce ve fúzním genu pomocí systému CRISPR/Cas9 podařilo vytvořit knockoutní buněčné klony se stabilně zvýšenou rezistencí vůči ASNáze. Úspěšnou mutageneze a odstranění fúzního proteinu byla ověřena na úrovni DNA, mRNA a proteinu a analýzou SNP byla vyloučena přítomnost jiných závažných aberací ovlivňujících citlivost k chemoterapeutiku.

Ve druhé části práce jsem se zabýval pozorování signalizační reakce vyvolané přítomností ASNázy, zejména v souvislosti se signalizačním komplexem mTORC1, a dále odlišných aspektů této reakce mezi původními liniemi REH a klony postrádajícími fúzní protein ETV6-RUNX1. Kromě komplexu mTOR byly sledovány ukazatele autofagie a proteiny ovlivňující buněčný metabolismus.

V poslední části projektu byla věnována pozornost analýze metabolického profilu buněk v kontextu přítomnosti L-asparaginázy a exprese, či absence proteinu ETV6-RUNX1. S využitím přístroje Seahorse byla měřena spotřeba kyslíku, jež je ukazatelem aktivity dýchacího řetězce. Pomocí radioaktivně značených metabolitů byla pak určena intenzita mitochondriální oxidace mastných kyselin a vychytávání glukózy z média.

Výzkum prokázal změny v signalizační kaskádě mTORC1 v reakci na ASNázu. Nepřítomnost fúzního proteinu se projevila změnou signalizace proteinů ACC, Akt, mTOR a poklesem koncentrace autofagických proteinů Atg5 a Beclin1. Protein ETV6-RUNX1 dále ovlivňuje charakter metabolických změn vyvolaných ASNázou, což může být příčinou pozorované zvýšené chemorezistence těchto buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA:

leukémie, ETV6-RUNX1, TEL-AML1, L-asparagináza, rezistence, metabolismus, mTOR, CRISPR/Cas9

ABSTRACT

Translocation t(12;21) with the presence of the fusion gene ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) is the most common chromosomal aberration found in acute lymphoblastic leukemia in childhood. The occurrence of the ETV6-RUNX1 is associated with excellent prognosis and high sensitivity to the treatment with the enzyme L-asparaginase (ASNase). Resistance to the drug aggravates the outlook of the patient and increases the risk of treatment failure, therefore, the CLIP working group has been for a long time involved in the identification of the mechanism of action of ASNase and the origin of the resistance to it. This thesis follows previous findings of the group and is devoted to the analysis of the importance of ETV6-RUNX1 and signalization and metabolic changes accompanying shifts in the L-asparaginase resistance.

In the first part of the thesis, the knockout clones with stable increased resistance to ASNase have been established thanks to the CRISPR/Cas9 system, which created frameshift in the fusion gene. The accomplishment in this regard and removal of the fusion protein was confirmed on the level of DNA, mRNA and protein expression. The presence of other significant chromosomal aberrations affecting the sensitivity to ASNase was ruled out by the means of SNP analysis.

In the second part of the project, the signalization reaction to the treatment with L-asparaginase was observed, in particular with regards to the signalization complex mTORC1. The differences in the responses of original REH cell lines and obtained knockout mutants deficient in the fusion protein ETV6-RUNX1 was also tracked. Apart from the mTOR, autophagy markers and proteins affecting cellular metabolism were also detected.

In the last part of the investigation was paid close attention to the analysis of the metabolic profile of the cells in the context of the ASNase treatment and the presence or absence of the ETV6-RUNX1 protein. With the employment of the Seahorse analyzer, the oxygen consumption rate was measured, which is an indicator of the respiratory chain activity. Utilizing the radiolabelled metabolites, we were able to determine the intensity of the mitochondrial oxidation of fatty acids and glucose uptake from the media.

The research demonstrated an alteration in the mTORC1 signalization in response to the ASNase treatment. The absence of the fusion protein manifested itself in the changes of ACC, Akt and mTOR signalization and the autophagy markers Atg5 and Beclin1 concentration decrease. The fusion protein also influenced the character of the metabolic changes induced by the ASNase, which could explain the observed increased chemoresistance of the knockout cells.

KEYWORDS: leukemia, ETV6-RUNX1, L-asparaginase, resistance, metabolism, mTOR, CRISPR/Cas9

Obsah

ABSTRAKT	4
KLÍČOVÁ SLOVA:	4
ABSTRACT	5
KEY WORDS	5
1 ÚVOD	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 LEUKEMIE V DĚTSKÉM VĚKU	13
2.1.1 <i>Stratifikace akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku</i>	13
2.1.2 <i>Etiologie akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku</i>	14
2.1.3 <i>Terapie akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku</i>	14
2.2 L-ASPARAGINÁZA V TERAPII ALL	16
2.2.1 <i>Historie a základní charakteristika</i>	16
2.2.2 <i>Mechanismus účinku L-asparaginázy</i>	17
2.2.3 <i>Vznik rezistence vůči L-asparagináze</i>	18
2.2.4 <i>Další využití a perspektiva L-asparaginázy</i>	19
2.3 FÚZNÍ GEN RUNX1-ETV6	19
2.3.1 <i>RUNX1</i>	19
2.3.2 <i>ETV6</i>	20
2.3.3 <i>Role fúzního genu RUNX1-ETV6 v leukemogenezi</i>	21
2.4 NEOPLASTICKÝ METABOLISMUS A SIGNALIZACE U LEUKEMIE	23
2.4.1 <i>Glykolýza, Krebsův cyklus, Oxidativní fosforylace a Warburgův efekt</i>	23
2.4.2 <i>Oxidace mastných kyselin (FAO)</i>	24
2.4.3 <i>Role Glutaminu a Aspariginu</i>	26
2.4.4 <i>Amino acid sensing, mTORC1, mTORC2, GCN2</i>	28
2.4.5 <i>Autofagie</i>	31
3 CÍLE PRÁCE	33
4 METODY	34
4.1 BUNĚČNÉ KULTURY	34
4.1.1 <i>Použité buněčné linie</i>	34
4.1.2 <i>Kultivační médium</i>	34
4.1.3 <i>Pasážování buněk</i>	34
4.1.4 <i>Kryoprezervace</i>	35
4.1.5 <i>Rozmrazování buněk</i>	36

4.2	SEKVENOVÁNÍ SANGEROVOU METODOU	36
4.2.1	<i>Izolace DNA pomocí QIAmp DNA micro kitu</i>	36
4.2.2	<i>Amplifikace pomocí PCR a ověření pomocí elektroforézy</i>	37
4.2.3	<i>Sekvenace</i>	37
4.2.4	<i>Analýza</i>	37
4.3	qRT-PCR	37
4.3.1	<i>Izolace RNA</i>	37
4.3.2	<i>Reverzní transkripce</i>	38
4.3.3	<i>qRT-PCR</i>	38
4.4	VYTVOŘENÍ KNOCKOUTU FÚZNÍHO GENU ETV6/RUNX1 POMOCÍ CRISPR/CAS9 SYSTÉMU	39
4.5	WESTERN BLOT	40
4.5.1	<i>Příprava lyzačního pufru</i>	40
4.5.2	<i>Příprava lyzátu a určení koncentrace proteinů</i>	40
4.5.3	<i>Elektroforéza a blotting</i>	41
4.5.4	<i>Detekce</i>	42
4.6	SNP MICROARRAY ANALÝZA	43
4.7	URČENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY	43
4.8	AGILENT SEAHORSE XF (EXTRACELLULAR FLUX) ANALÝZA	44
4.8.1	<i>Příprava buněk a média na experiment</i>	45
4.8.2	<i>Protokol experimentu monitorujícího aktivitu oxidativní fosforylace</i>	45
4.8.3	<i>Protokol Experimentu určení glykolytické aktivity buněk</i>	46
4.8.4	<i>Typický vzhled uspořádání destičky pro průběh experimentu</i>	46
4.9	URČENÍ INTENZITY OXIDACE MASTNÝ KYSELIN	47
4.9.1	<i>Příprava buněk</i>	47
4.9.2	<i>Preinkubace a příprava kolon</i>	47
4.9.3	<i>Radioaktivní esej, měření a vyhodnocení</i>	47
4.10	URČENÍ VYCHYTÁVÁNÍ GLUKÓZY DO BUNĚK	49
5	VÝSLEDKY	50
5.1	OVĚŘENÍ VÝSLEDKŮ CRISPR/CAS9 MUTAGENEZE	50
5.1.1	<i>DNA sekvenace</i>	50
5.1.2	<i>Hladiny mRNA – Nonsense-mediated decay</i>	51
5.1.3	<i>Western blot</i>	52
5.2	CYTOTOXICKÁ MTS ESEJ A BUNĚČNÁ PROLIFERACE	52
5.2.1	<i>Buněčná proliferace</i>	52
5.2.2	<i>Senzitivita na chemoterapeutikum L-asparaginázu</i>	53
5.3	SNP ANALÝZA	56
5.3.1	<i>Genetická identita linií REH a AT-2</i>	56

5.3.2	<i>Genomické změny v mutantních liniích</i>	56
5.4	BUNĚČNÁ SIGNALIZACE.....	57
5.4.1	<i>Vliv treatmentu na signalizaci a hladiny proteinů</i>	58
5.4.2	<i>Vliv knockoutu fúzního genu na buněčnou signalizaci</i>	60
5.5	METABOLICKÝ PROFIL BUNĚK.....	62
5.5.1	<i>Seahorse</i>	62
5.5.2	<i>Oxidace mastných kyselin</i>	63
5.5.3	<i>Vychytávání glukózy z média</i>	64
6	DISKUSE	66
6.1	VYTVOŘENÍ KNOCKOUTU FÚZNÍ GENU ETV6/RUNX1 A OVĚŘENÍ ZÍSKANÝCH KLONŮ.....	66
6.2	CYTOTOXICKÁ MTS ESEJ A BUNĚČNÁ PROLIFERACE	66
6.3	SNP MICROARRAY.....	67
6.4	BUNĚČNÁ SIGNALIZACE.....	68
6.4.1	<i>Buněčná odpověď na L-asparaginázu</i>	69
6.4.2	<i>Signalizační změny v odpovědi na ztrátu fúzního genu ETV6/RUNX1</i>	71
6.4.3	<i>Aplikace zjištění na buněčný fenotyp</i>	72
6.5	METABOLICKÁ AKTIVITA	73
6.5.1	<i>Seahorse</i>	73
6.5.2	<i>FAO</i>	74
6.5.3	<i>Utilizace glukózy</i>	74
7	SOUHRN	75
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

Seznam zkratek:

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
ASNáza	L-asparagináza
ASNS	asparagin syntetáza
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
AML	akutní lymfoblastická leukemie
CLL	chronická lymfoblastická leukemie
CML	chronická lymfoblastická leukemie
mTOR	mammalian target of rapamycin
ETV6	translocation-Ets-leukemia virus
TEL	translocated ETS leukemia
AML1	acute myeloid leukemia 1
RUNX1	runt-related transcription factor 1
MYC	myelocytomatosis
E.coli	Escherichia Coli
CBFbeta	core-binding factor beta
NMTS	nuclear matrix targeting signal
HSC	hematopoetic stem cells
P300	p300 histon acetyltransferáza
PRMT1	protein arginin metyltransferáza
HDACs	histon deacetylázy
HLH	helix-loop-helix
PI3K	fosfoinositid 3-kináza
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ROS	reactive oxygen species
G6PDH	glukóza-6fosfodehydrogenáza
6PGLDH	6-fosfoglukonolakton dehydrogenáza
PPP	pentózofosfátový cyklus
ME1	malic enyzme
LOA	loss of attachment

CPT1	karnitin-palmytoyl transferáza
FA	mastné kyseliny
FAO	oxidace mastných kyselin
FAS	syntéza mastných kyselin
GLS	glutamináza
GLUD	glutamát dehydrogenáza
mTORC1	mTOR komplex 1
mTORC2	mTOR komplex 2
GCN2	general control nonderepressible 2
AMPK	AMP- dependentní kinázy
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
mLST8	mammalian Lethal with SEC13 protein 8
TSC1	tuberous sclerosis complex 1
TSC2	tuberous sclerosis complex 2
ATF4	activating transcription factor 4
LC3	(MAP1LC3B - Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B)
NHEJ	non-homologous end joining
PARP	poly(ADP-ribóza) polymeráza
CAD	karbamoylfosfát syntetáza 2, aspartát transkarbamyláza, a dihydroorotáza
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
SNP	single nucleotide polymorphism
OCR	oxygen consumption rate
ECAR	extracellular acidification rate

1 ÚVOD

Leukemie je nejčastějším onkologickým onemocněním v dětském věku (Ward et al., 2014) a zároveň druhou nejčastější příčinou úmrtí v dětském věku ve vyspělých zemích po traumatických příhodách. Z této skupiny nemocí zaujímá přibližně 80% jednotka akutní lymfoblastická leukemie (ALL), které se v ČR registruje ročně okolo 60 nových případů (Zdráhalová et al., 2015). ALL se dále dělí dle imunofenotypu leukemických buněk na T-buněčnou a B-buněčnou, která představuje přibližně 80-90% výskytu ALL (Pui et al., 2012). V léčbě ALL byl během posledních desetiletí učiněn obrovský pokrok a kompletní remise je nyní během indukční terapie docíleno přibližně u 95% pacientů léčených dle standardizovaných protokolů, přičemž 85% pacientů dosahuje pětiletého přežití (Cooper and Brown, 2015; Pui et al., 2012; Starý, 2010). I přes tato pozitiva dochází u 15-20% pacientů k relapsu leukemie (Cooper and Brown, 2015).

ASNáza je nedílnou součástí moderních léčebných protokolů dětské ALL s dlouhou historií praktického užití a je součástí i aktuálně směrodatného protokolu léčby AIEOP-BFM ALL 2009. Intravenózně podaný enzym způsobuje depleci asparaginu a glutaminu jejich deaminací, což má za následek snížení proliferační aktivity a zvýšení incidence apoptózy leukemických buněk (Broome, 1963; Ohnuma et al., 1970). Přes vysoký přínos se i tato léčba potýká s komplikacemi, které kromě vedlejších účinků zahrnují především vznik rezistence.

Předchozí práce pracovní skupiny CLIP na 2.LF UK naznačují, že změny v aktivitě komplexu mTORC1 (mechanical target of rapamycin complex 1) a metabolismu leukemických buněk mohou hrát roli v mechanismu vzniku rezistence. Nedostupnost klíčových aminokyselin glutaminu a asparaginu mTOR (mechanical target of rapamycin) dráhu inhibuje a modifikuje metabolismus buňky (Laplante and Sabatini, 2012). Inhibice zvýšení oxidacemastných kyselin (FA) spolu s podáním ASNázy navodila synergický efekt, zvýšilo citlivost k chemoterapeutiku stejně jako konstitutivní aktivace mTOR signalizační dráhy (Hermanova et al., 2016).

V této práci jsem se zaměřil na skupinu ALL pacientů s ETV6-RUNX1, t(12;21) fúzním genem. Tito pacienti tvoří 20-24% dětských případů ALL s velmi dobrou prognózou a odpovědí na současnou terapii (Krejci et al., 2004; Stams et al., 2003). Role ETV6-RUNX1 v leukemogenezi nebyla dosud jasně popsána a existuje mnoho kontroverzí v literatuře. Rozhodli jsme se proto pro úplné umlčení genu pomocí CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) technologie. Tento přístup nám pomohl odstranit rozdíly způsobené pouze částečným snížením exprese ETV6-RUNX1 v dosavadních modelech a pomohl lépe charakterizovat vlastnosti leukemických buněk s touto translokací.

Translokace t(12;21) je asociována s lepší prognózou a vyniká svou citlivostí vůči léčbě ASNázou, která však nesouvisí s hladinou exprese ASNS (Hermanova et al., 2012; Krejci et al., 2004). Tato práce se zaměřuje na souvislost mezi fúzním genem ETV6-RUNX1 a citlivostí na terapii ASNázou a popis specifických vlastností leukemických buněk s touto translokací. Pochopení důvodu citlivosti může významně přispět k objasnění mechanismu cytotoxického působení ASNázy i vzniku rezistence na toto terapeutikum a potenciálně nastítnit cesty k překonání této rezistence pomocí kombinace více chemoterapeutik.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 LEUKEMIE V DĚTSKÉM VĚKU

Leukemie jsou skupinou neoplastických proliferativních onemocnění pocházejících z hematopoetických buněk kostní dřeně. Buňky prošlé maligním zvratem si udržují schopnost neomezeného dělení, naopak do různé míry ztrácí schopnost diferenciaci.

Dle průběhu můžeme leukemie dělit na chronické s klinicky pomalejším průběhem a akutní, jež mají bez léčby rychle fatální následky. Další klasifikace vychází z toho, zda nádorová transformace vychází z myeloidní, či lymfoidní řady hematopoézy. V klinické praxi se onemocnění zařadí pomocí určení exprese molekulárních markerů těchto řad v leukemickém klonu. Kombinací těchto klasifikací pak vzniká základní cytopatologické dělení na chronickou myeloidní leukemii (CML), chronickou lymfoblastickou leukemii (CLL), akutní myeloidní leukemii (AML) a akutní lymfoblastickou leukemii (ALL) (Povýšil, 2007).

Chronické leukemie jsou onemocněními téměř výhradně dospělého až pozdního věku. AML postihuje všechny věkové kategorie a zodpovídá za přibližně 20 % dětských leukemií. ALL je typickým onemocněním dětského věku s maximem výskytu mezi 2 a 4 rokem života. ALL je zároveň také nečastější dětskou malignitou, zahrnující přibližně 80% z výskytu leukemií, 26% z celkového objemu neoplázií u dětí do věku 14-ti let a 56% případů leukemií u adolescentů (Ward et al., 2014).

2.1.1 Stratifikace akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku

Akutní lymfoblastickou leukemii dělíme na T-buněčnou a B-buněčnou, podle linie se kterou sdílí molekulární znaky. B-buněčná ALL představuje převládajících 85 % těchto onemocnění, leukemie z prekursorů T a NK buněk zbylých 15 %. Stratifikace akutní B lymfoblastické leukemie se zakládá především na profilování chromozomálních a genových alterací. Podle nomenklatury WHO z roku 2008 se B-ALL dělí do 7 geneticky charakterizovaných skupin a jedné zahrnující ostatní genetické změny (Bhojwani et al., 2015).

Nejčastějšími změnami v genetickém materiálu B buněčné ALL je hyperploidie (>55 chromozomů) a translokace t(1;19)(q23;p13) za vzniku fúzního genu ETV6-RUNX1 (také TEL-AML1). Tyto skupiny tvoří 40-50 % onemocnění a jsou spojeny s dobrou prognózou.

Hypoploidní leukemie a přestavby s fúzním genem BCR-ABL1 značí většinou horší prognózu. Tato stratifikace má význam nejen systematický a cytopatologický, ale i klinický a zařazení do skupiny má často důležitý vliv na volbu terapie (Inaba et al., 2013; Tasian et al., 2015).

2.1.2 Etiologie akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku

Přesná patogeneze ALL v dětském věku stále není určena, méně než 5 % onemocnění je asociované s dědičnou predispozicí (např. Downův syndrom, Bloomův syndrom, ataxia-telangiectasia a Li-Fraumeni syndrom). Jako velmi pravděpodobný se jeví model zahrnující prenatalní původ preleukemického klonu s jeho následnou klonální expanzí a nutnost několika zásahů do genomu pro spuštění nekontrolované proliferace. Tento model podporuje rozložení výskytu ALL v populaci zejména brzy po narození. V pupečnickové krvi odebrané novorozencům byl zjištěn výskyt lymfoblastů s přítomností ETV6-RUNX1 až u 1% novorozenců, naprostá většina z nich však nikdy nevyvine leukémii (Mori et al., 2002; Zuna et al., 2011). Také studie na monozygotických dvojčatech s výskytem ALL provedené Alpar et al. v roce 2015 silně naznačují prenatalní původ preleukemického klonu a patogenezi na základě klonální expanze alterované buňky. Nejčastěji postižené geny zahrnují regulátory hematopoézy a diferenciaci (např. RUNX1, ETV6), protoonkogeny (např. MYC) a tyrosin kinázy (např. ABL1) (Inaba et al., 2013).

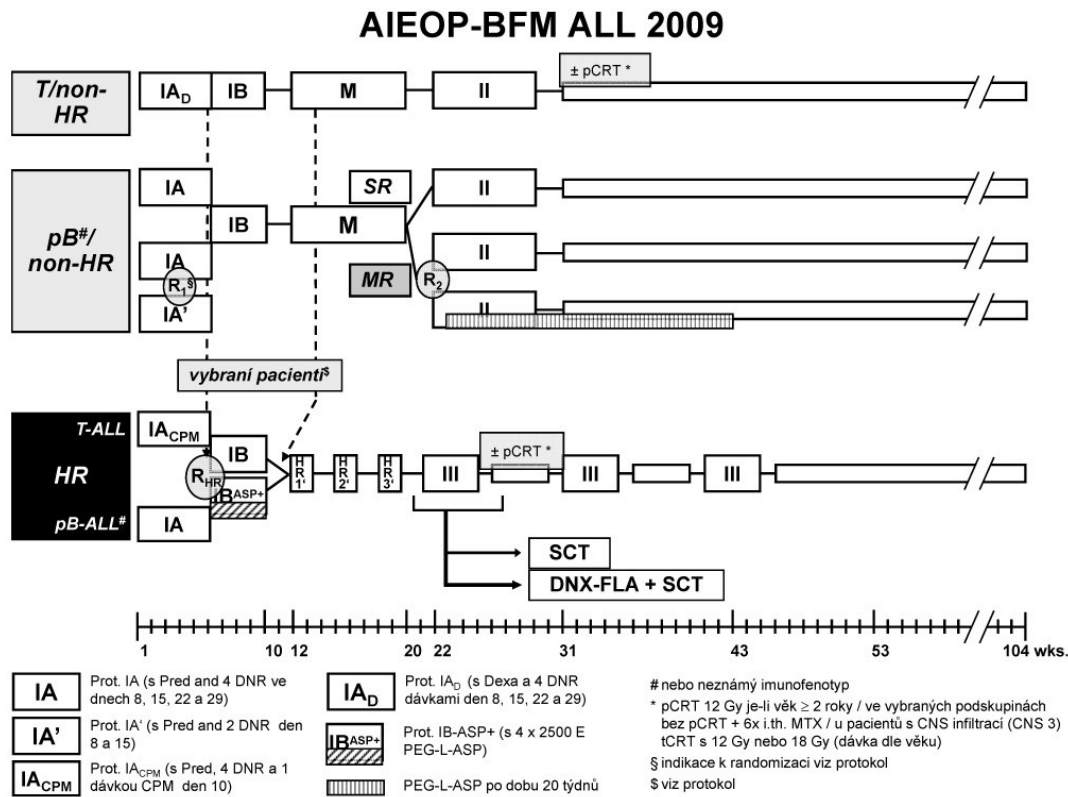
Mnohé z těchto změn však sami o sobě nevyvolávají v experimentálních modelech monoklonální proliferaci a hrubé chromozomální defekty nemusí být vždy přítomné. Microarray profilování alterací DNA typu změny počtu kopií (delece a amplifikace) a sekvenování vedlo k objevu několika nových genetických alterací které definují nové subtypy choroby, pomáhají objasnit leukemogenezi a predikovat citlivost na léčbu. (Inaba et al., 2013).

Na predisponující mutaci nasedá reakce na infekci jako silný spouštěč další proliferace a tvorby preleukemických a případně leukemických subklonů. Teorie aberantní imunitní reakce v terénu predisponující mutace rovněž elegantně vysvětluje výskyt leukemie v ohniscích při styku naivní populace s neznámým patogenem. Obdobná Gravesova hypotéza se pokouší vysvětlit trend zvyšujícího se výskytu leukemie ve vyspělých zemích změnou vzorce setkávání se s přirozenými patogeny v dětství a je paralelou k hygienické teorii vysvětlující nárůst incidence alergií (Wiemels, 2012).

2.1.3 Terapie akutní lymfoblastické leukemie v dětském věku

Klasická forma terapie ALL v dětském věku zahrnuje 3-4 fáze: indukci, konsolidaci (intenzifikaci), reindukci (není zahrnuta ve všech případech) a udržovací terapii. Jako prevence infiltrace centrální nervové soustavy pak bývá často použita intrathékální aplikace metotrexátu. Důležitou je i stratifikace na pacienty s normálním a vysokým rizikem relapsu onemocnění. V současné době v ČR probíhá léčba dle protokolu léčebné studie AIEOP-BFM ALL 2009, který pro stratifikaci využívá hodnocení odpovědi na léčbu po indukční terapii, přičemž kritériem je zbytkový počet blastů přítomných v periferní krvi a kostní dřeni (Starý, 2010; University of Schleswig-Holstein, 2010). V protokolu AIEOP-BFM ALL 2017, připravovaném na rok 2018

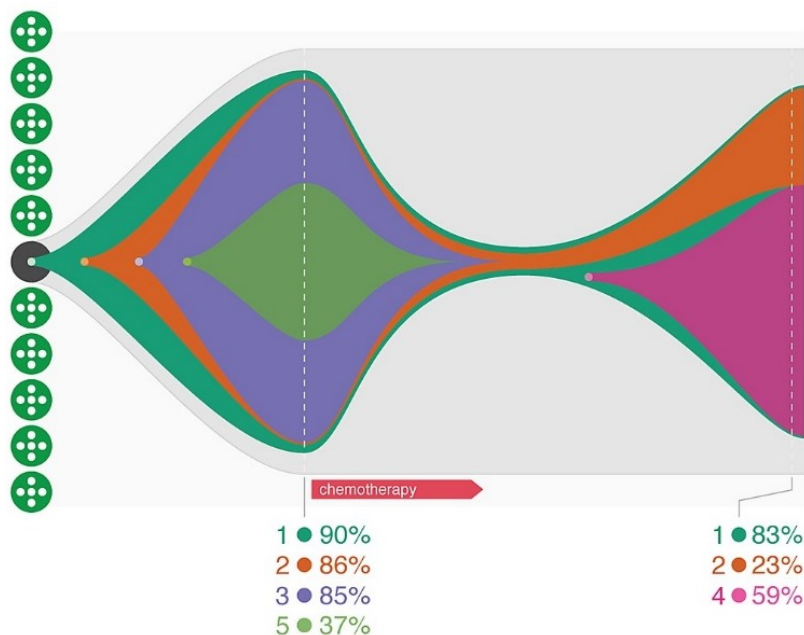
bude již ke stratifikaci využívána i genetická analýza leukemického klonu, přičemž nejlepší prognóza je spojována s přítomností fúzního genu ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), či výrazné hyperploidie nad 50 chromozomů (prof. Starý, 2017).



Obr. 1.1: Aktuálně užívaný léčebný protokol dětské ALL, AIEOP-BFM ALL 2009.

Neužívanějšími léky v terapii ALL jsou: kortikoidy (prednison, či dexametazon), vikristin, antracyklinová cytostatika (daunorubicin, či doxorubicin), L-asparagináza, cytosin arabinosid, metotrexát a merkaptopurin. Primární remise je dosaženo až u 99 % pacientů, avšak v 15-20 % nastává relaps onemocnění s podstatně horší prognózou, na který je třeba reagovat jinou strategií terapie. V případě časného relapsu (do 6 měsíců od primární remise) terapie často směřuje k transplantaci kostní dřeně. Vysoce agresivní terapie (obzvláště v případě relapsu) provází poměrně vysoký výskyt závažných komplikací s až 5% celkovou mortalitou na následky léčby (Starý, 2010).

Z těchto důvodů je třeba zabývat se mechanismy vzniku rezistence na léčbu a následného relapsu. Během vzniku leukemie dochází opakovaně ke vzniku náhodných mutací během rapidní proliferace a následně po odeznění stimulu imunitního systému k selekci klonů s nejlepším přežitím, přičemž onemocnění zůstává přes dominanci jednoho genotypu geneticky různorodé. Tato heterogenita leukemických blastů je zřejmě podkladem vzniku rezistence na léčbu s následným relapsem onemocnění skrze prostou selekci odolných klonů. (Kuster et al., 2011; Oshima et al., 2016; Schuh et al., 2012; Yang et al., 2008)



Obr. 1.2: Znázornění teorie klonální selekce popisující vznik subklonů maligního onemocnění vyznačujících se například vyšší rezistencí k terapii, či schopností zakládat vzdálené metastázy. Zleva doprava je znázorněn časový průběh, na vertikální ose je pak přibližena změna zastoupení jednotlivých subklonů v celkové buněčné populaci onemocnění. Po zahájení stresového podnětu (v tomto případě chemoterapie, znázorněno červenou šipkou) dochází k přechodnému vymírání, selekci a převládnutí rezistentních klonů. Kombinované terapie je jednou z cest k minimalizaci tohoto procesu. Převzato a upraveno z (Miller et al., 2014).

2.2 L-ASPARAGINÁZA V TERAPII ALL

Díky zavedení L-asparaginázy do multichemoterapeutického přístupu se podařilo zvýšit kurabilitu dětské ALL v devadesátých letech až na 70% (Ettinger et al., 1997). Dnes je již přes 30 let používána k protinádorové terapii a neoddělitelně patří do indukční terapie dětské ALL dle protokolu AIEOP-BFM ALL 2009.

2.2.1 Historie a základní charakteristika

První zmínka o terapeutických vlastnostech L-ASNázy pochází z roku 1953, kdy Dr. Kidd objevil inhibující působení séra morčat na růst lymfomů implantovaných do myši a sérem navozenou regresi implantované malignity. V roce 1963 (Broome, 1963) prokázal, že tato protinádorová aktivita je podmíněna přítomností enzymu L-asparaginázy. Následujícího roku se podařilo izolovat aktivní enzym z *Escherichia coli* (*E. coli*), což umožnilo použití enzymu v klinických studiích a později v terapeutické praxi (Pession et al., 2005).

Biochemicky se jedná o enzym katalyzující odštěpení aminoskupiny z aminokyselin asparaginu a glutaminu za vzniku aspartátu, resp. glutamátu, a amoniaku. Aktivní místo je v závislosti na zdroji a typu izoenzymu do různé míry preferenčně selektivní pro asparagin. Katalytická aktivita štěpení glutaminu dosahuje 3-9% rychlosti štěpení asparaginu (Miller and Balis, 1969).

Vedlejším účinkem podání ASNázy jsou především vznik imunopatologické reakce, včetně tzv. tiché inaktivace protilátkami IgG, neurotoxicita, hepatotoxicita, kardiotoxicita, vznik akutní pankreatitidy, suprese hematopoézy, dyslipidémie, hypoproteinémie a tromboembolické příhody (Oettgen et al., 1970). Relativně vysoké množství komplikací léčby ASNázy je přisuzováno degradaci plasmatického glutaminu jako významného přenašeče aminoskupiny v těle sekundární glutaminázovou aktivitou enzymu. Pokusy snažící se odstranit zdánlivě redundantní glutaminázovou aktivitu L-asparaginázy se však setkaly s nečekanými komplikacemi (viz níže).

2.2.2 Mechanismus účinku L-asparaginázy

Podání terapeutické dávky ASNázy vyvolává prudký pokles plasmatického asparaginu. Enzym je v plasmě detekovatelný do 13-22 dne po vpravení (platí pro nekonjugovanou formu) a hladina asparaginu v krvi se vrací k normálním hodnotám 22-33 den po podání (Ohnuma et al., 1970).

Eagle roku 1956 a 1959 popsal zajímavou metabolickou odlišnost komplexního živočišného organismu od buněčné linie. Růst imortalizovaných linií vyžaduje přítomnost minimálně 13 základních aminokyselin v médiu. Naproti tomu pro lidský organismus jako celek je nutný přísun pouze 8 esenciálních aminokyselin. Žádná z těchto 13 aminokyselin nemůže být nahrazena zvýšenou koncentrací jiné aminokyseliny v médiu. 5 neesenciálních aminokyselin nutných pro přežití kultur zahrnujících arginin, cystein, tyrosin, histidin a glutamin tedy není produkováno na úrovni každé buňky, ale spíše na úrovni specializovaných buněk organismu a následně distribuováno. Dále byla pozorována zvýšená potřeba asparaginu některými malignitami, včetně leukemií (Ohnuma et al., 1971).

Přes nižší rychlost syntézy nukleotidů jsou leukemické blasty schopny přežít i v médiu bez asparaginu. Nedostatek glutaminu se jim však stává fatální (Ohnuma et al., 1971). I přes výjimky (Chan et al., 2014) většina autorů popisuje glutaminázovou aktivitu L-asparaginázy jako nezbytnou pro její chemoterapeutické působení a značně modifikující celkový efekt léčiva (Offman et al., 2011; Parmentier et al., 2015; Reinert et al., 2006). Sugimoto et al. v článku z roku 2015 dokonce popisuje cytotoxické působení ASNázy na lymfocyty jako přímé využití jejich fenotypické závislosti na glutaminu, po jehož odepření společně s asparaginem nejsou schopny proliferovat. ASNáza by tedy v tomto případě měla útočit na tzv. „glutamine addiction“. Cytotoxické působení L-asparaginázy proto nemůžeme vysvětlit prostou deplecí asparaginu a následnou nutriční restrikcí proteosyntézy leukemických buněk. Definitivně mechanismus účinku prozatím vysvětlen, ale zřejmě zahrnuje mimo vyvolání nutričního stresu i signalizaci mTOR a GCN2 (general control nonderepressible 2) drahami a komplexní metabolické změny na úrovni buňky (Reinert et al., 2006), jak je popsáno níže. –

2.2.3 Vznik rezistence vůči L-asparagináze

Mechanismus rezistence vůči léčbě ASNázou zůstává nedořešen. Původní hypotéza spočívá ve zvýšení exprese asparagin syntetázy (ASNS), která je zodpovědná za endogenní syntézu Asn (Richards and Kilberg, 2006). Experimentální výsledky však nepotvrdily roli tohoto enzymu (Hermanova et al., 2012; Krejci et al., 2004; Stams et al., 2003, 2005). I hypotéza zvýšené syntézy asparaginu mezenchymálními buňkami byla výrazně zpochybněna (Tong et al., 2013).

2.2.3.1 *Asparagin syntetáza (ASNS)*

Původní hypotéza vzniku rezistence spočívá ve zvýšení exprese enzymu ASNS, která je zodpovědná za endogenní syntézu asparaginu (Richards and Kilberg, 2006). Aktivita ASNS je v leukemických blastech nižší, než u fyziologických lymfocytů. Experimentálně však nebyla prokázána korelace mezi zvýšenou expresí genu pro ASNS a rezistencí k léčbě ASNázou, naopak byla nalezena paradoxně zvýšená exprese genu pro ASNS u ALL s přítomností hybridního genu ETV6-RUNX1 (translokace t(12;21), 20-24% dětských případů ALL), které vykazují vůči terapii ASNázou vysokou citlivost (Krejci et al., 2004; Stams et al., 2003, 2005). Ačkoliv se leukemické blasty jednotlivých pacientů skutečně liší v expresi ASNS, tato exprese je všeobecně velmi nízká a nespojuje se s mírou citlivosti k léčbě ASNázou (Hermanova et al., 2012).

2.2.3.2 *Mesenchymální syntéza asparaginu*

Jiným uvažovaným mechanismem vzniku rezistence byla indukce syntézy zvýšeného množství asparaginu a glutaminu mesenchymálními buňkami kostní dřeně, a tím vytvoření prostředí chránícího leukemické buňky před účinky ASNázy (Iwamoto et al., 2007). Analýza koncentrace asparaginu v kostní dřeni během terapie ASNázou však významné rozdíly mezi koncentrací asparaginu v kostní dřeni a krvi neprokázala (Tong et al., 2013).

2.2.3.3 *Adaptace pomocí mTOR dráhy*

Předchozí práce pracovní skupiny CLIP na 2.LF UK naznačují, že v mechanismu vzniku rezistence mohou hrát roli změny v aktivitě komplexu mTORC1 a metabolismu leukemických buněk. mTOR signální dráha pozitivně ovlivňuje anabolismus, glykolýzu a přežití buněk, a inhibuje autofagii a oxidaci mastných kyselin (FAO). Nedostupnost klíčových aminokyselin glutaminu a asparaginu mTOR dráhu inhibuje. Pomocí mTOR signalizace se buňka mj. adaptuje na nedostatek živin (Laplanche and Sabatini, 2012). U leukemických blastů byla po inkubaci s ASNázou prokázána zvýšená aktivita oxidace mastných kyselin (FA), spotřeba kyslíku a autofagie a snížené vychytávání glukózy. Naopak, aktivita signální dráhy mTORC1 se snížila. Synergický efekt inhibice oxidace FA s podáním ASNázy zvýšil citlivost buněk k léčbě stejně jako i konstitutivní aktivace mTOR signální dráhy (Hermanova et al., 2016). mTOR může být také značně ovlivněna signální dráhou GNC2-ATF4 (viz kap. 2.4.4.2 GCN2 – ATF4 dráha, str. 30)

2.2.3.4 *Autofagie jako záchranný mechanismus pro leukemické blasty*

Publikace Takahashi et al. z let 2015 a 2017 popisují autofagii jako záchranný mechanismus leukemických buněk při léčbě asparaginázou a to odstraněním nefunkčních mitochondrií poškozených metabolickým rozvratem popsáným po aplikaci asparaginázi. Existují však i publikace popisující cytotoxickou autofagii v reakci na inhibici signalizace mTORC1 (Szlosarek, 2014). Autofagie představuje dvousečný aspekt onkogeneze a chemorezistence a je značně kontext-dependentní (Evangelisti et al., 2015).

2.2.4 Další využití a perspektiva L-asparaginázy

Efektivita léčby ASNázou je uznávána v rámci léčby leukémií, především ALL. V dnešní době se enzym stává také součástí protokolů léčby non-Hoghkinských lymfomů, ALL v dospělém věku a např. i MRC (Medical research council) protokolu léčby AML. Solidní nádory jsou na tento typ terapie většinou rezistentní (Clarkson et al., 1970; Tallal et al., 1970). Perspektiva použití chemoterapeutika v léčbě karcinomu ovarií byla bohužel omezena zastavením klinické studie ve 2. fázi pro vysokou toxicitu (Hays et al., 2013). In vitro se jeví jako nadějná aplikace pro terapii karcinomů jater, žaludku a pankreatu (Covini et al., 2012).

2.3 FÚZNÍ GEN RUNX1-ETV6

Geny RUNX1 i ETV6 se účastní regulace myelo – a lymfogeneze, proliferace zárodečných buněk hematopoetického systému a mnoha leukemogenních přestaveb. Translokace t(12;21) ústící ve vznik fúzního genu RUNX1-ETV6 (dříve také TEL-AML1) je nejčastější přestavbou přítomnou u ALL dětského věku a je spojena s výbornou prognózou (Shurtleff et al., 1995).

2.3.1 RUNX1

RUNX1, také známý jako AML1, je transkripční faktor z rodiny RUNX (Runt-related transcription factor), jejíž znakem je homologie se segmentem genu *runt* přítomným u *Drosophily*. Runt doména proteinu zprostředkovává vazbu na DNA a interakci s jeho heterodimerizačním partnerem CBF β (core-binding factor beta). Heterodimerizace významně zesiluje vazbu na DNA a je podmínkou pro správnou funkci transkripčního faktoru. Další významnou součástí proteinu je NMTS (nuclear matrix targeting signal), jež napomáhá vazbě na DNA a VWRPY motiv společný všem proteinů Runt rodiny. Mezi geny podléhající regulaci RUNX1 patří mj. významné regulátory hematopoézy jako např. IL-3, GM-CSF, M-CSF receptor, c-Mpl a řada SRC kináz (Lam and Zhang, 2012).

Dvojitý knockout genu v myším modelu způsobil fatální defekty během embryogeneze, a to ve vaskulogenezi a definitivní hematopoézy. Bylo prokázáno, že RUNX1 hraje klíčovou roli při odvozování HSC (hematopoetický kmenových buněk, hematopoetic stem cells)

z hematogenního endotelu, avšak po ustanovení diferenciačních řad kmenových buněk již není RUNX1 pro krvetvorbu bezpodmínečně nutný (Chen et al., 2009). U myši haploinsuficientních pro RUNX1 byla zjištěna zvýšená proliferační aktivita HSC, ale naopak nižší počet dlouhodobě fungujících HSC. Navzdory zvýšení počtu jsou tyto kmenové buňky funkčně méněcenné a neschopné kompetice s wild type HSC (Growney et al., 2005). Mutace RUNX1 jsou poměrně časnou genetickou aberací provázející leukemie a myeloproliferativní syndromy. Otázkou zůstává, zda je pro vznik neregulované myeloproliferace nutná bíaleická mutace genu, nebo hraje roli dominantně negativní efekt mutované alely (Lam and Zhang, 2012).

RUNX1 byl původně popisován jako faktor aktivující transkripci cílových genů, pozdější poznatky však ukázaly, že závisí na kontextu této signalizace a RUNX1 může působit i jako transkripční represor. Směr modifikace úrovně exprese jednotlivých regulovaných genů závisí na bilanci koaktivátorů a korepresorů s ním spolupracujících. Mezi aktivátory rekrutovatelné proteinem RUNX1 patří p300 histon acetyltransferáza a protein arginin methyltransferáza (PRMT1), které způsobují jak změny struktury chromatinu, tak postranslační modifikace samotného RUNX1. Mezi rekrutované represory řadíme PRMT6, PRMT4 a histon deacetylázy (HDACs), taktéž se schopností modifikovat oba proteiny (Brettingham-Moore et al., 2015).

2.3.2 ETV6

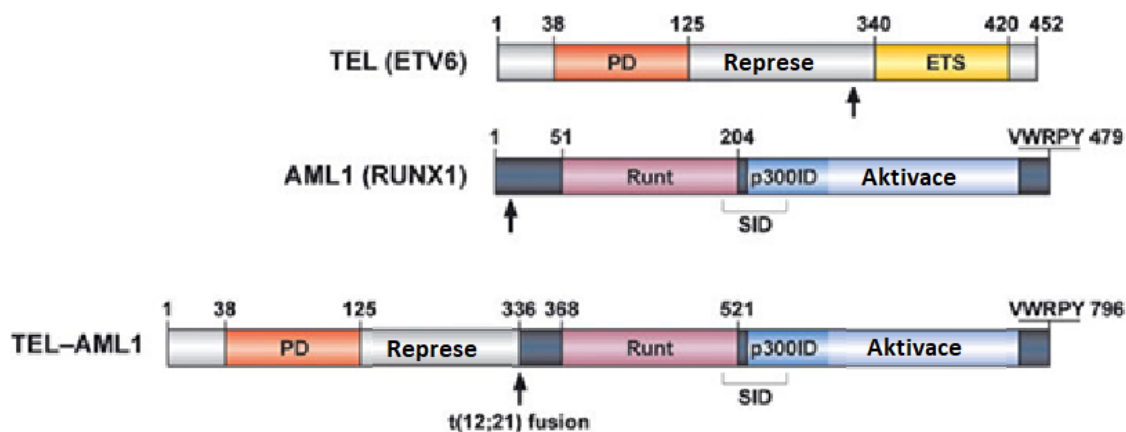
Translokace zahrnují gen ETV6 jsou jedněmi z nejčastějších chromozomových aberací provázejících lidské leukemie. Bylo popsáno již 48 různých translokací zahrnujících tento gen, přičemž 30 z nich bylo charakterizováno i na molekulární úrovni.

Gen patří do rodiny ETS transkripčních faktorů známými regulací buněčného cyklu a diferenciace a účastí na kancerogenezi. Gen měří přibližně 250 kbp a skládá se z 8 exonů a 3 hlavních domén. HLH (helix-loop-helix) doména slouží k homooligomerizaci, vnitřní doména tvořena především exonem 5 odděluje tuto doménu od domény ETS, která slouží k sekvencně specifické vazbě DNA a meziproteinové interakci. ETV6 působí jako silný transkripční represor, represorová funkce je zprostředkována především jeho HLH a vnitřní doménou. Represe HLH doménou je mediována interakcí s L3MBTL1, mechanismem nezávislým na histon deacetyláze. Represe vnitřní doménou je zprostředkována interakcí s korepresory, jako například N-Cor, mSin3 a SMRT rekrutujícími histon deacetylázy (De Braekeleer et al., 2012).

ETV6 zaujímá významné postavení v embryogenezi a hematopoézy. Klíčový je funkční gen pro udržování populace kmenových buněk v kostní dřeni. Exprese ETV6 v RAS-transformovaných buňkách významně zpomalila jejich růst a zabránila invazi do okolí, což naznačuje roli genu jako tumor supresoru (Fenrick et al., 2000).

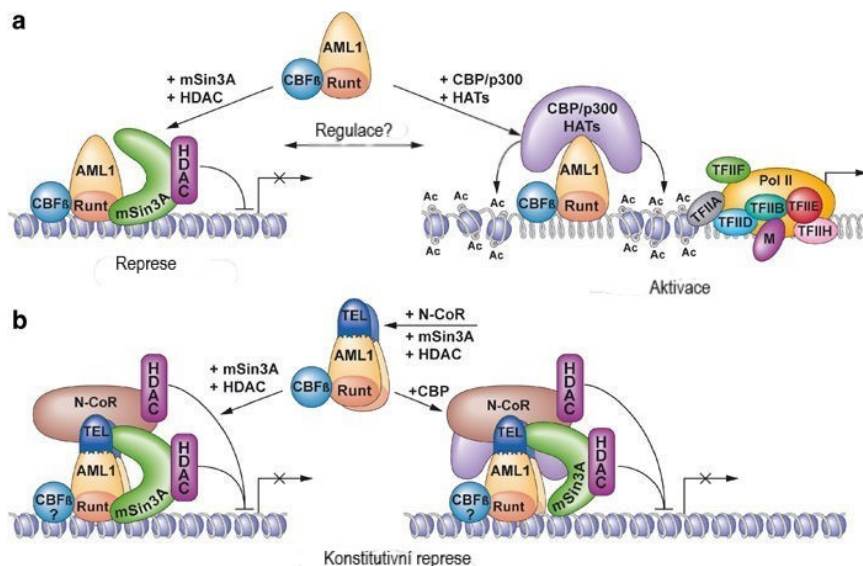
2.3.3 Role fúzního genu RUNX1-ETV6 v leukemogenezi

Translokace t(12;21) se vznikem fúzního genu RUNX1-ETV6 ústí ve vznik in-frame fúze 5' oblasti genu TEL (ETV6) s téměř celým genem (RUNX1) nesoucím všechny jeho známé funkční oblasti, včetně runt-homologní domény viz obr. 1.3.



Obr. 1.3: Schématické vyjádření proteinu ETV6, RUNX1 a fúzního proteinu ETV6-RUNX1. V proteinu RUNX1 jsou znázorněny domény Runt, SID (mSin3A interaction domain), oblasti interagující s p300 HAT a zodpovídající za transkripční aktivaci, a dále C-terminální motiv VWRPY vážící Groucho-related korepresory. V proteinu TEL jsou zaznamenány HLH doména zodpovídající za dimerizaci (HLH), vnitřní doména spojovaná s represí transkripce (Represe) a doména ETS. Šipky označují místa fúze proteinů díky translokaci t(12;21). Číselně jsou označeny aminokyseliny ohraničující důležité domény a první metionin. Převzato a upraveno z (Zelent et al., 2004).

Tato doména zprostředkovává vazbu fúzního transkripčního faktoru na cíle RUNX1, zatímco zbytková část ETV6 konstitutivně reprimuje tyto geny nejpravděpodobněji pomocí rekrutace korepresoru nukleárního receptoru (N-CoR)/histon deacetylázy (HDAC) a mSin3A/HDAC komplexů. Důležitá pro funkci fúzního genu se ukazuje též dimerizační doména ETV6. Jako hlavní molekulární mechanismus onkogenní funkce RUNX1-ETV6 byla navržena změna kontextuálně variabilní signalizace proteinu RUNX1 na konstitutivně represivní signalizaci fúzního genu (Zelent et al., 2004), viz obr. 1.4.



Obr. 1.4: Model mechanismu působení TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) na molekulární úrovni. (a) Schopnost AML1 aktivovat či inhibovat transkripci závisí na spolupráci s p300 a mSin3A/HDAC a je závislá od kontextu. Důležitá pro vazbu DNA je spolupráce s proteinem CBFβ. Při asociaci s mSin3A, rekrutuje AML1 HDAC, čímž umožní tvorbu kondenzované formy chromatinu a omezí transkripci. Při vhodném kontextu naopak AML1 disociuje od mSin3A/HDAC a spolupracuje s p300 HAT. (b) V případě TEL-AML1 vysoká tendence TEL k dimerizaci a vazbě N-CoR amSin3A korepresorů vede k tvorbě vysoce stabilního represorového komplexu a ztráty citlivosti ke kontextu signalizace. TEL-AML1 si tedy zachovává schopnost vázat runt-vazebné domény ale působí jako konstitutivní HDAC-dependentní represor transkripce. Převzato a upraveno z (Zelent et al., 2004).

Změna fenotypu buněk po translokaci se naopak nedá vysvětlit negativně dominantním efektem ETV6-RUNX1 na druhou alelu RUNX1, či dimerizací s wild type alelou ETV6, která bývá u leukemických blastů často deletována. Klíčová je pro funkci fúzního genu doména runt, a to pro vazbu DNA, ale i kofaktoru CBFβ, který zesiluje vazbu k DNA (Sundaresh and Williams, 2017).

Linka et al. provedli rozsáhlé experimenty za účelem zjistit cílová vazebná místa fúzního genu a zmapovat dopad jeho přítomnosti na transkripci. Překvapivým zjištěním bylo, že ačkoli se protein RUNX1-ETV6 váže na místa bohatá na runt vazebné motivy, 88 % těchto promotorů nebylo vázáno proteiny RUNX1, ani ETV6. Ačkoli tedy fúzní protein reguluje mnoho genů cílených i RUNX1, většina z genů, jež reguluje jsou odlišné od cílů obou nefúzovaných transkripčních faktorů. V experimentech skupiny bylo zjištěno 217 přímo a 118 nepřímo regulovaných genů. Mezi downregulované geny patřily geny ovlivňující proliferaci, homeostázu, splicing, buněčný transport a receptorovou signalizaci. Upregulovány byly nejčastěji geny ovlivňující buněčnou adhezi a migraci, odpověď na stres, regulaci transkripce a buněčného cyklu (Linka et al., 2013). Bylo také ukázáno, že vnesení fúzního genu do myších pre-B lymfocytů zvyšuje expresi receptoru pro erythropoetin a skrze JAK2-STAT5 dráhu i antiapoptotického proteinu BCL-XL (Torrano et al., 2011). Knockout fúzního genu u

leukemických blastů také výrazně snižuje aktivitu PI3K/AKT/mTOR signální dráhu, jež je v přítomnosti fúzního genu hyperaktivovaná (Fuka et al., 2012).

Práce Žaliové et al. 2011 prokazuje, že fúzní protein RUNX1-ETV6 je důležitý v inicializaci leukémie a jeho přítomnost v preleukemickém klonu je klíčová, ale pro samotnou leukemickou buňku již esenciální není. Až na výjimky (Diakos et al., 2007) se většina autorů shoduje, že vnesení fúzního genu do pre-B lymfocytů snižuje proliferační rychlost buněk, vyřazení RUNX1-ETV6 u leukemických blastů proliferaci urychluje (Fischer et al., 2005; Ford et al., 2009; Zaliova et al., 2011). Pouhá přítomnost fúzního genu nevede k rozvoji leukemie, což ukazuje přítomnost stejné translokace v periferní krvi zdravých dětí. Jen zlomek nositelů této mutace nakonec dospěje k rozvoji leukemie (Andreasson et al., 2001; Zuna et al., 2011). Z fenotypického hlediska přítomnost fúzního genu sice snižuje proliferační rychlost, ale zároveň zvyšuje obnovu kmenových buněk a inhibuje diferenciaci buněk. V konečném důsledku dochází k přetrvání buněk s fúzním genem v kostní dřeni a po dalších zásazích do genomu k převaze nad buňkami s normálním genotypem až k rozvoji maligního onemocnění (Schindler et al., 2009).

2.4 NEOPLASTICKÝ METABOLISMUS A SIGNALIZACE U LEUKEMIE

Přes značné genetické, morfologické i signalizační charakteristiky jednotlivých druhů maligně proliferujících buněk jim zůstává několik charakteristik společných. Jednou z těchto společných vlastností, která je známa již přes 100 let, je přítomnost deregulovaného metabolismu.

Neoplastické buňky preferují jiné metabolické dráhy a intermediáty.

2.4.1 Glykolýza, Krebsův cyklus, Oxidativní fosforylace a Warburgův efekt

Za normálních okolností většina buněk lidského těla zpracovává produkty glykolýzy v Krebsově cyklu a dýchacím řetězci mitochondrií. Celkový zisk zpracování glukózy aerobním metabolismem je až 36 molekul ATP. Naopak v případě jejího anaerobního zpracování je většinou pyruvát redukován na kyselinu mléčnou (laktát), za regenerace NADH na NAD, a následně vyloučen z buňky. Tento děj vede k zisku pouze 2 molekul ATP na molekulu glukózy, zároveň ho nutně doprovází i acidifikace extracelulárního prostoru obklopujícího buňku.

Přesměrování metabolismu je komplexním procesem, který však může být regulován několika málo signalizačními proteiny a enzymy. Klíčovým se jeví zvýšení aktivity fosfoinositid 3-kinázy (PI3K) regulující, pomocí mTOR signalizační dráhy, směřování aminokyselin do proteosyntézy a zároveň expresi transportérů glukózy a tím její uptake. Dalším pozorovaným jevem je snížení aktivity pyruvát kinázy (PKM), jež je nutné pro směřování pyruvátu do biosyntetických a fermentačních drah místo Krebsova cyklu (Christofk et al., 2008a) Mnoho významných onkogenů, mj. RAS a MYC způsobují deregulaci metabolismu nádorových buněk alterací buněčné signalizace (Yuneva et al., 2012).

2.4.1.1 Warburgův efekt

Jednou ze zvláštností rakovinného metabolismu je preference anaerobního metabolismu, resp. fermentace i za přítomnosti dostatku kyslíku pro funkčnost dýchacího řetězce. Na tento fenomén upozornil Otto Warburg již roku 1928 (Warburg, 1928) a své poznatky později shrnul v publikaci „On the origin of cancer cells“ (Warburg, 1956). Tato zdánlivě paradoxní adaptace neoplastického metabolismu byla na počest objevitele pojmenována Warburgův efekt.

Původní vysvětlení Otto Warburga, že maligní fenotyp rakovinných buněk vzniká v reakci na nevratné poškození mitochondrií a tím i oxidativní fosforylace a využití anaerobního zpracování glukózy je tedy nutným záchranným mechanismem, bylo později vyvráceno (House et al., 1956). Aerobní metabolismus v neoplastické buňce je plně funkční a tato buňka spotřebovává v porovnání s fyziologickou tkání i podobné množství kyslíku. Jedná se tedy spíše o hyperaktivaci glykolytické dráhy a sníženou aktivaci navazujícího aerobního metabolismu než snížení oxidativního katabolismu. Prvotním cílem metabolismu v maligní buňce není efektivní tvorba ATP, spíše tvorba biomasy pro rapidní proliferaci, množství ATP produkované intenzivnější glykolýzou je pro tuto roli dostatečné. Anaerobní metabolismus navíc dodává velké množství substrátů pro anabolické dráhy, např. ribózu pro syntézu nukleotidů, glycerol, acetyl a citrát, potřebné pro syntézu mastných kyselin, uhlíkové kostry pro syntézu neesenciálních aminokyselin a redukční potenciál ve formě NADPH, prostřednictvím pentózového cyklu (Heiden et al., 2009). Buňky tumoru nejsou selektovány pro co nejefektivnější energetické využití živin, kterých mají díky vysoké hladině glukózy a Gln v krvi neustále dostatek.

Hojně diskutovaná je role kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS) v metabolismu a proliferaci nádorových buněk. Možnosti reparace poškození DNA působením ROS bývají u maligních buněk typicky sniženy, inhibici řady anti-ROS mechanismů nedostatečnou funkcí tumorsupresorů, jako např. p53 je dále ochromena obrana proti těmto molekulám a v neposlední řadě mohou ROS přímo působit v buněčné signalizaci, či zapříčinit zastavení buněčného cyklu (Schieber and Chandel, 2014; Xiao et al., 2005). Proto se maligní buňka snaží udržovat koncentraci těchto látek v úzkém rozmezí.

2.4.2 Oxidace mastných kyselin (FAO)

Matné kyseliny jsou extrémně důležitým zdrojem energie. Zpracování mastných kyselin za aerobních podmínek poskytuje přibližně dvakrát více energie na gram suché váhy než zpracování glukózy. V procesu beta oxidace je v každém cyklu zkrácen řetězec mastné kyseliny o 2 uhlíky za produkce acetyl-CoA, NADH a FADH₂. NADH a FADH₂ je poté zpracováno v dýchacím řetězci za vzniku ATP, nebo může být (po konverzi v NADPH v níže uvedených reakcích) využito v anabolické syntéze.

Jak bylo zmíněno výše, dostatek ATP většinou není limitujícím faktorem přežití a proliferace nádorových buněk. Limitujícím faktorem těchto buněk je většinou koncentrace NADPH a uhlíkových řetězců pro biosyntézu. NADPH je v metabolismu produkováno především 4 reakcemi: oxidací glukózy enzymy glukóza-6-fosfodehydrogenázou (G6PDH) a 6-fosfoglukonolakton dehydrogenázou (6PGLDH) v pentózofosfátovém cyklu (PPP), metabolismem malátu na pyruvát pomocí katalýzy NADP⁺ dekarboxylující malátdehydrogenázou (jablečný enzym, malic enzyme - ME1) a oxidací isocitrátu na α -ketoglutarát enzymem isocitrát dehydrogenázou. Dvě z těchto reakcí využívají produkty Krebsova cyklu získané mj. anaplerotickými reakcemi a samozřejmě stabilní dodávkou acetyl-CoA, který může pocházet významně právě z β -oxidace mastných kyselin. Dostatečná dodávka acetyl-CoA pomocí FOA pak zajišťuje možnost využití pyruvátu vzniklého glykolýzou, či činností ME1 k tvorbě oxaloacetátu jednou z anaplerotických reakcí a následnou konverzi skrze Krebsův cyklus na malát a opětovnou tvorbu NADPH pomocí ME1.

NADPH má roli i v odstraňování ROS skrze udržování zásoby redukované formy glutationu. V případě vyčerpání antioxidantu dochází v leukemických buňkách k indukci apoptózy. Tento efekt může být zvrácen dodáním jiného redukčního činidla (Armstrong et al., 2002). Aktivace FAO zřejmě umožňuje přežít buňkám pod stresem, například metabolického charakteru, či ze ztráty přílnutí (loss of attachment – LOA) (Schafer et al., 2009) a inhibice této metabolické dráhy působí proapoptoticky a synergicky z efektem chemoterapie (Hermanova et al., 2016; Pike et al., 2011). Regulace aktivace FAO zřejmě také hraje roli v determinaci diferenciaci HSC a rozhodování mezi symetrickým a asymetrickým dělením (Ito et al., 2012). Limitujícím a regulačním enzymem FAO je karnitin-palmytoyl transferáza (CPT1), která je v řadě tumorů overexprimovaná a její inhibice pomocí etomoxiru snižuje chemorezistenci, přežití v hypoxických podmínkách a za nedostatku glukózy (Qu et al., 2016). Aktivace této dráhy vykazuje negativní korelaci s aktivací mTOR signalizace (Zaugg et al., 2011).

2.4.2.1 *FAO a FAS*

V maligních buňkách existuje zvláštní rovnováha mezi oxidací a syntézou mastných kyselin. Syntéza mastných kyselin (FAS) je ve většině maligních buněk zvýšená a pravděpodobně slouží především k syntéze fosfolipidů buněčných membrán a signálních lipidů. Kromě toho mohou mastné kyseliny syntetizované touto drahou sloužit jako zdroj metabolitů pro FAO během metabolického stresu. Jakkoli je vztah mezi těmito drahami za normálních okolností antagonický, v nádorovém metabolismu se tyto dráhy vzájemně podporují a mohou fungovat v buňce zároveň (Qu et al., 2016).

2.4.3 Role Glutaminu a Aspariginu

Glutamin a asparagin patří do skupiny aminokyselin jež jsou podmíněně esenciální. Za normálních podmínek mohou být syntetizovány z jiných látek přijímaných v potravě, ale ve stresových podmínkách je jejich dodávání nutné. Stejně tak jsou tyto aminokyseliny nutné pro přežití mnoha monoklonálních nádorových linií, jak bylo diskutováno výše.

2.4.3.1 *Glutamin*

Glutamin je nejhojnější aminokyselinou v krevním oběhu a jeho hladina v plazmě je udržována v poměrně úzkém rozmezí zejména de novo syntézou ve svalech, plicích a tukové tkáni.

Glutamin zůstává pro nádorové buňky in vivo často nepostradatelným substrátem pro udržení oxidativní fosforylace a hlavním zdrojem ATP dokonce i za hypoxických podmínek (Fan et al., 2013). Glutamin hraje také klíčovou roli v metabolismu dusíku a jako substrát pro anabolické pochody. Většina glutaminu utilizovaného k tvorbě biomasy je inkorporována do nukleotidů a proteinů (Hosios et al., 2016). Vedle de novo syntézy a transportu z cytoplasmy je další cestou získání glutaminu mikropinocytóza a autofagická degradace intracelulárních proteinů.

Po vstupu do buňky je glutamin zpracován glutaminázou (GLS) na glutamát. Alternativně může být glutamin zpracován enzymy ze skupiny aminotransferáz a umožnit tak buňce tvorbu neesenciálních aminokyselin, mj. aspariginu. Minimálně 50% neesenciálních aminokyselin získávají neoplastické buňky tímto způsobem (Alberghina and Gaglio, 2014). Glutamát může být poté metabolizován glutamát dehydrogenázou (GLUD) za tvorby α -ketoglutarátu, redukčního potenciálu uloženého v molekule NADPH a amoniaku, či transaminací. Produkce α -ketoglutarátu je anaplerotická reakce doplňující substrát do Krebsova cyklu, NADPH potom může sloužit pro biosyntézu, či redukci hladin ROS. Další možností zpracování α -ketoglutarátu je nekanonická reduktivní karboxylace na citrát, sloužící jako zdroj uhlíku pro syntézu mastných kyselin, zejména za hypoxických podmínek (Gameiro et al., 2013).

Nezanedbatelnou roli hraje glutamin v regulaci aktivity mTOR signalizační kaskády. mTOR dráha může být u nádorových buněk celkově hyperaktivována zvýšením vychytávání glutaminu a aspariginu, jak je pro tyto buňky typické. Přísun glutaminu také tlumí další „amino acid sensing“ dráhu skrze protein GCN2 a stresovou dráhu IRS (Ye et al., 2010; Zhang et al., 2014).

Dostatečný přísun aminokyselin aspariginu a glutaminu je nutný pro syntézu nukleotidů. Po odepření těchto aminokyselin následuje zastavení růstu maligních buněk, které nemůže být zvráceno dodáním přímých intermediátů Krebsova cyklu, avšak je úspěšně anulováno dodáním exogenních nukleotidů (Gaglio et al., 2009). Stejně tak mohou být buňky deprivované o glutamin zachráněny přísunem aspariginu či aspartátu (Patel et al., 2016; Zhang et al., 2014).

Glutamin a asparagin tedy podporují akumulaci biomasy dodáním uhlíkových koster a dusíku pro syntézu mastných kyselin, aminokyselin a nukleotidů, nepřímou generací redukčních potenciálů, i stimulací signalizačních drah nutných pro jejich syntézu (Altman et al., 2016).

2.4.3.2 Závislost na glutaminu

Závislost na glutaminu je u nádorových buněk velmi častý získaný auxotrofní fenotyp. Tato charakteristika je spojená s řadou častých onkogenních mutací – např. amplifikací MYC a mutacemi KRAS. Dříve se potřeba přísunu glutaminu spojovala s jeho excesivní využitím pro anaplerotické reakce a udržení Krebsova cyklu. Aktuální publikace však ukazují, že minimálně v buňkách glioblastomu je klíčové využití glutaminu pro syntézu nukleotidů. Zvláště snížená syntéza prekurzorů purinů je v podmínkách omezeného přísunu glutaminu limitujícím faktorem proliferace (Tardito et al., 2015). Druhým podstatným faktorem závislosti je potřeba glutaminu pro aktivaci signalizační dráhy mTOR (Krall and Christofk, 2015).

Nutno dodat, že závislost na glutaminu není zdaleka uniformní pro všechny typy karcinomů a intenzita i způsob metabolického využití glutaminu se liší dle tkáně původu, genotypové charakteristiky i nádorového mikroprostředí (Altman et al., 2016).

2.4.3.3 Asparagin

Na rozdíl od aktivního metabolismu glutaminu bylo na asparagin pohlíženo (s výjimkou role v proteosyntéze a konverze na kyselinu asparagovou) jako na metabolickou slepou uličku. Jakkoliv glutamin přispívá k syntéze mnoha aminokyselin prostřednictvím svého katabolitu glutamátu, pouze asparagin ho nutně vyžaduje pro de novo syntézu. Reakce katalyzovaná ASNS enzymem je jednosměrná a ATP dependentní (Krall et al., 2016). Intracelulární a plasmatické hladiny asparaginu jsou v porovnání s glutaminem 10-100x nižší (Stegink et al., 1991).

Nedávný výzkum přisuzuje asparaginu podstatnou roli jako faktoru výměny aminokyselin při transmembránovém transportu. Zejména přenos malých nepolárních aminokyselin, serinu/threoninu a argininu byl násobně urychlen po dodání asparaginu. Většina asparaginu navíc nebyla po dodání ASNS deficientním buňkám katabolizována, což svědčí pro nedestruktivní využití jeho molekuly. Pomocí facilitace tohoto transportu má asparagin klíčový vliv na aktivaci mTOR dráhy a regulaci proteosyntézy i syntézy nukleotidů a samozřejmě na dodání klíčových stavebních prvků nejen pro biosyntézu polypeptidů. Podobná funkce při transmembránovém transportu kyselin a následné aktivace mTORC1 existuje i u glutaminu (Nicklin et al., 2009). Funkce asparaginu v daném transportu však nemůže být plně substituována glutaminem a naopak deaktivace mTORC1 v nepřítomnosti glutaminu může být u HeLa buněk zvrácena dodáním asparaginu (Krall et al., 2016).

Významným důsledkem nově objevené funkce asparaginu je i docenění významnosti jeho role v regulaci buněčného metabolismu. Závislost na glutaminu může být do značné míry zaviněna potřebou syntézy asparaginu pomocí ASNS a v literatuře bylo popsáno zvrácení této závislosti u buněk s aktivní glutamin syntetázou pomocí exogenního dodání asparaginu do média (Zhang et al., 2014). Aktivita glutamin syntetázy zřejmě dostačuje pro naplnění buněčné potřeby glutaminu, avšak již ne pro dostatečnou syntézu asparaginu. U buněk závislých na glutaminu se po knockoutu ASNS vyvíjí závislost na asparaginu podobného rázu jako závislost na glutaminu. U buněk melanomu a sarkomu došlo po knockoutu ASNS k zastavení růstu v G1/G0-fázi, jež mohlo být zvráceno exogenním dodáním asparaginu (Li et al., 2015). U buněk kolorektálního karcinomu došlo po inhibici glutaminolýzy a autofagie se současnou deplecí asparaginu k snížení viability a indukci apoptózy (Li et al., 2017). Inhibicí enzymu se současnou deplecí plazmatických zásob asparaginu zastavilo růst sarkomu také *in vivo* (Hettmer et al.).

Odstranění obou aminokyselin z média (např. působením ASNázy) vede k obtížně reverzibilní, až nezvratné inaktivaci mTOR dráhy se závažnými důsledky pro buněčné přežívání a proliferaci. Naproti tomu pouze deplece glutaminu, či odepření asparaginu se současným knockoutem ASNS vedly k fenotypu zvrátnému po obnovení přísunu těchto aminokyselin (Krall et al., 2016).

Tyto poznatky také nastiňují, proč samotná deplece asparaginu nedostačuje pro zastavení proliferace nádoru a proč úroveň exprese ASNS nehraje významnou roli v predikci rezistence na léčbu ASNázou v dětské ALL. Vzhledem k současné depleci glutaminu jako klíčového substrátu ASNS, není dostatečná funkce enzymu možná.

2.4.4 Amino acid sensing, mTORC1, mTORC2, GCN2

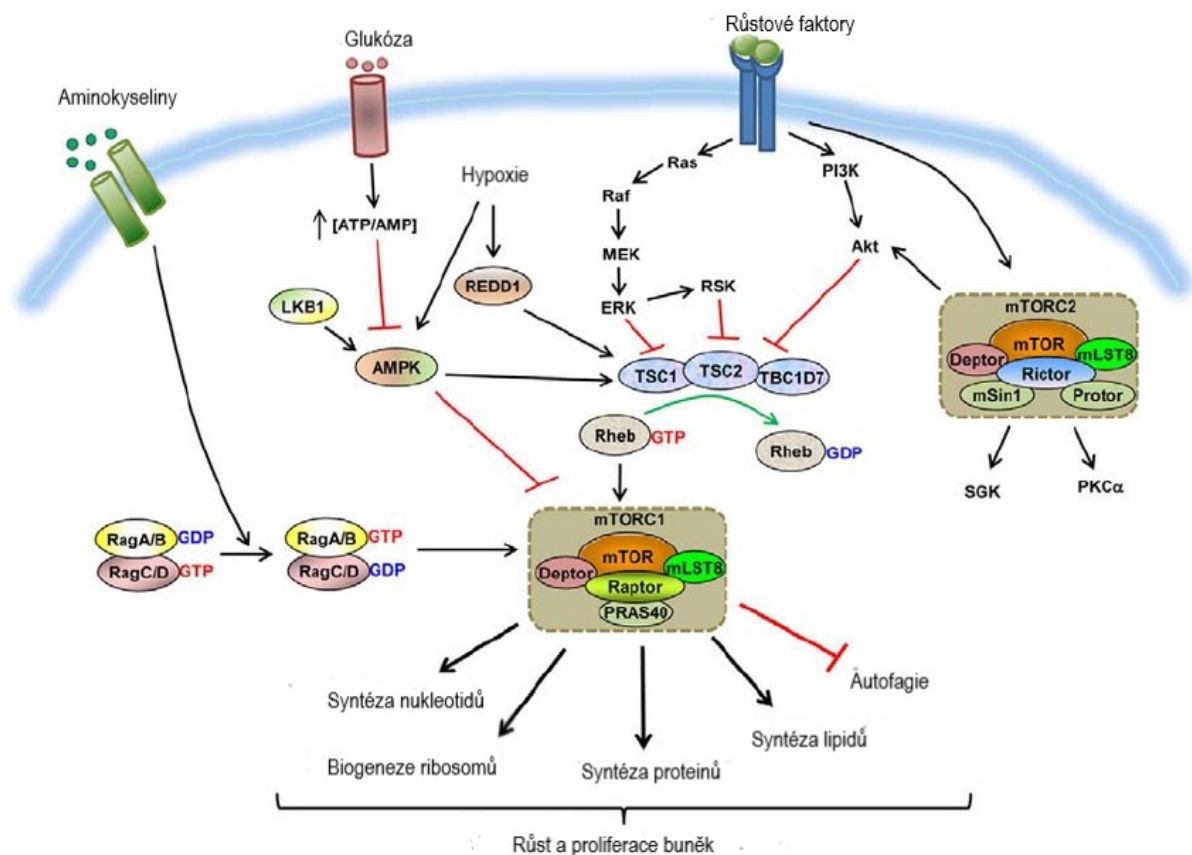
Serin/treonin kináza mTOR je součástí komplexů mTORC2 a mTORC1, kde hraje roli v regulaci růstu a přežívání buněk, proliferace, proteosyntézy, syntézy nukleotidů, dalších složek metabolismu, autofagie a transkripce v odpovědi na dostupnost živin, energetický stav buňky a přítomnost růstových faktorů. V komplexu mTORC2 působí i jako tyrosin kináza regulující receptory pro inzulin a inzulin-like růstový faktor 1 a udržování cytoskeletu.

General control nonderepressible 2 (GCN2) je také serine/threonine a stejně jako mTOR moduluje metabolismus v odpovědi na nutriční deprivaci, především nedostatek aminokyselin.

2.4.4.1 mTORC1

Komplex mTORC1 je složený především z proteinů mTOR, Raptor (Regulatory associated protein of mTOR) a mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8). Ostatní proteiny nejsou pro funkci komplexu nezbytně nutné. Další významnou charakteristikou je i citlivost k rapamycinu, kterou se odlišuje od mTORC2. Komplex hraje významnou roli v procesech

onkogeneze, stárnutí a ztráty citlivosti na inzulin vedoucí k diabetu a je proto předmětem intenzivního výzkumu (Zoncu et al., 2011).



Obr. 1.5: Schématické znázornění aktivačních mechanismů komplexu mTORC1 a jeho efektů na buňku. Převzato a upraveno z Kim et al., 2013.

mTORC1 může být aktivován řadou intra- i extracelulárních stimulů. Mezi nejprostudovanější patří aktivace růstovými faktory pomocí drah PI3K-Akt, a/nebo RAS-MAPK. Tyto dráhy vedou k fosforylaci a inhibici tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), který v komplexu s TSC1 a TBC1D7 působí jako GTPázu aktivující protein (GAP) pro malou GTPázu Rheb, která je aktivní při vazbě GTP a nepostradatelná pro plnou aktivaci mTORC1. Růstové faktory tedy zvyšují aktivaci mTORC1 zvýšením poměru Rheb-GTP:Rheb-GDP inhibicí GAP aktivity TSC2 (Dibble et al., 2012; Inoki et al., 2003a).

Dalším vstupním signálem je pro mTORC1 stav energetického metabolismu. Při snížení tvorby ATP dochází k vzestupu poměru AMP:ATP, což vede k aktivaci serin/threonin AMP-dependentní kinázy (AMPK), jež posléze inaktivuje mTORC1 přímou fosforylací proteinu Raptor a aktivační fosforylací Ser 1345 na TSC2. Další stresové signály, jako hypoxie jsou rovněž schopny inaktivovat mTORC1 působením přes AMPK (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003b).

Posledním významným regulačním mechanismem je reakce na dostupnost aminokyselin. Inhibice mTORC1 deplecí aminokyselin byla poprvé pozorována na kvasinkách a záhy poté

potvrzena na savčích buňkách (Hara et al., 1998). Tato aktivace však není plně závislá na TSC-Rheb regulační dráze, jelikož k inhibici mTORC1 za nedostatku aminokyselin dochází i při knockoutu TSC2, kdy je mTORC1 dráha normálně hyperaktivována (Smith et al., 2005). Významnější úlohu v regulaci mTORC1 v závislosti na hladinách aminokyselin mají zřejmě malé GTPázy z rodin Rag. Jak ukázaly dvě publikace z roku 2008, mutanty RagA/B GTPáz jsou schopny udržet mTORC1 aktivovaný či inhibovaný nezávisle na hladině aminokyselin a dodání aminokyselin do média zároveň podporuje nabití GTPázy RagB molekulou GTP (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). Zatím neobjasněnou otázkou zůstává, jakým způsobem jsou Rag GTPázy schopné vycítit hladiny aminokyselin v buňce a spustit regulaci mTORC1. V literatuře existují hypotézy o intralysosomárním snímání hladiny aminokyselin a přenosu na s lysozomem asociovaný mTORC1 za účasti V-ATPázy, či o signalizační roli leucin tRNA syntetázy jako GAP pro Rag (Kim et al., 2013).

Cílové proteiny komplexu mTORC1 zahrnují S6, eEF2K, SKAR, CBP80 a eIF4B. Mezi efekty signalizace patří modulace biosyntetických drah včetně proteosyntézy (fosforylace 4E-BP1), syntézy mastných kyselin (indukce exprese SREBP-1c), syntézy nukleotidů (aktivace enzymů carbamoyl-fosfát syntetázy 2, aspartát transkarbamylázy, a dihydroorotázy) a inhibici degradativních procesů, jako autofágie (fosforylací Atg13 a savčích analogů Atg1) (Zoncu et al., 2011). mTORC1 také zvyšuje neoangiogenezi prostřednictvím zvýšení sekrece VEGF a aktivaci HIF1 α (Land and Tee, 2007). mTOR dráha je stimulována dostupností aminokyselin nezávisle na mutacích běžně nacházených v této signalizační kaskádě u lidských malignit. Pro nádorové buňky je tedy vitální tento aktivační podnět zachovat. Nutno dodat že výsledný efekt působení mTORC1 je značně závislý na celkovém metabolickém a signalizačním kontextu uvnitř buňky.

2.4.4.2 GCN2 – ATF4 dráha

Jedná se o jednu ze dvou nejdůležitějších buněčných drah pro detekci hladin aminokyselin a následnou úpravu metabolismu buněk. GCN2 je vysokomolekulární protein kináza aktivovaná především nenabitými tRNA molekulami. Po aktivaci fosforyluje eIF2 α na Ser51, což inhibuje iniciaci translace většiny mRNA. Výjimkou je skupina mRNA reagujících na stresové situace, kam patří i ATF4. Tyto mRNA jsou translatovány efektivněji v přítomnosti fosforylovaného eIF2 α (Vattem and Wek, 2004). Transkripční faktor ATF4 (Activating transcription factor 4) zvyšuje expresi genů hrajících roli v biosyntéze a transportu aminokyselin, redoxní homeostáze a odpovědi na stres a je overexprimován v řadě lidských tumorů (Ye et al., 2010). Kromě ovlivnění translace ATF4 se GCN2 podílí i na regulaci synaptické plasticity a, což je důležité, lipidového metabolismu. Aktivace GCN2 tlumí syntézu mastných kyselin a naopak vyvolává jejich mobilizaci a utilizaci (Guo and Cavener, 2007).

Druhým proteinem fosforylujícím eIF2 α a aktivace ATF4 je kináza PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) aktivovaná chybně složenými proteiny v endoplasmatickém retikulu. Aktivace PERK podporuje přežití buněk za hypoxických podmínek in vitro i in vivo a podporuje růst tumoru (Bi et al., 2005).

ATF4 zvyšuje expresi asparagin syntetázy (ASNS) a při degradaci mRNA pro ATF4 klesla exprese ASNS o 70 %. ATF4 je nutná pro přežití buněk v prostředí bez neesenciálních aminokyselin. Přežívání buněk může být obnoveno arteficiální overexpresí ASNS, či exogenním dodáním asparaginu, ne však jiné individuální aminokyseliny. Asparagin je tedy klíčovou aminokyselinou v regulaci aktivity ATF4-dependentní aminokyselinové homeostázy (Ye et al., 2010). Zajímavé také je, že při knockoutu ATF4 a snížení exprese dochází díky snížení aktivity ASNS k aktivaci GCN2, což formuje zpětnovazebnou regulaci této dráhy.

Aktivace GCN2-eIF2 α signalizace při nedostatku neesenciálních aminokyselin zvyšuje buněčné přežívání, aktivuje autofagii a zvyšuje expresi proteinu p21. Tento protein zřejmě způsobuje pozorovanou akumulaci buněk v G1-fázi buněčného cyklu a zabraňuje progresi do S-fáze. Progrese buněčným cyklem za snížení p21 může být obnovena dodáním asparaginu. Buňky neschopné aktivace této dráhy mají horší přežívání za podmínek nedostatku neesenciálních aminokyselin. Tato dráha je klíčová i pro přežívání maligních buněk in vivo a xenografty s afunkční GCN2-ATF4 signalizací nejsou po implantaci schopny růstu (Ye et al., 2010).

Publikované výsledky naznačují, že minimálně v jaterních buňkách hraje GCN2 klíčovou roli v známé inhibici mTORC1 působením asparaginázy a přítomnost GCN2 je nutná pro adaptaci na působení tohoto léčiva (Bunpo et al., 2009). Tato souvislost může být vysvětlena objevenou spojkou mezi oběma dráhami reagujícími na nedostatek aminokyselin ve formě proteinu Sestrin2, jehož exprese je indukována transkripčním faktorem ATF4 a nutná k supresi mTORC1 nedostatkem aminokyselin (Ye et al., 2015).

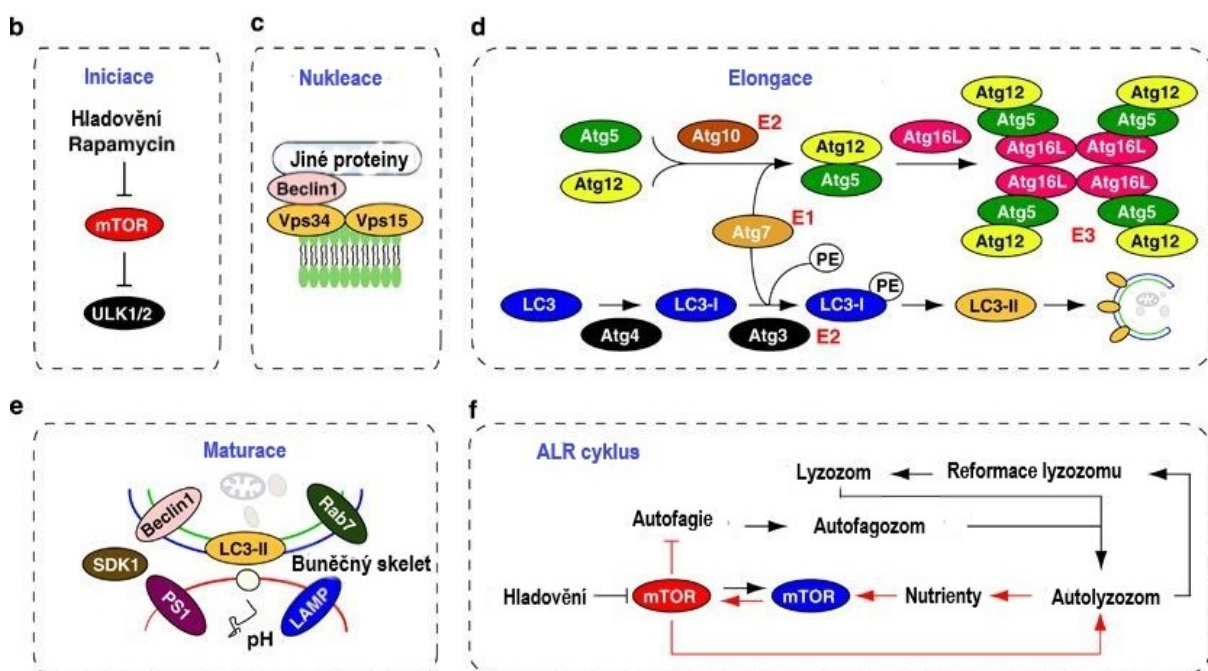
2.4.5 Autofagie

Autofagie v onkologii je zkoumána jako jev ovlivňující mj. onkogenezi a odpověď na terapii. Pro jeho určení se užívají markery LC3, Beclin 1 a Atg5, jež se účastní různých fází a typů autofagie, nebo přímé pozorování s využitím fluorescenčních metod. Byly popsány tumorsupresivní účinky autofagie v rané fázi vývoje malignity, naopak v pokročilých fázích růstu malignity může mít autofagie pozitivní vliv na udržení životaschopnosti a kompenzaci stresových podmínek, jímž jsou buňky vystaveny (Kondo et al., 2005).

Rozporuplné jsou názory na účinek autofagie na citlivost k terapii. Řada studií přisuzuje autofagii cytoprotektivní účinky proti působení chemoterapeutik, či radioterapie. V případě ASNázy bylo u citlivých REH a 697 buněčných linií po podání popsáno zvýšení koncentrace

proteinu LC3-II i počtu pozorovaných autofagických vakuol a po inhibici autofagie chlorochinem (CQ) došlo k částečné obnově citlivosti u linie 697 s indukovanou rezistencí vůči ASNáze. Pokles viability byl však dle prezentovaných výsledků mnohem výraznější u původních, citlivých buněk (Takahashi et al., 2017). Jiné studie spojují autofagii s buněčnou smrtí a inhibitor mTORC1, rapamycin aktivuje apoptózu, zároveň však vede k poklesu proliferace a nárůstu apoptózy u řady nádorových buněk (Kondo et al., 2005; Sharma et al., 2014). Jakkoliv tedy převládají poznatky o cytoprotektivním vlivu autofagie, její efekt je kontextuálně závislý a z pouhé její přítomnosti není možno usuzovat na dopad na viabilitu buňky.

Kromě sledování přeměny proteinu LC3-I na formu LC3-II jako markeru apoptózy jsou významné i proteiny Beclin1 a Atg5, jež jsou mj. nepostradatelné pro iniciaci a nukleaci autofagosomu. Beclin1 působí zároveň jako protektivní faktor proti tumorigenezi a neurodegeneraci (Kondo et al., 2005). Prokázán byl také jeho vliv na apoptózu ve spolupráci s antiapoptotickým proteinem Bcl-2 a pozitivní vliv na citlivost ovariálních nádorů na chemoterapii a jeho přítomnost se pojí s lepší prognózou (Kang et al., 2011; Valente et al., 2014; Zhong et al., 2009). Také v případě Atg5 byla objevena mimo regulace autofagie funkce v indukci zástavy buněčného cyklu a indukce opožděné apoptózy v reakci na poškození buňky (Simon and Friis, 2014).



Obr. 1.6: Schématické znázornění 4 hlavních fází autofagie: Iniciace (ovlivněná mTOR), Nukleace (nutný Beclin1), Elongace (nutné Atg5 a LC3-I) a Maturace. Převzato a upraveno z (Kang et al., 2011)

Regulace autofagie je zajištěna mj. drahami mTOR a CGN2-ATF4 a jejich inhibice vede k významnému nárůstu intenzity tohoto procesu (Kang et al., 2011).

3 CÍLE PRÁCE

1. Vytvoření modelu s celkovým umlčením fúzního genu ETV6-RUNX1 v leukemických liniích REH pomocí systému CRISPR/Cas9
2. Ověření modelu na DNA (Sangerova sekvenace), mRNA a proteinové úrovni (western blot)
3. Studium proliferace a apoptózy před a po inkubaci s L-asparaginázou
4. Detekce proteinů signálních drah účastnících se regulace metabolismu buněk
5. Měření metabolických změn na úrovni glykolýzy, oxidativní fosforylace a oxidace MK

4 METODY

4.1 BUNĚČNÉ KULTURY

Všechny procedury s buněčnými liniemi byli prováděny za sterilních podmínek v laminárním boxu vybaveným HEPA filtrem. Rovněž veškeré vybavení pro přímou manipulaci s buňkami a jejich kultivaci bylo sterilní a jednorázové. Pro sterilizaci pracovních povrchů a nesterilních nádob vnášených do boxu byl použit 70 % etanol. Buněčné linie byly kultivovány za standartních podmínek 5 % CO₂ a teploty 37°C.

4.1.1 Použité buněčné linie

Pro experimentální část byli použity dvě linie z ALL B-lymfocytárních prekurzorů s přítomností translokace (12;21) a fúzního genu ETV6/RUNX1 a to REH (DSMZ no.: ACC 22) a AT-2, které byly zakoupeny z Německa od firmy Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH a získány z partnerské laboratoře v Nizozemsku.

4.1.2 Kultivační médium

Pro kultivaci obou buněčných linií bylo použito médium RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) od firmy Thermo Fisher. K tomuto médiu bylo přidáno do finální koncentrace 10 % (v/v) inaktivované fetální bovinní sérum (FBS) od téže společnosti. Inaktivace média probíhala po jeho rozmrazení zahřátím ve vodní lázni na teplotu 56 °C po dobu 10 min. Dále byl do média přidán roztok antimykotik a antibiotik do finální koncentrace 1 % (v/v). Jednalo se o produkt Antibiotik-Antimycotic od firmy Thermo Fisher obsahující penicilin, streptomycin a amfotericin B. Médium bylo připravováno za sterilních podmínek v laminárním boxu a uchováváno při 4°C.

4.1.3 Pasážování buněk

Pasážování buněk je úkon výměny média za účelem dodání nových nutrientů a zároveň odstranění metabolitů a mrtvých buněk. Současně je provedena redukce počtu buněk na 0,5 mil. buněk/ml média. Kvůli vysoké proliferační aktivitě vyžadovaly buňky pasáž dvakrát týdně.

Buněčné linie REH i AT-2 jsou neadherentní, není tedy třeba kultivace s EDTA, či trypsinem, pro vytvoření suspenze postačuje promíchání obsahu kultivační lahve automatickou pipetou. 10 ml buněčné suspenze bylo odebráno do plastové zkumavky a centrifugováno (1000 RPM, pokojová teplota, 5 min) na centrifuze Universal 32R od firmy Hettich, rotor 1619. Supernatant je v boxu odstraněn a buněčný sediment resuspendován v 1 ml média.

Ze získané suspenze buněk je poté odebráno 10 μ l za účelem počítání buněk. Tento proces probíhal na pracovišti CLIP pomocí automatické počítačky buněk Automatic Cell Counter od formy Life Technologies následovně:

- Odebraných 10 μ l je naředěno v poměru 1:1 s trypanovou modří (Trypan Blue, Life Technologies)
- Směs je poté aplikována do počítací komůrky ve speciálních jednorázových sklíčkách kompatibilní s počítačkou (Cell Counting Chamber Slide, Life technologies)
- Celé sklíčko je vsunuto do přístroje, který je nutné manuálně zaostřit na buňky dle náhledu
- Výsledkem úspěšného počítacího procesu je poté počet viabilních a mrtvých buněk na 1ml roztoku a histogram distribuce jednotlivých buněčných velikostí

Alternativními metodami používanými při spolupráci s pracovištěm Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR byly manuální počítání pomocí Bürkerovi komůrky, či přístroje Scepter™ 2.0 (Millipore). I pro potřeby této automatické počítačky je nutno využít speciálních jednorázových pipetových špiček (Scepter Cell counter sensor, Millipore). Po nasátí buněk do této speciální pipety je provedeno počítání a analýza velikosti jednotlivých buněk a výstupem je opět počet živých a mrtvých buněk na 1 ml a histogram buněčných populací dle velikosti, kde lze upravit rozsah velikostí počítaných buněk. Metoda nevyžaduje použití speciálního barvení.

Po spočítání buněk byly pro účely pasáže buňky nasazeny do čerstvého média s finální koncentrací typicky 0,5 mil./ml.

4.1.4 Kryoprezervace

Pro účely kryoprezervace byla připravena buněčná suspenze o objemu 600 μ l obsahující typicky 10 mil. buněk. Metodika přípravy suspenze byla shodná s přípravou na pasážování. Dále bylo připraveno na každý zamrazovaný vzorek 300 μ l inaktivovaného FBS a 100 μ l 99 % dimethylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich) a nádoba pro zamrazení buněk (Mr. Frosty, Thermo Fisher Scientific Inc.), aby mohly být buňky zamrazeny co nejdříve po smíchání všech složek. V rámci příprav jsem se též ujistil, že je nádoba Mr. Frosty naplněna isopropanolem po vyznačenou rysku. Tato náplň zajistí správnou a rovnoměrnou rychlost zmrazení vzorků. Po provedení všech příprav byly do popsaných zmrazovacích zkumavek všechny složky v tomto pořadí: 600 μ l buněčné suspenze, 300 μ l FBS, 100 μ l DMSO. Poslední složka byla přidávána postupně po stěně zkumavky a poté byla směs krátce pipetou promíchána a co nejrychleji přinesena v zmrazovací nádobě do mrazáku o teplotě -80 °C na dobu minimálně 24 hodin. Pro dlouhodobé uchování byly využity boxy naplněné tekutým dusíkem.

4.1.5 Rozmrazování buněk

Při procesu rozmrazení byly buňky uchovávané v boxech s tekutým dusíkem přeneseny do vodní lázně o teplotě 37 °C, kde byly ponechány do téměř úplného roztátí ledového tělesa. Poté byly zkumavky s buňkami přesunuty do laminárního boxu a jejich obsah přepipetován do 15 ml zkumavek. K buněčné suspenzi bylo pomalu doplněno 10 ml vytemperovaného kultivačního média. Buňky byly poté centrifugovány (170 g, pokojová teplota, 5 min), supernatant odstraněn a nahrazen 5 ml vytemperovaného kultivačního média. Tato suspenze byla poté kultivována v malých kultivačních lahvích a pasážována, jak je uvedeno v 4.1.3, Pasážování buněk, str. 34. Přestože bylo zamrazeno typicky 10 mil. buněk a pro kultivaci jsme standardně používaly koncentraci 0,5 mil. buněk/ml, v tomto případě byl celý obsah finálně resuspendován do 5 ml média. Důvodem je nezanedbatelná mortalita procesu kryoprezervace, která v některých případech činila i přes 50 %. Buňky byly i z důvodu rozdílné viability po kryoprezervaci po rozmrazení sledovány každých 24 hodin až do první pasáže. Po stabilizaci kultury bylo provedeno zamrazení části buněčné kultury pro obnovení zálohy.

4.2 SEKVENOVÁNÍ SANGEROVOU METODOU

4.2.1 Izolace DNA pomocí QIAmp DNA micro kitu

Při pasáži byl odebrán požadovaný počet buněk a tyto buňky byly bez přípravy zmrazeny na teplotu -80 °C. Tento krok je sice velmi škodlivý pro buňky, avšak DNA, o kterou máme v této proceduře zájem, nepoškozuje. Navíc dle zkušeností laboratoře předchází zamrazení buněk sice není nutné, ale zlepšuje průchodnost metody zřejmě narušením membrán při zmrazení bez přípravy. Izolace DNA byla následně provedena pomocí QIAmp DNA micro kitu (Qiagen). Tento kit využívá specializované kolonky obsahující silica-gel membrány vážící DNA a je optimalizovaný pro získání DNA i z malých vzorků.

Nejprve byly vytvořeny pelety a odstraněn supernatant. K peletám byl následně přidán lyzační pufr společně s proteinázou K. Směs byla poté pulzně vortexována a inkubována při 56 °C po dobu 10 minut pro efektivní digesci proteinů. 50 µl 99 % ethanolu bylo následně přidáno za účelem vysrážení DNA a lyzát byl přepipetován do kolonek a centrifugován. Promývací kroky byly provedeny dle návodu výrobce a eluce byla uskutečněna přídatkem 35 µl nuclease-free vody. Podrobný návod je dostupný na webových stránkách výrobce.

Čistota a koncentrace izolované DNA byla určena pomocí spektrofotometru NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC) v programu ND-1000. Čistota DNA byla určena pomocí měření poměru absorpcí 260 nm: 280 nm, přičemž normální hodnoty se pohybují mezi 1,7 a 1,9. Jiné hodnoty budí podezření na kontaminaci proteiny, či fenolem.

4.2.2 Amplifikace pomocí PCR a ověření pomocí elektroforézy

Po izolaci DNA a určení její čistoty a koncentrace byla provedena amplifikace 224 bp dlouhého fragmentu obsahujícího místo zásahu editačního systému CRISPR/Cas9 v oblasti exonu 2 genu ETV6. Jelikož druhá kopie genu je u linie REH deletována, nemuseli jsme se obávat smíšeného výsledku sekvenace z tohoto důvodu. Požity byly primery Forward o sekvenci 5'-GGTCTCATACCTCCATTCCAAG a Reverse: 5'-CGCCATCAATCCTCTGTCC. Pro sekvenaci bylo do směsi vpraveno 2 µl DNA o koncentraci 50-100 ng/µl do celkového množství 25 µl. Amplifikace probíhala na cykleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies) dle protokolu:

- 1 x 5 min 95 °C
- 20 x (20 sec 95 °C + 30 sec postupné snižování teploty z 65 °C na 55 °C + 40 sec 72 °C)
- 1 x 7 min 72 °C
- Hold 4 °C

Úspěšnost amplifikace byla ověřena elektroforézou, kde byl pomocí přídavku ethidium bromidu detekován cílový fragment.

4.2.3 Sekvenace

DNA byla odeslána na pracoviště FN Motol, kde byla sekvenace provedena Sangerovou metodou a my jsme obdrželi data ve formátu FASTA.

4.2.4 Analýza

Oprava chyb v automatické analýze sekvenace, alingment a výsledná analýza byly provedeny v programu BioEdit Senqence Alingment Editor verze 7.0.5.3.

4.3 QRT-PCR

Práce s RNA byla prováděna v boxu k tomu speciálně určeném, aby se zamezilo kontaktu s RNázou. Práce s RNA byla prováděna bez zbytečného prodlení a vzorky uchovávány na ledu.

4.3.1 Izolace RNA

Buňky byly získány způsobem popsáním v 4.2.1 Izolace DNA pomocí QIAmp DNA micro kitu. Pro samotnou izolaci byl použit RNeasy Mini kit (Qiagen). Opět bylo postupováno téměř striktně dle návodu poskytnutého výrobcem. Jedinou výjimkou bylo prodloužení časů centrifugací při adhezi RNA a promývání z 15 sec, 8000 g na 30 s, 8000 g. Získání frakce nukleových kyselin probíhalo obdobně a DNA byla posléze odstraněna RNáza-free DNázou I (Qiagen) dle instrukcí výrobce. Čistota a přibližná koncentrace získané RNA byly určeny pomocí přístroje NanoDrop.

4.3.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad). Jedná se o třístupňový proces prováděný v automatickém cyklu s tepelnou inaktivací reverzní transkriptázy. Reverzní transkriptáza je v tomto případě H⁺ RNáza, což zvyšuje její senzitivitu. RNázová doména se stará o degradaci mRNA zároveň s její reverzní transkripcí, což zajišťuje přepis do cDNA 1:1. Bylo postupováno dle návodu výrobce a použito 5 µg templátové RNA. Celkové množství reakční směsi bylo 20 µl.

4.3.3 qRT-PCR

Koncentrace cDNA byla detekována pomocí kvantitativní PCR v přístroji Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Pro detekci fúzního genu byly použity komerčně dodávané sady sond a primerů TaqMan Assays (Thermo Fisher Scientific). Použité primery byly ENF 301 komplementární k části exonu 5 genu ETV6 a ENR361 komplementární na exonu 3 genu RUNX1. Jako sonda byla použita ENPr341 komplementární k části exonu 5 na ETV6. Reakční směs byla připravena v duplikátu pro každou cDNA dle následujícího vzoru:

Reagent	Objem [µl]
TaqMan Assay 20x	1
TaqMan Universal Master Mix II 2x	10
H ₂ O	8
cDNA	1

Tab. 4.1: Reakční směs pro qRT-PCR

Celkový objem reakční směsi byl 20 µl.

Protokol reakce proběh v 96-jamkové destičce určené pro přístroj 7500 Fast Real-Time PCR System (MicroAmp Fast) byl následující:

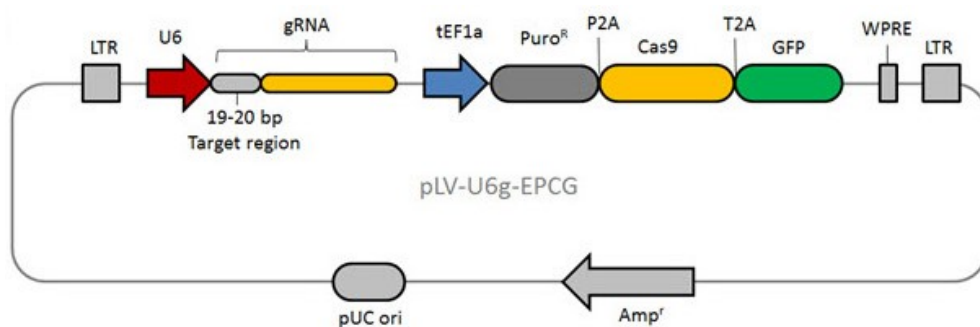
- 1 x 10 min 95 °C
- 50 x (15 s 95 °C + 60 s 60 °C)
- Hold 4 °C

Normalizace odlišnosti kvantity jednotlivých použitých cDNA byla provedena pomocí housekeeping analýzy koncentrační křivky cDNA genu GUS (β-glukoronidáza). Byly použity komerčně dodávané primery a sonda od firmy Thermo Fisher Scientific: ENF 1102, ENF 1162 a ENPr 1142.

4.4 VYTVOŘENÍ KNOCKOUTU FÚZNÍHO GENU ETV6/RUNX1 POMOCÍ CRISPR/CAS9 SYSTÉMU

Vlastní knockout byl proveden mou předchůdkyní v tomto projektu, proto zde uvádím pouze obecný popis a principi metody vytvoření knockoutu pomocí systému CRISPR/Cas9:

- Identifikace unikátní ~20 nukleotidů dlouhé sekvence v cílovém genu. Tato sekvence musí těsně naléhat na PAM sekvenci (Protospacer Adjacent Motif), jež je typická pro každý CRISPR/Cas9 systém dle bakterie původu. V našem případě byla zvolena sekvence v exonu 2 genu TEL(ETV6). Homologní gen TEL je v případě námi použitých buněčných linií deletován, proto není nutné se obávat of-targetingu homologního genu.
- Vytvoření konstrukt složeného z dvou částí: gRNA (guide RNA) obsahující sekvenci vážící CRISPR asociovanou endonukleázu (Cas protein) a „spacer“ komplementární k zvolené sekvenci nukleotidů v DNA a genu umožňujícího expresi Cas endonukleázy. V našem případě konstrukt obsahoval též 2 selekční markery. Gen GFP (green fluorescent protein) a Puro^R (gen pro rezistenci k puromycinu). Viz obr. 4.1.



Obr. 4.1: Schématické znázornění plasmidu systému CRISPR/Cas9 s vyznačeným místem pro inzerci sekvence pro gRNA

- Konstrukt poté musí být integrován do jaderné DNA cílové buňky. Toho je docíleno pomocí transdukce lentivirovým vektorem, který byl vytvořen ko-transfekcí „packaging cells“ několika plasmidy. Výsledné virové partikule pak obsahují vytvořenou sekvenci DNA pro funkčnost CRISPR/Cas9 systému a enzymatický aparát nezbytný pro integraci této sekvence do DNA.
- Pro ověření úspěšnosti transdukce byla provedena selekce puromycinem a detekcí GFP pomocí FACS.

Pro konstrukci plasmidu byl použit software Vector NTI ve verzi 11.0.

4.5 WESTERN BLOT

Tuto metodu jsme použili pro semikvantitativní analýzu proteinů signalizační kaskády mTOR a fúzního genu ETV6/RUNX1.

4.5.1 Příprava lyzačního pufru

Lyzační pufr byl připraven k následujícímu složení:

- 1 % Triton-X-100 (Merck)
- 0,1 % dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)
- 150 mM chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich)
- 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan s kyselinou chlorovodíkovou (Tris-HCl) (Sigma-Aldrich)
- 50 mM fluorid sodný (NaF) (Sigma-Aldrich)
- 2 mM kyselina etylendiamin tetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Roche Diagnostics)
- 1mM ortovanadát sodný (Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich)
- 2 mM chlorid hořečnatý (MgCl_2) (Roche Diagnostics)
- Směs proteázových inhibitorů (Roche Diagnostics)

4.5.2 Příprava lyzátu a určení koncentrace proteinů

Prvním krokem po odebrání potřebného množství buněk během pasážování byla centrifugace buněk, odstranění supernatantu tvořeného médiem a jeho nahrazení roztokem PBS (phosphate buffered saline). Tento proces byl poté opakován ještě jednou. Následovala další centrifugace a nahrazení PBS lyzačním pufrem s výše popsáním složením a inkubace směsi při teplotě 4 °C po dobu 20 min za občasného vortexování. Lyzát byl poté centrifugován na maximální rychlost a supernatant uskladněn při -80 °C pro další použití. K provedení vlastní SDS-elektroforézy jsme nejdříve museli určit koncentraci proteinů.

Změření koncentrace bylo provedeno spektrofotometricky pomocí RC DC Protein Assay Kit I (Bio Rad), jenž je založen na Lowryho eseji stanovení koncentrace proteinu ve vzorku.

Stanovení vyžaduje při každém měření vytvoření standartní křivky závislosti absorbance na koncentraci proteinu. Tato křivka byla vytvořena s použitím ředící řady bovinního sérového albuminu (BSA) od 0,125 do 3 mg/ml. Při přípravě vzorků bylo postupováno dle návodu výrobce. Po přidání reagentů A, B a S byly vzorky inkubovány 15 min při pokojové teplotě a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Stanovené koncentrace byly poté použity k přípravě vzorků na nanesení na elektroforetický gel. K přípravě byly použity

NuPAGE® LDS Sample Buffer a redukční činidlo NuPAGE® Sample Reducing Agent (obě reagensy od firmy Thermo Fisher Scientific). Ředění probíhalo dle následujícího vzoru:

- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) 15 µl
- NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) 6 µl
- Supernatant buněčného lyzátu dle koncentrace
- ddH₂O doplnit do 60 µl
- Celkový objem 60 µl
- Finální koncentrace proteinu ve vzorku 0,5 µg/µl

Pro detekci fúzního proteinu ETV6/RUNX1 byla použita pouze jaderná frakce proteinů získaná pomocí kitu NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific). Při izolaci bylo postupováno dle návodu výrobce a následovalo změření koncentrace získané proteinu stejným způsobem.

4.5.3 Elektroforéza a blotting

Pro separaci proteinů během elektroforézy byly použity komerčně vyráběné gely Bolt® 4-12 % Bis-Tris Plus Gel (Thermo Fisher Scientific) a aparatura Bolt® Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific). Všechny vzorky byly vždy nanášeny v duplikátu. Tank byl naplněn pufrům MOPS (Thermo Fisher Scientific) a do jamek bylo nanášeno 20 µl vzorku a na obou stranách bylo použito žebříčku PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Následovala elektroforéza při napětí 130 V po dobu 70-80 min.

Po ukončení elektroforetické separace byly proteiny přeneseny procesem vertikálního blottingu na nitrocelulózovou membránu (Bio Rad) s použitím Wet/Tank Blotting Systém (Bio Rad). Blotting probíhal v prostředí pufru o složení 20 % metanol (v/v), 25 mM Tris pufr, 150 mM glycin v ddH₂O při napětí 80 V po dobu 2 hod. S membránou bylo manipulováno vždy v rukavicích a pomocí pinzety, aby se předešlo navázání proteinů z okolního prostředí, jež by poté zkreslovaly výsledek pokusu.

Membrána byla poté většinou rozřezána dle vzorového žebříčku značícího bod doputování proteinů jednotlivých molekulových hmotností, aby mohly být membrány z jednoho blottingu použity pro detekci více proteinů.

K prevenci nespecifické vazby protilátek k membráně při pozdější detekci byla membrána po dokončení blottingu po dobu jedné hodiny blokována 5 % roztokem blokačního pufru získaného přidávkem Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio Rad) do roztoku Tris-Buffered Saline + Tween (TBST) dodaném firmou Bio Rad o následujícím složení: 50mM Tris-Cl, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,2 % tween.

Po dokončení blokace byly membrány přes noc inkubovány při 4 °C v roztocích primárních protilátek v blokačním pufru o koncentraci 5 %. Seznam použitých protilátek je uveden níže v tab. 4.2.

Název protilátky	Výrobce	M _r proteinu [kDa]
anti-CAD	Cell Signaling Technology	240
anti-phospho-CAD (Ser1859)	Cell Signaling Technology	240
anti-c-Myc	Cell Signaling Technology	57-70
anti-S6	Cell Signaling Technology	32
anti-phospho-S6 (Ser235/236)	Cell Signaling Technology	32
anti-p70S6K	Cell Signaling Technology	85, 70
anti-Phospho-p70S6K (T389)	Cell Signaling Technology	85, 70
anti-PARP	Cell Signaling Technology	116 → 89 + 24
anti-Atg5	Cell Signaling Technology	55
anti-Beclin1	Cell Signaling Technology	60
anti-ACC	Cell Signaling Technology	280
anti-phospho-ACC (Ser79)	Cell Signaling Technology	280
anti-AMPK	Cell Signaling Technology	62
anti-phospho-AMPK (Thr172)	Cell Signaling Technology	62
anti-RICTOR	Cell Signaling Technology	200
anti-Akt	Cell Signaling Technology	60
anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	60
anti-ETV6	GeneTex	53
anti-β-actin	Sigma-Aldrich	42
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Bio Rad	
Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	Bio Rad	

Tab. 4.2: Seznam použitých protilátek

Po této inkubaci byly membrány třikrát pod dobu 10 min promývány v TBST a inkubovány po dobu jedné hodiny s roztokem sekundární protilátky v 5 % blokačním pufru. Dle původu protilátky byla zvolena inkubace s protilátkou proti myššímu Fc fragmentu, či králíčím Fc fragmentu. Na této protilátce je kovalentně navázána křenová peroxidáza, jež později umožní katalýzou rozkladu peroxidu vodíku detekci signálu. Přebytečná sekundární protilátka byla opět odstraněna promytím v TBST stejným způsobem.

4.5.4 Detekce

Zobrazení probíhalo pomocí detekčního kitu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Tento kit je dvousložkový a pracuje na principu indukce luminescence Luminolu při rozkladu peroxidu vodíku křenovou peroxidázou navázanou na sekundární protilátce. K detekci byl použit přístroj C-DiGit Blot Scanner, LI-COR Biosciences.

V případě obtížněji detekovatelného proteinu fúzního genu ETV6/RUNX1 bylo pro detekci použito světlocitlivého filmu Kodak a následně automatického vyvolání na přístroji OptiMax X-ray Processor. Tohoto postupu bylo použito pro možnost velmi dlouhé expozice filmu a tím i zvýšení citlivosti detekce.

Kontrola celkového množství naneseného proteinu byla provedena pomocí detekce β -aktinu, jenž byla provedena u každé membrány. Tento protein je konstitutivně exprimován ve všech buňkách a není důvod předpokládat změnu jeho exprese po knockoutu fúzního genu ETV6/RUNX1, či přidavku asparaginázy. Ke kvantifikaci bylo použito programů Image Studio Lite ver 5.2 a ImageJ 1.52e s nadstavbou Fiji ve verzi 3.1.1.

4.6 SNP MICROARRAY ANALÝZA

Tato metoda založená na technice DNA microarray má mnoho využití včetně identifikace genetických variací v populaci, asociace genetických variant s onemocněními, a identifikaci loss of heterozygosity (LOH) v onkogenezi. V našem případě byla metoda využita pro identifikaci změn počtu kopií jednotlivých úseků v genetickém materiálu, tedy delecí a amplifikací.

Metoda byla provedena zkušenou podskupinou laboratoře Molekulární genetiky pod vedení doktorky Markéty Žaliové, PhD. Mnou byla provedena příprava DNA o dostatečné koncentraci a čistotě (viz kap. Izolace DNA pomocí QIAmp DNA micro kitu str. 36) a následná analýza dat předpřipravených v programech GenomeStudio v2011.1 a Illumina Chromosome Browser.

4.7 URČENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY

Ke sledování reakce buněk na přítomnost chemoterapeutika asparaginázy v médiu a jejich přežívání byla použita MTS cytotoxická esej (Queous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). MTS je zkratka pro chemikálii 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium. Principem testu je detekce změny této chemikálie na formazan, která probíhá pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách. Tento produkt je možné detekovat spektrofotometricky, což umožňuje kvantifikaci přežívání buněk. K porovnání citlivosti původních leukemických klonů s vytvořenými knockoutními alternativami jsme tyto linie inkubovali v 96-ti jamkové destičce v postupně narůstajících koncentracích ASNázy.

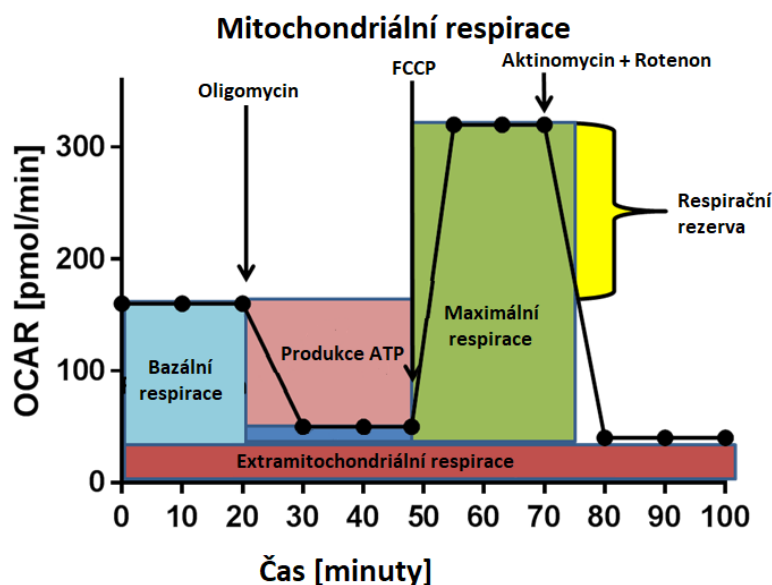
Do jamek byla nejprve pipetována buněčná suspenze o počtu 12000 buněk a objemu 80 μ l. Pro každou linii byla využita jedna destička, což nám umožnilo provést pokus v technickém hexaplikátu. Takto připravené destičky byly kultivovány přes noc v boxu za standartních podmínek (37 °C, 5 % CO₂).

Druhý den bylo do jamek přidáno 20 μ l média, či média s asparaginázou. Ta byla připravena v 8 ředěních od 0.000025 do 25 U/ml. Každé další koncentrace byla 10 nižší než předchozí. Jeden vzorek v každém řádku obsahoval čisté médium bez přidavku buněčné suspenze (použit pro určení pozadí) a stejně tak k jednomu vzorku s obsahem buněk v každé řadě bylo přidáno pouze čisté médium a tato jamka později sloužila k normalizaci dat mezi destičkami.

Následovala 72 hodinová kultivace v inkubátoru po které bylo do všech jamek přidáno 14 μ l MTS a buňky byly opět 3 hodiny ponechány v inkubátoru. Měření viability buněk po této proceduře proběhlo spektrofotometricky na přístroji VersaMAX Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) při vlnové délce 490 nm. K vyhodnocení výsledků jsem využil programů Microsoft Excel a GraphPad Prism 6 for Windows verze 6.01.

4.8 AGILENT SEAHORSE XF (EXTRACELLULAR FLUX) ANALÝZA

Byla použita verze XF24 Sensor Cartridge s 24 jamkami na destičku. Tato technologie umožňuje automatické dávkování reagensů do jednotlivých jamek za současného monitorování OCR (oxygen consumption rate) a ECAR (extracellular acidification rate) z čehož lze posléze odvodit charakteristiky buněčného metabolismu. Tato metoda byla využita pro měření glykolytické aktivity a intenzity probíhající oxidativní fosforylace.



Obr. 4.2: Schématické přiblížení principu metody. Po kalibraci přístroje následují cykly třech měření a přidavku chemikálie. Oligomycin blokuje ATP-syntázu, FCCP rozpřahuje tvorbu ATP od tvorby protonového gradientu a Aktimycin a Rotenon inhibují dýchací řetězec.

4.8.1 Příprava buněk a média na experiment

Během pasáže buněk bylo odebráno 300 000 buněk pro jeden plikát experimentu. Standardně byl experiment prováděn v pentaplikátu a s buňkami kultivovanými jak v neupraveném médiu, tak v médiu s přítomností asparaginázy. Celkem bylo odebráno 10 mil. buněk do 20 ml média.

Den po pasáži byly buňky transportovány do pracoviště Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR a k polovině buněk byl přidán enzym asparagináza do finální koncentrace 4 U/ml. Při analýze intenzity glykolýzy je pro zdárný průběh experimentu klíčové použití speciálního média bez přítomnosti pufrovací složky, jelikož část funkčnosti přístroje je založena na detekci změn pH v médiu. V případě detekce oxidativní fosforylace je pufrace média možná. Níže popsany protokol odpovídá procesu detekce oxidativní fosforylace.

Médium bylo připraveno v laminárním boxu za sterilních podmínek dle následujícího návodu (návod odpovídá potřebám média pro 24 jamek, tj. jedna plotna):

- BASE medium 15 ml (Seahorse Bioscience)
 - Aminokyselina glutamin byla přidána do celého média výzkumníky laboratoře do koncentrace 2 mM Gln
- HEPES (1M) 15 μ l – pouze pro OxPhos esej
- BSA (20 %) 150 μ l
- Pyruvát (1M) 15 μ l
- Glukóza (2M) 75 μ l

Médium bylo také rozděleno na dvě stejné části a do jedné poloviny média byla přidána ASNáza do finální koncentrace 4 U/ml. Dále byly dle návodu výrobce připraveny kartrige a započata kalibrace přístroje.

4.8.2 Protokol experimentu monitorujícího aktivitu oxidativní fosforylace

V den experimentu byla provedena adheze buněk k jamkám pomocí extracelulárního proteinu Cell-Tak (Fisher Scientific), kdy bylo postupováno dle návodu výrobce a jamky byly potaženy touto bílkovinou. Buňky byly centrifugovány a resuspendovány v připraveném médiu pro potřeby eseje na koncentraci 3 mil. buněk/ml. Médium bylo bezprostředně před začátkem eseje upraveno na pH 7,4 při teplotě 37 °C. Do každé jamky bylo poté nanášeno 300 μ l suspenze a pomocí centrifugace (200 g, brzda = 1, pokojová teplota, 1 min) byla podpořena adheze buněk.

Buňky byly poté 20-30 min inkubovány v inkubátoru bez přítomnosti CO₂, při 37 °C. Během tohoto času byly připraveny ředění chemikálií posléze automaticky přidávaných přístrojem k buněčné suspenzi, a to v případě testování buněčné respirace dle následujícího vzoru (pro jednu plotnu):

Reagencie	Finální [c]	Finální [c] v jamce	Finální objem
Oligomycin	20 μ M	2 μ M	2 mL
ROT + AA	10 μ M 10 μ g/mL	1 μ M 1 μ g/mL	2 mL
FCCP	30 μ M	3 μ M, 6 μ M	4mL

Tab. 4.3: ROT = Rotenon, AA = aktinomycin A, FCCP = p-3-fluorometoxyfenylhydrazol, všechny chemikálie pochází z XF Mito Stress Test Kit Saehorse Bioscience

Následně byly reagenty naneseny do kartrige dle vzoru v tab. 4.3:

A 55 μ L Oligomycin (20 μ M)	B 60 μ L FCCP (30 μ M)
C 68 μ L FCCP (30 μ M)	D 76 μ L ROT+AA (10 μ M; 10 μ g/mL)

Tab. 4.4: Rozpis roztoků nanášených do jednotlivých injektorů kartrige

Po vložení takto připravené kartrige do přístroje započala kalibrace trvající přibližně 15 minut. Dále se postupovalo dle instrukcí na monitoru. Hlavním sledovaným parametrem bylo pro nás OCR (oxygen consumption rate). Data experimentu byly zpracovány v programu Seahorse Wave Desktop V2.6 a bylo z nich možno odečíst reziduální nemitochondriální respiraci po přidávku Aktinomycinu A, bazální buněčnou respiraci a maximální respirační kapacitu.

4.8.3 Protokol Experimentu určení glykolytické aktivity buněk

Protokol je do značné míry obdobný. V použitém médiu nesmí být přítomny pufovací látky pro umožnění měření ECAR (acidifikace extracelulárního prostředí) a samozřejmě se lišily chemikálie použité v přípravě kartrige. V našem případě jsme postupovali dle vzorového protokolu výrobce a použili přísady 10mM glukózy, 1 μ M oligomycinu a 100 mM 2-deoxy-D-glukózy.

4.8.4 Typický vzhled uspořádání destičky pro průběh experimentu

Jak je vidět z tab. 4.5, experiment byl obvykle prováděn v technickém pentaplikátu. Další 4 jamky byly použity pro určení pozadí pro korekci měření.

X	Buněčná linie I – bez ASNázy				
Buněčná linie II – bez ASNázy			X		
Buněčná linie I – s ASNázou		X			
Buněčná linie II – s ASNázou					X

Tab. 4.5: Typický vzhled uspořádání destičky experimentu. Jamky označené X jsou „blank“ naplněné pouze médiem bez/s přítomností asparaginázy

4.9 URČENÍ INTENZITY OXIDACE MASTNÝCH KYSELIN

Oxidace mastných kyselin (FAO) byla monitorována pomocí eseje s použitím radioaktivního palmitátu. Z toho palmitátu přechází tritium při oxidaci postupně až na $^3\text{H}_2\text{O}$, jež je posléze detekována.

4.9.1 Příprava buněk

Den před započítáním experimentu bylo při pasáži odebráno do 24 jamkové destičky v šesti triplikátech 0,5 mil. buněk do 1 ml média. 4 triplikáty budou sloužit pro určení FAO bez a s přítomností etomoxiru a ASNázy. 2 triplikáty budou sloužit k určení koncentrace celkového proteinu jako korelátu počtu buněk, jež se mění v závislosti na přítomnosti asparaginázy a mírných odlišnostech v rychlosti růstu.

4.9.2 Preinkubace a příprava kolon

První den byly buňky přepraveny do pracoviště Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR a k polovině triplikátů byla přidána asparagináza do koncentrace 4 U/ml. Dále byly připraveny kolony, jež byly tvořeny dlouhými skleněnými Pasteurovými pipetami se zatavenými konci. V digestoři byly tyto pipety nejprve naplněny malým kouskem skelné vaty, jež sloužila jako hrubý filtr k zachycení druhé složky tvořené 2ml suspenze 36,7 g iontoměniče DOWEX 1x2-400 (Sigma Aldrich) v 100 ml vody. Pomocí druhé Pasteurovy pipety byly z kolony odstraněny případné bubliny a takto připravené vybavení bylo ponecháno přes noc v klidu.

4.9.3 Radioaktivní esej, měření a vyhodnocení

Druhý den byly připraveny směsi ze společné master mixtury:

- 2 mM kyselina palmitová (Sigma-Aldrich), 20 mM karnitin (Sigma-Aldrich), 17 $\mu\text{Ci/ml}$ [9,10(n)-3H] kyselina palmitová (GE Healthcare) – dále jako mixtura -/-

- 2 mM kyselina palmitová, 20 mM karnitin, 17 μCi [9,10(n)- ^3H] kyselina palmitová, 4 mM etomoxir (Sigma-Aldrich) – dále jako esej mixtura +/-
- 2 mM kyselina palmitová, 20 mM karnitin, 17 μCi [9,10(n)- ^3H] kyselina palmitová, 4 U/ml ASNáza – dále jako esej mixtura -/+
- 2 mM kyselina palmitová, 20 mM karnitin, 17 μCi [9,10(n)- ^3H] kyselina palmitová, 4 mM etomoxir, 4 U/ml ASNáza – dále jako esej mixtura +/+

Přidání radioaktivní kyseliny palmitové probíhalo na certifikovaném pracovišti za dodržení zásad práce s radioaktivními materiály. Použitá [9,10(n)- ^3H] kyselina palmitová obsahuje tritium, což je β -zářič s poločasem rozpadu 12,32 let. Po ukončení experimentu byly odebrány kontrolní stěry z exponovaných povrchů k vyloučení kontaminace.

Etomoxir je inhibitor β -oxidace mastných kyselin a jeho použití nám umožnilo stanovit nemitochondriální zpracování mastných kyselin a nespecificky proniklou radioaktivitu a tím normalizaci dat.

Do každé jamky bylo poté přidáno 50 μl korespondující mixtury. Buňky byly poté 3 hodiny inkubovány v boxy o teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ a 5 % koncentraci CO_2 . Během inkubace bylo provedeno měření koncentrace proteinu ze zbylých 2 triplicátů. Dále byly připraveny zkumavky s obsahem 500 μl 10 % (w/v) kyseliny trichloroctové (TCA; Sigma-Aldrich) a zkumavky s 100 μl 6M NaOH (Sigma-Aldrich) a to na každou použitou jamku jedna od obou. Poté byly odlomeny špičky zatavených Pasteurových pipet tak, aby přes ně mohl volně protékat roztok a pipety byly umístěny do scintilačních lahvíček naplněných 5 ml scintilačního roztoku Perkin Elmer LLC ULTIMA GOLD (Thermo Fisher Scientific).

Po ukončení inkubace byly destičky s buňkami centrifugovány (5 min, 200 g, pokojová teplota). 500 μl supernatantu bylo poté přidáno do zkumavek s obsahem 500 μl TCA, což zajistilo precipitaci proteinové složky. Následovala druhá centrifugace (10 min, 1200 g, pokojová teplota), po které bylo 900 μl supernatantu přeneseno do zkumavek naplněných 100 μl NaOH zajišťujících alkalizaci a směs byla okamžitě přenesena do připravených kolon. Následně proběhla eluce z kolon s použitím 2x 850 μl ddH₂O, scintigrafické lahvičky byly uzavřeny a důkladně promíchány. Měření záblesků vyvolaných interakcí β -záření se scintilačním roztokem bylo provedeno na přístroji 1900TR liquid scintillation analyzer (Packard). Naměřený počet CMP (counts per minute) byl normalizován s použitím zjištěného množství proteinu pro jednotlivé vzorky a nespecifické radioaktivity zjištěné ve vzorcích s přídatkem etomoxiru.

4.10 URČENÍ VYCHYTÁVÁNÍ GLUKÓZY DO BUNĚK

Pro měření metabolismu glukózy byly použity detekce intenzity jejího vychytávání z média pomocí radioaktivního substrátu [³H]-2-deoxyglukózy (Perkin Elmer Thermo Fisher Scientific). Tato metoda byla původně vyvinuta Dr. Sokoloffem (Sokoloff et al., 1977) a modifikována pro účely monitorace metabolismu leukemických buněk. Je založena na poznatku, že transport a iniciální fosforylace 2-deoxyglukózy probíhají za pomoci stejných enzymů, jako je tomu u glukózy. Produkovaný 2-deoxyglukóza-6-fosfát (2DG-6-P) ale nemůže být dále izomerizován enzymem fosfoglukoizomerázou a dochází k jeho akumulaci v buňce. Radioaktivní 2DG-6-P je potom detekován a jeho obsah koreluje s mírou spotřeby glukózy buňkou.

Den před experimentem bylo při pasáži odebráno 0,5 mil. buněk do 1 ml média na každý plikát. Celkem bylo připraveno 6 plikátů od každého klonu. K 3 plikátům byla následující den po transportu do pracoviště Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR do média přidána asparagináza.

Po kultivování buněk přes noc s a bez přítomnosti ASNázy byly buňky 2x promyty pufrům KRH (Krebs-Ringer-HEPES; Sigma-Aldrich) o složení: 20 mM pufr HEPES o pH 7,4, 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25mM MgSO₄, 1,25mM CaCl₂ a objemu 900 μl. Dále byly buňky resuspendovány v 900 μl KHR pufru se kterým byly buňky inkubovány v boxu při 37 °C po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby bylo do buněčné suspenze přidáno 100 μl 10X koncentrovaného roztoku START o složení: 1 mM 2-deoxyglukóza, 5 μCi/ml [³H]-2-deoxyglukóza a po tomto přídávku byly buňky inkubovány dalších 10 min za stejných podmínek. Buňky byly poté třikrát promyty roztokem pufru PBS a nakonec resuspendovány v 1 ml 0,03% roztoku SDS. V tomto roztoku byly opět při 37 °C inkubovány dalších 10 min. 900 μl buněčné suspenze bylo poté vneseno do scintilačních lahvíček obsahujících 5 ml scintilační tekutiny. 50 μl z každého vzorku bylo posléze použito k stanovení koncentrace proteinu ve vzorku, jež byla opět použita pro normalizaci dat.

5 VÝSLEDKY

5.1 OVĚŘENÍ VÝSLEDKŮ CRISPR/CAS9 MUTAGENEZE

K ověření úspěšnosti knockoutu fúzního genu ETV6/RUNX1 bylo použito testování na třech úrovních: DNA, mRNA a protein. Výsledkem editace genomu pomocí CRISPR/Cas9 systému byla v našem případě oprava dvouvláknového zlomu DNA vzniklého činností enzymu Cas9 pomocí procesu NHEJ (non-homologous end joining), při kterém mohou vznikat krátké náhodné indelové mutace. Naším cílem bylo vytvoření posunu čtecího rámce o 1, či 2 nukleotidy, což by vyústilo ve vznik předčasných stop kodonů na pozici START + 64 kodonů při +1 frameshiftu, či START + 66 kodonů při +2 frameshiftu, tedy v exonu 3 genu ETV6. Tento předčasný STOP kodon může vyústit v proces tzv. Nonsense-mediated mRNA decay, při kterém je vzniklá mRNA s časným STOP kodonem degradována v cytoplasmě před možností translace. Pokud se mRNA dostane k translaci, přítomnost brzkého STOP kodonu vyústí v terminaci translace a degradaci aberantně krátkého proteinu.

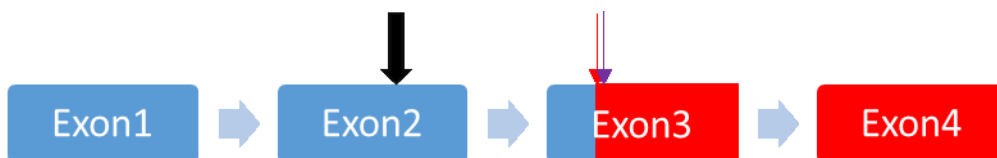
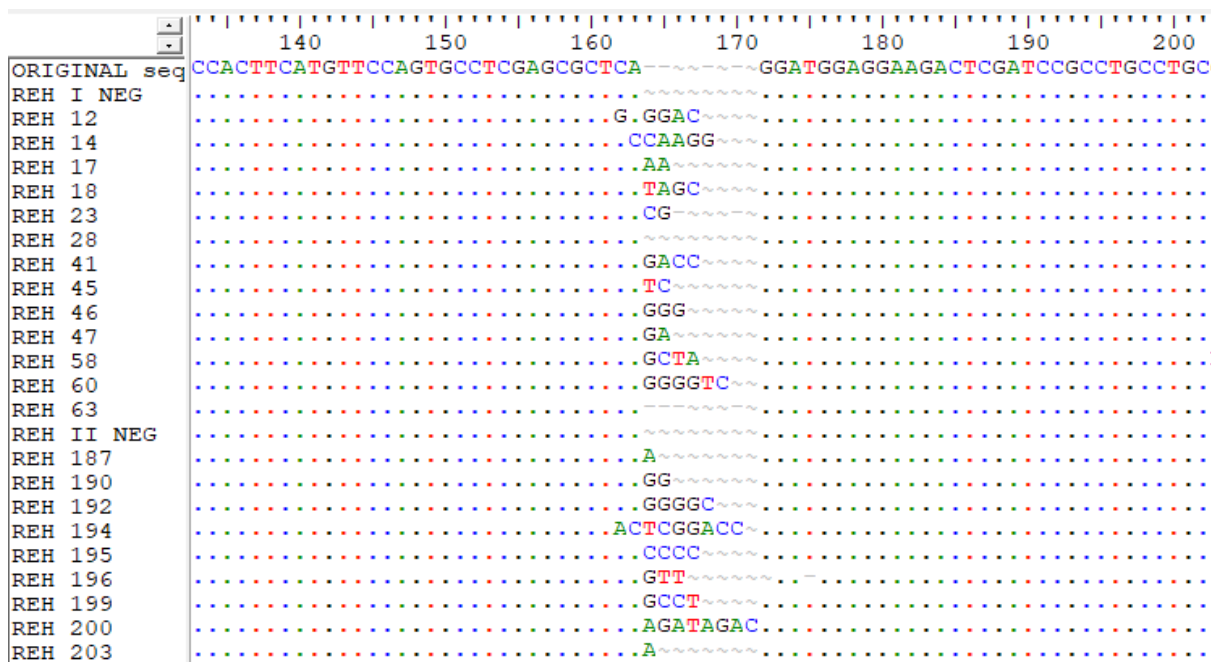


Schéma 5.1: Znázornění místa indukované mutace (silná černá šipka) a místa vzniku predikovaných STOP kodonů při posunu čtecího rámce o +1 bazi (červená šipka), či +2 baze (fialová šipka).

5.1.1 DNA sekvenace

Pro ověření přítomnosti indelové mutace v genomu DNA sekvenací byla zvolena Sangerova metoda provedena ve spolupráci s FN Motol. U sekvencí byl proveden alingment a určen případný frameshift, který byl zjištěn u všech mutovaných exemplářů kromě klonů REH I 46 a REH I 60, kde byla zjištěna inserce náhodného tripletu bazí a RAH I 28 a REH I 63, kde nebyla zjištěna změna oproti původní sekvenci. U negativních kontrol nebyla v souladu s očekáváním zjištěna mutace původní sekvence. V případě klonu 29 se nepodařilo sekvenci zcela určit, vzhledem k tomu že se zřejmě jednalo o geneticky nehomogenní kulturu.

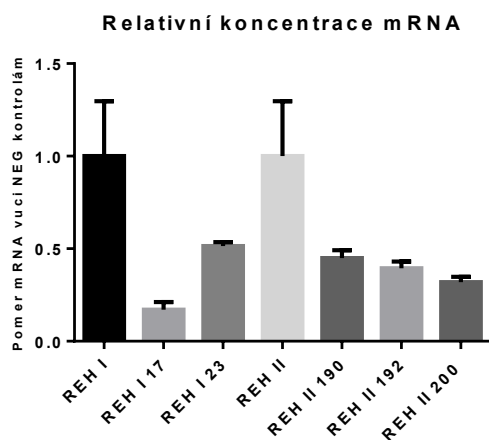
Výsledek alingmentu sekvencí se zobrazením místa zásahu systému CRISPR/Cas9 je uveden na obr. 5.1, výsledný frameshift a přehled jednotlivých klonů je pak uveden v tabulce č. XX.



Obr. 5.1: Zobrazení alingmentu v místě mutagenese systémem CRIPR/Cas9. Sekvence klonu REH 29 není zobrazena. K alteraci původní sekvence během NHEJ nedošlo pouze u klonů 28 a 63. S výjimkou klonů 28, 46, 60 a 63 bylo dosaženo posunu čtecího rámce.

5.1.2 Hladiny mRNA – Nonsense-mediated decay

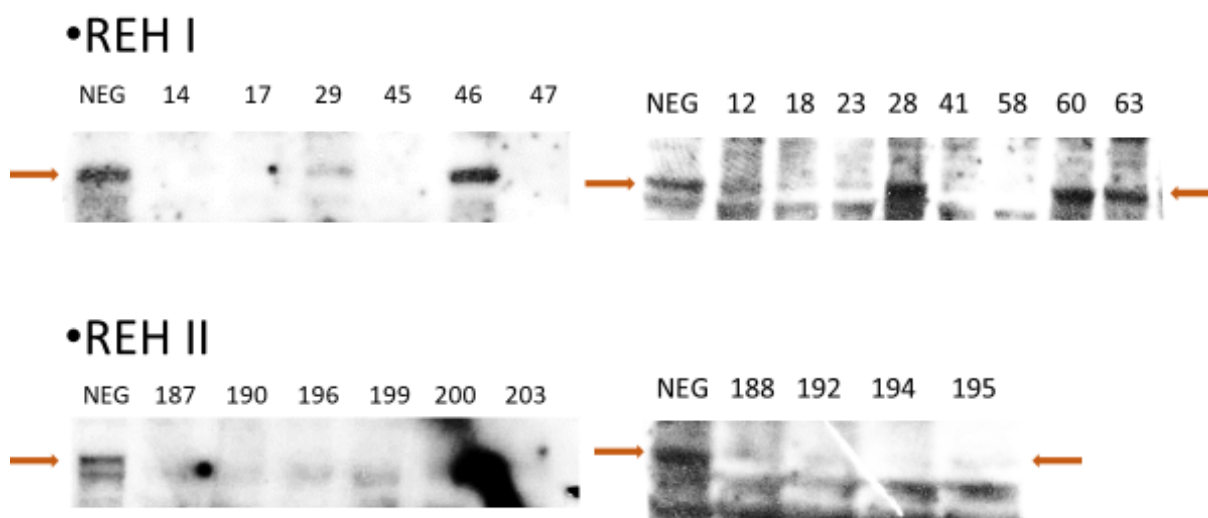
Se selektovanými klony s přítomností posunu čtecího rámce a kontrolních klonů byla provedena analýza hladiny mRNA pomocí reverzní transkripce a kvantitativní RT-PCR získané cDNA (viz kap. 4.3, str. 37). Byla předpokládána snížená koncentrace mRNA u mutant na podkladě Nonsense-mediated mRNA decay (NMD), jež degraduje mRNA se STOP kodonem nacházejícím se více než 50 nukleotidů před poslední exon-exonálním spojem, transkript může být degradován tímto procesem. V souladu s tímto předpokladem hladiny transkriptů mutovaných klonů dosahovaly 14-52 % hladiny transkriptů v nemutovaných buňkách (viz Graf 5.1).



Graf 5.1: V grafu je znázorněn podílem vůči kontrolním liniím úbytek mRNA fúzního genu ETV6-RUNX1 po jeho mutagenesi.

5.1.3 Western blot

Nepřítomnost fúzního proteinu byla ověřena pomocí analytické techniky Western blot (viz kap. 4.5 Western blot str. 40). Senzitivita použité protilátky (GeneTex) bohužel nedosahovala dostatečně vysokých hodnot, takže i přes opakované pokusy byla zachycena i vysoká míra šumu pozadí. Výsledky se shodovaly s očekáváními po sekvenaci. Přítomnost produktu fúzního genu byla prokázána u kontrolních klonů REH I neg a REH II neg a u klonů bez posunu čtecího rámce: REH I 28, 46, 60 a 63. Částečně byla přítomnost proteinu znatelná u klonu REH I 29 u něhož bylo dle sekvenace a SNP analýzy poято podezření na směsný kultivát. U ostatní klonů nebyla přítomnost fúzního proteinu detekována (viz Obr. 5.2)



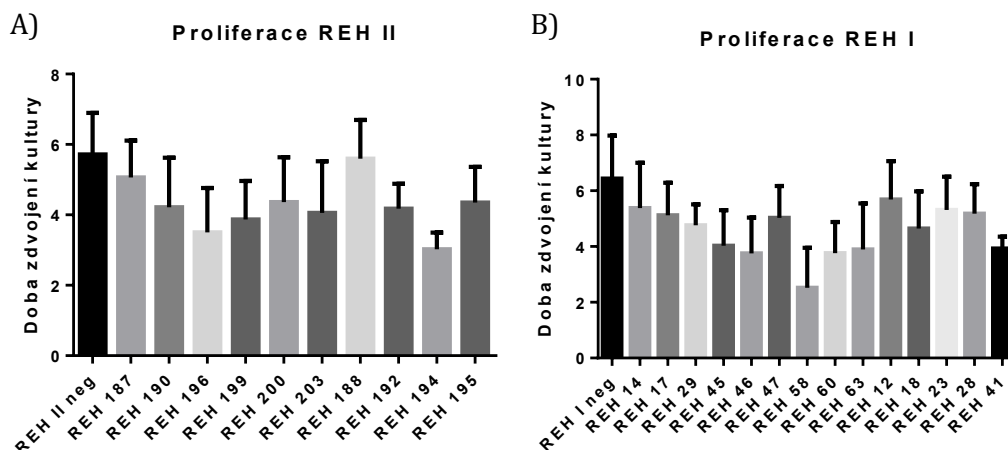
Obr. 5.2: Výsledky detekce fúzního genu v nukleární frakci buněčných proteinů metodou Western blot

5.2 CYTOTOXICKÁ MTS ESEJ A BUNĚČNÁ PROLIFERACE

Buněčné přežívání a proliferace byly monitorovány za normálních podmínek v inkubátoru za využití počítání buněk během pasážování a za přítomnosti cytostatika L-asparaginázy s využitím MTS eseje (viz kap. 4.7 Určení buněčné viability, str. 43).

5.2.1 Buněčná proliferace

Pro vyhodnocení rychlosti proliferace bylo využito dat z 8 po sobě jdoucích pasáží. Z těchto dat byl poté vytvořen průměr a vyjádřen počet zdvojení buněk za 3,5 dne. Je patrná mírně vyšší proliferační rychlost původních klonů bez knockoutu fúzního genu ETV6/RUNX1. Pro některé mutanty dosáhl rozdíl v proliferační rychlosti statistické významnosti (p -value < 0.05). K tomu koresponduje i zjištění delšího času potřebného pro zdvojnásobení buněčné populace. Tyto rozdíly nemohou být vysvětleny vnesením systému CRISPR/Cas9 do genomu, jelikož byl proveden i u negativních kontrol. Stejně tak ale nemůže být vysvětlen absencí fúzního proteinu, jelikož klony 46, 60, 63 přítomnost proteinu vykazují, a i u nich došlo ke snížení proliferační rychlosti. Jedná se o klony, které po rozmrazení měly po několik pasáží nižší proliferaci.

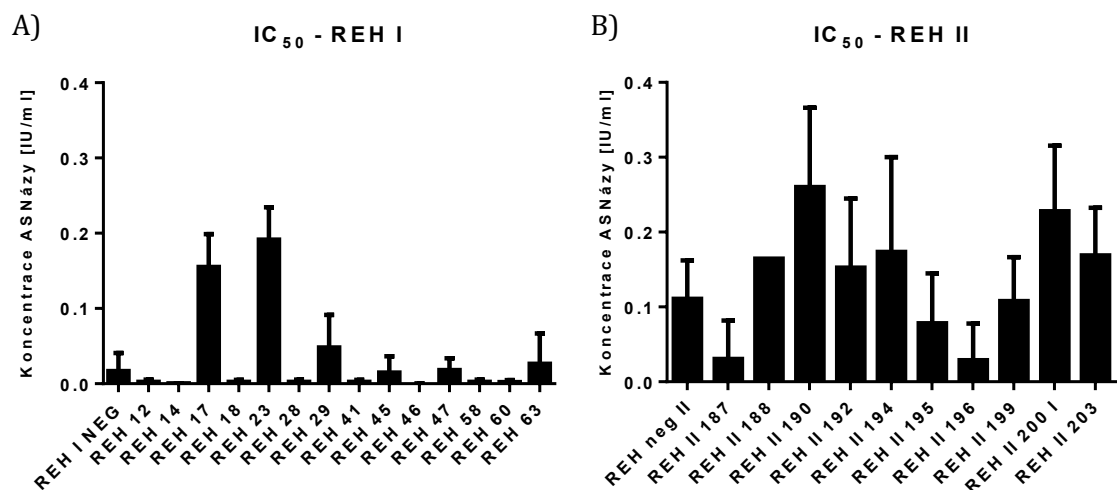


Graf 5.2: **A)** Průměrná doba zdvojení mutantů odvozených od REH II linie a kontrolních REH II NEG buněk. Viditelný je mírný pokles proliferační rychlosti, jež dosáhl signifikantní míry (p -value <0.05) u klonů 194, 196, 199 a 203. **B)** Průměrná doba zdvojení mutantů odvozených od REH I linie a kontrolních REH I NEG buněk. Viditelný je mírný pokles proliferační rychlosti, jež dosáhl signifikantní míry (p -value <0.05) u klonů 41, 45, 46 58, 60 a 63.

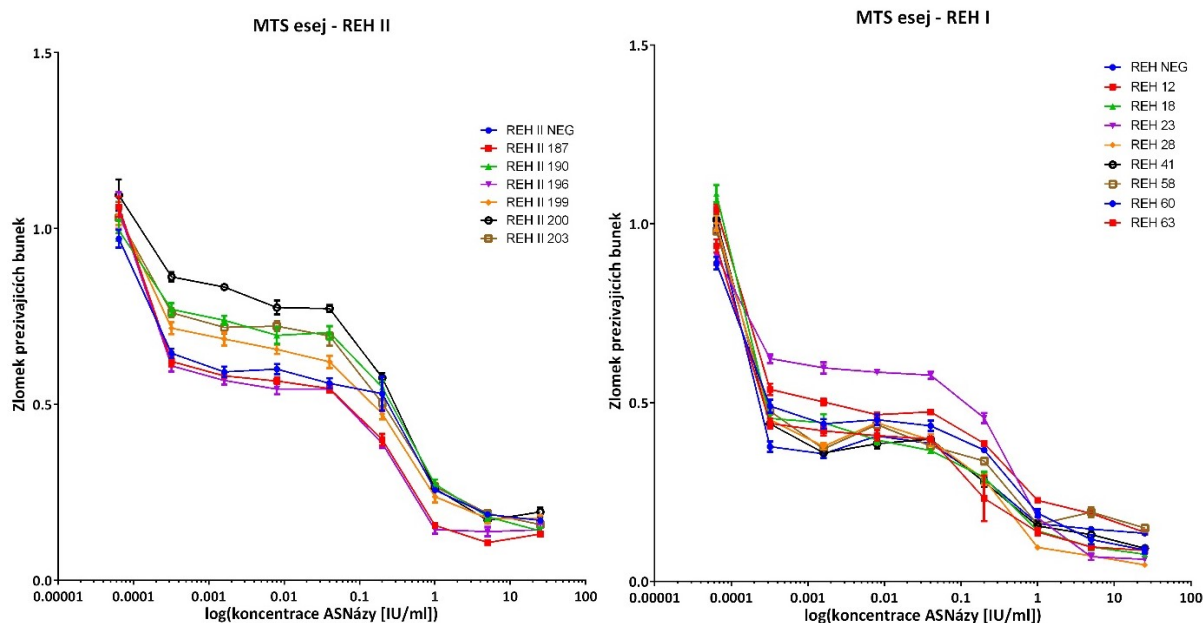
5.2.2 Senzitivita na chemoterapeutikum L-asparaginázu

Vzhledem k asociaci buněk s přítomností fúzního genu *ETV6/RUNX1* s citlivostí na chemoterapeutikum L-asparaginázu bylo předmětem výzkumu srovnat citlivost původních buněk s nově získanými knockoutními klony. Srovnání cytotoxicity bylo provedeno pomocí MTS eseje (viz 4.7 Určení buněčné viability str. 43). Použité byly koncentrace v rozsahu 0.0000025 až 25 IU/ml a inkubační doba 72 hod. Naměřené hodnoty byly normalizovány s pomocí vzorku bez přídavku ASNázy a vyjádřen byl zlomek přežívajících buněk. Experimenty byly postupně provedeny v biologickém duplikátu až kvadruplikátu pro ověření dosažených výsledků. Získaná sigmoidní křivka zobrazuje dvě znatelné oblasti poklesu viability. První nastává mezi koncentrací v řádu 0.000001–0.0001 IU/ml, druhý pak v oblasti 0.01 – 1, kde se nachází IC_{50} rezistentnějších buněk (IC_{50} = koncentrace, při které dochází k úhynu 50 % buněk). Mezi těmito oblastmi se nachází plató fáze s různou mírou viability. Pro kvantitativní posouzení citlivosti k ASNáze posloužilo již zmíněné stanovení IC_{50} . V této hodnotě byly nalezeny rozdíly, jak mezi původními liniemi a klony bez přítomnosti fúzního proteinu, tak mezi oběma liniemi REH I a REH II ($IC_{50\text{ REH I}} = 0.0168$ vs. $IC_{50\text{ REH II}} = 0.111$). Ve druhém případě se nabízí souvislosti s delecí jedné z alel genu *HIF1 α* zjištěné u REH II během analýzy SNP (viz níže). Mezi mutanty byly zjištěny klony s vyšší rezistencí, nalezeno bylo však i množství klonů s rezistencí nezvýšenou. Část těchto nálezů může být vysvětlena absencí posunu čtecího rámce u klonů 28, 46, 60 a 63, stále však zbyval nezanedbatelný počet buněk s nevysvětlenou citlivostí. Pro toto zjištění jsme se odhodlali k podrobnější genetické analýze buněk. Průměrné hodnoty IC_{50} společně se směrodatnými odchylkami jsou zobrazeny v grafu 5.3, přehled jednotlivých klonů společně

s výsledky ověření knockoutu a analýzy SNP jsou uvedeny ve shrnující tab. 5.1. Demonstrace odlišností dvojitě sigmoidní křivky reakce na L-asparaginázu je uvedena v grafu 5.4. Pro další analýzu zvoleny knockouts s nejvyšším rozdílem v IC_{50} , a tedy nejvyšší rezistencí na ASNázu: REH I 17, 23 a REH II 190 a 200.



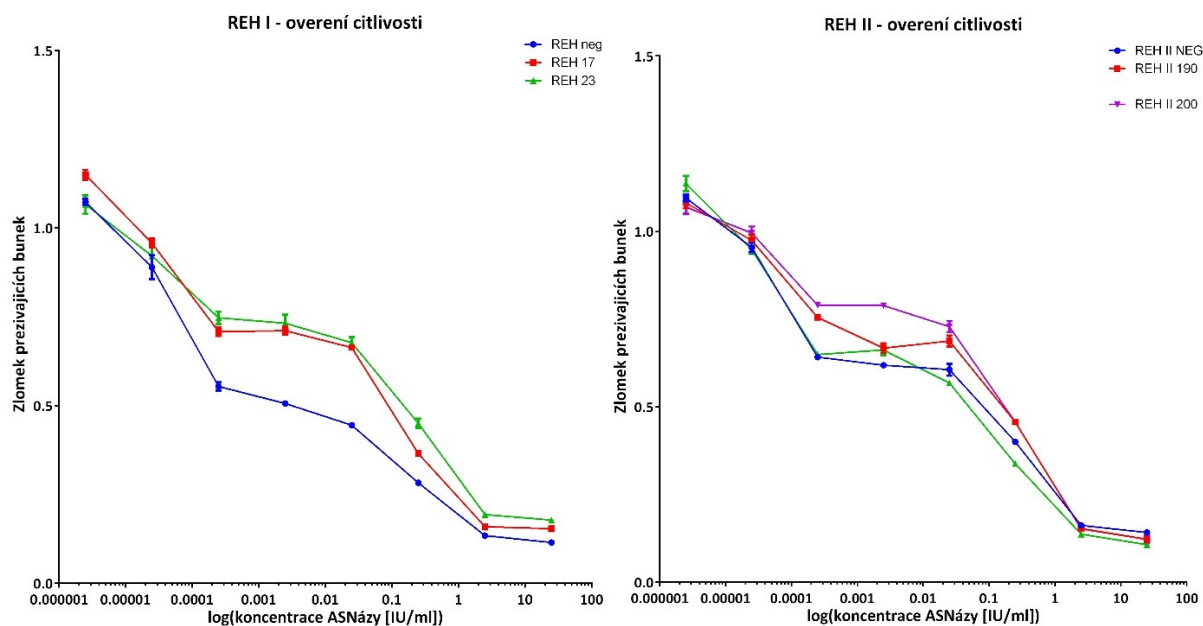
Graf 5.3: Průměrné hodnoty IC_{50} pro jednotlivé klony odvozené z REH I linie (A) a REH II linie (B) a negativní kontroly (REH I NEG, REH II NEG). Odlišnosti IC_{50} mezi negativními kontrolami a klony REH I 17, 23, REH II 190 a 200 selektovanými pro další experimenty byli statisticky významné (p -values < 0.01)



Graf 5.4: Závislost přežívání buněčných populací na koncentraci ASNázy (zobrazena na ose X v logaritmickém měřítku). Jedná se o první testování zahrnující postupně všechny vytvořené klony.

5.2.2.1 Ověření selektovaných klonů

Pro vybrané klony byla znovu ověřena vyšší rezistence na L-asparaginázu. Výsledné IC_{50} byly započítány do průměrných hodnot zobrazených v grafu 5.3 a uvedených v tabulce 5.1. Křivky závislosti buněčného přežití na koncentraci ASNázy z jednoho z provedených plikátů jsou uvedeny v grafu 5.5.



Graf 5.5. Závislost přežívání vybraných klonů a kontrolních linií na koncentraci ASNázy (zobrazena na ose X v logaritmickém měřítku). Tyto křivky pochází z procesu ověření citlivosti leukemických klonů.

Linie	Klon	Frameshift	WB protein	MTS	IC 50	SNP	mRNA
REH	REH I NEG	0	+	-	0.01679	Provedeno	100 %
	REH 12	1	-	-	0.00247	N/A	N/A
	REH 14	2	-	-	0.00044	del 5 (q34), del 16 (p11.2)	N/A
	REH 17	2	-	++	0.15515	bez významných změn	14.40%
	REH 18	1	-	-	0.00236	N/A	N/A
	REH 23	2	-	++	0.19144	bez významných změn	51.80 %
	REH 28	0	+	-	0.0025	N/A	N/A
	REH 29	0/1	+/-	++	0.04822	N/A	N/A
	REH 41	1	-	-	0.00236	N/A	N/A
	REH 45	2	-	-	0.01470	N/A	N/A
	REH 46	0	+	-	0.00031	N/A	N/A
	REH 47	2	-	-	0.01826	N/A	N/A
	REH 58	1	-	-	0.00241	N/A	N/A
	REH 60	0	+	-	0.00212	N/A	N/A
REH 63	0	+	+	0.02657	del HIF1a +/-, trizomie 22, del 16 (p11.2)	N/A	
REH II	REH II NEG	0	+	-	0.11098	del HIF1a +/- v celé linii	100 %
	REH II 187	1	-	-	0.03041	amp 11 (q22.3)	N/A
	REH II 188	1	-	+	0.16449	N/A	N/A
	REH II 190	2	-	++	0.26029	bez významných změn	45 %
	REH II 192	2	-	+	0.15245	bez významných změn	39.80 %
	REH II 194	1	-	+	0.17337	N/A	N/A
	REH II 195	1	-	-	0.07819	ztráta amp 7 (q21.2)	N/A
	REH II 196	1	-	-	0.02886	amp 2 (p16.3), del 16 (p11.2), X amp 7 (q21.2)	N/A
	REH II 199	2	-	-	0.10778	N/A	N/A
	REH II 200	2	-	++	0.22791	bez významných změn	32.20 %
	REH II 203	1	-	+	0.16892	N/A	N/A

Tab. 5.1.: Shrnující tabulka vyjadřující výsledky sekvenace (přítomnost posunu čtecího rámce), detekci proteinu, přítomnost rezistentního fenotypu při MTS eseji, IC_{50} a u vybraných klonů úbytek mRNA fúzního genu důsledkem Nonsense-mediated mRNA decay a výsledky analýzy SNP.

5.3 SNP ANALÝZA

U vybraných klonů byla provedena analýza genomu pomocí zjištění počtu kopií jednotlivých markerů na genomu ve formě SNP (single nucleotide polymorphism). Tato analýza umožňuje odhalit amplifikace a delece v genomu. Pomocí získaných dat se nám podařilo odhalit řadu genetických odlišností u jednotlivých klonů, a to zejména mutant, jež se svými chováními během MTS eseje vymykaly očekáváním.

5.3.1 Genetická identita linií REH a AT-2

Dalším zajímavým zjištěním bylo, že dodaná buněčná linie AT-2 byla z hlediska přítomných delecí a amplifikací v genomu velmi podobná linii REH a po konzultaci s MUDr. Markétou Kubričanovou Žaliovou, Ph.D. bylo vzato v úvahu, že se zřejmě jedná v obou případech jedná o buněčné linie REH (viz tab. 5.2). Tato úvaha byla později potvrzena i pracovištěm Sophia Childrens Hospital, Department of Pediatric Oncology, ze kterého byla linie získána. Mezi těmito liniemi však existovaly rozdíly na chromozomech 14, 21 a X. Zejména delece genu HIF1A na chromozomu 14 se může projevit v přežívání buněk za stresových podmínek a jejich metabolické aktivitě, a proto jsme se rozhodli pokračovat v experimentech s oběma liniemi, přičemž druhou z nich jsme přeznačili na REH II.

5.3.2 Genomické změny v mutantních liniích

Co se týče vysvětlení neočekávaných výsledků MTS eseje, u klonu REH 14 byla zjištěna delece q34 na 5. chromozomu, asociována s vyšší citlivostí na ASNázu a rozsáhlejší delece na 6. chromozomu zahrnující 6 genů vč. TGF- β 1 a transportéru pro glukózu. U klonu REH 63 bylo nalezeno několik změn, včetně delece HIF1A a trizomie chromozomu 22. Klon REH II 187 obsahoval rozsáhlou amplifikaci na chromozomu 11 zahrnující desítky genů vč. několika kaspáz a u klonu 196 byla zjištěna amplifikace p16.3 oblasti chromozomu 2 a opět delece p11.2 chromozomu 16. U klonů 195 a 196 byla dále prokázána ztráta amplifikace na chromozomu 7, zahrnující gen CDK6, účastníci se regulace buněčného cyklu. Klony 17, 23, 190, 192 a 200 byly bez významnějších genetických změn oproti negativním kontrolám. Shrnutí uvádím v tab. 5.2.

Všechny klony	Delece 3: p22.3p14.2, q13.2 (oba ch), q26.32 – celkem desítky genů Delece 4: q22.1 Delece 5: q23.2q23.3, q31.3 Delece 7: p14.1, q34 – IG/TCR rekombinace Delece 9 (oba ch): p24.3, p21.3 Delece 12: p13.2, q21.33 Amplifikace 16: p13.3, q24.3 – desítky genů vč. TSC2 Delece 16: q23 Amplifikace 21: q22.12, q22.3 – desítky genů vč. CBR1 a CBR3 Delece X: p22.33, q28
REH 14	Delece 5: q34 – asociováno s citlivostí na ASNázu Delece 16: p11.2 - ARMC5, TGF-β1 – tumor supresorové geny - SLC5A2 (→SGLT2)
REH 63	Ztráta kopie HIF1A na ch 14 Trizomie ch 22 Delece 16: p11.2 - ARMC5, TGF-β1 – tumor supresorové geny - SLC5A2 (→SGLT2)
REH 17 a 23	Bez genetických výjimečností oproti REH I neg
REH 187	Rozsáhlá amplifikace na ch 11: q22.3 – desítky genů vč. několika kaspáz
REH 196	Amplifikace 2: p16.3 Delece 16: p11.2 - ARMC5, TGF-β1 – tumor supresorové geny - SLC5A2 (→SGLT2) Ztráta amplifikace 7: q21.2 – gen CDK6
REH 195	Ztráta amplifikace 7: q21.2 – gen CDK6
REH 190, 192, 195 a 200	Bez genetických výjimečností oproti REH I neg
REH II (vs REH I)	Ztráta kopie HIF1A na ch 14 Delece X: p21.1 Krátká delece na ch 21 bez významu

Tab. 5.2: Zjištěné genetické abnormality u jednotlivých klonů

Jak je patrné z našich zjištění, buněčná linie REH není geneticky striktně homogenní a během single cell sorting procesu, jež je součástí procesu tvorby knockoutu pomocí CRISPR/Cas9 může dojít k vyselektování subklonů, které mohou ovlivnit výsledky dalších pokusů. Tato nehomogenita genetické informace byla zajímavým zjištěním a faktorem, který je třeba zohlednit při plánování experimentu.

5.4 BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Při detekci změn v signalizaci byl kladen důraz na analýzu drah mTORC1 a mTORC2, které se rozhodujícím způsobem podílí na detekci extracelulární hladiny aminokyselin a v návaznosti na regulaci buněčného metabolismu, proteosyntézy a syntézy nukleotidů. Analýza byla provedena pomocí detekce přítomnosti a fosforylace proteinů nacházejících se downstream od komplexů (CAD, S6, P70S6K, eIF4E-BP1), markerů apoptózy (štěpený PARP) a proteinu Akt účastnícího se signalizace upstream od mTORC1 a regulační zpětné vazby mTOR, enzymu ACC regulujícího intenzitu FAO a FAS a markerů fagocytózy, Beclin1 a Atg5. Jako kontrola nanesení proteinu a pro účely normalizace dat byl použit β-aktin, exprimovaný univerzálně v buňkách lidského těla.

5.4.1 Vliv treatmentu na signalizaci a hladiny proteinů

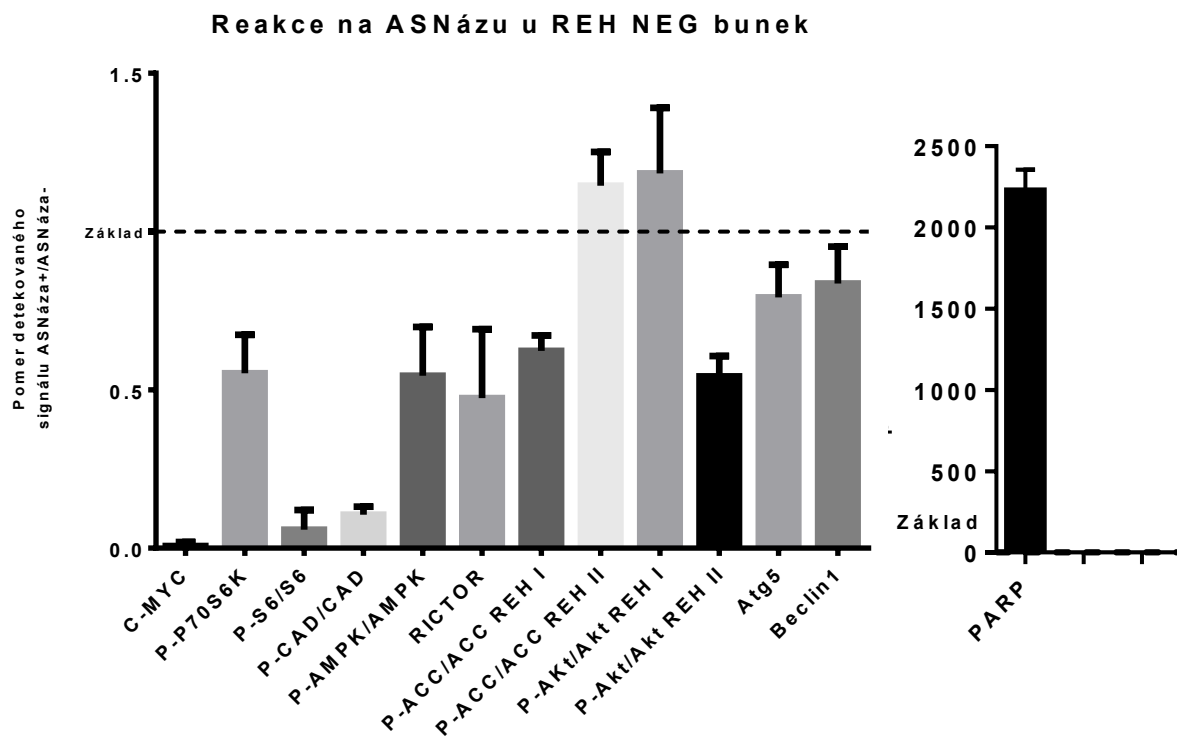
Jasně viditelné jsou rozdíly mezi buňkami před a po ošetření médiu L-asparaginázou. Rozdíly jsou shrnuty v grafu 5.6 a 5.7 a na obrázku 5.3. Všechny dále uvedené změny byly statisticky signifikantní (p-value <0.01), pokud není uvedeno jinak.

5.4.1.1 Nárůst proteinu/fosforylace

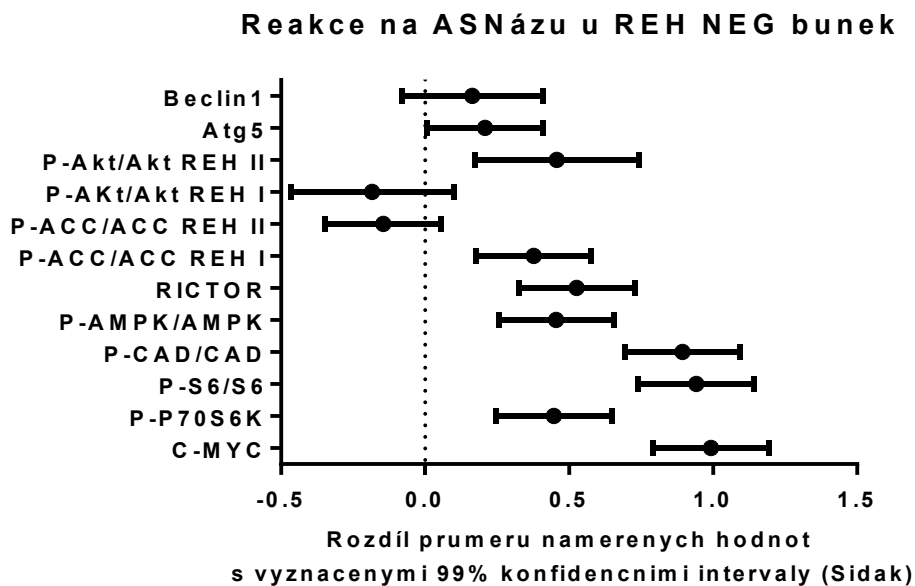
Byl pozorován zvýšený výskyt štěpené verze proteinu *PARP* (poly(ADP-ribóza) polymeráza; protein hrající roli v signalizaci poškození DNA a jeho nápravě, během apoptózy je štěpen na fragmenty 24 a 89 kDa činností kaspáz 3 a 7).

5.4.1.2 Pokles proteinu/fosforylace

Naopak k poklesu fosforylace dochází u proteinů *CAD* (karbamoylfosfát syntetáza 2, aspartát transkarbamylyláza, a dihydroorotáza; multidoménový enzym hrající roli v prvních třech krocích syntézy pyrimidinových nukleotidů), *S6* (ribosomální protein 6; účastní se regulace translace, aktivován fosforylací kinázou *P70S6K*), *P70S6K* (ribosomální protein S6 kináza β-1, kinázový protein aktivovaný přímo fosforylací komplexem mTORC1, sám fosforyluje protein mj. S6 a aktivuje tím translaci), *AMPK* (AMP aktivovaná protein kináza; důležitý regulátor buněčného metabolismu v závislosti na dostatku energie, aktivována fosforylací a alostericky AMP, resp. zvýšeným poměrem AMP:ATP, jež zabraňuje defosforylací, sama negativně reguluje mj. mTORC1 a ACC a pozitivně Beclin1), *ACC*, u kterého statisticky významný pokles fosforylace nastal pouze u linie REH I (Acetyl-CoA karboxyláza; katalyzuje karboxylaci acetyl-CoA na malonyl-CoA, čímž umožňuje syntézu mastných kyselin, inaktivována fosforylací mj. kinázou *AMPK*), a snížení koncentrace proteinů C-Myc (transkripční faktor pozitivně ovlivňující buněčnou proliferaci a přežívání, exprese snížena mj. aktivací mTORC1, mTORC2 a Akt, fosforylací translačního regulátoru eIF4B a deacetylací a fosforylací transkripčního faktoru FoxO1), Beclin1 (p-value > 0.01; protein účastní se aktivace autofagie a apoptózy, přímo aktivovaný *AMPK* a nepřímo inhibovaný mTORC1), Atg5 (protein nutný pro tvorbu autofagických vezikul a indukci autofagicky navozené buněčné smrti, jeho funkce je však komplexní a může translokací do jádra a interakcí se Survivinem působit protiapoptoticky, regulován je řadou signalizačních proteinů) a RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin, součást komplexu mTORC2, pozitivně reguluje Akt a autofagii). Statisticky významný pokles fosforylace nastal u linie REH II také u proteinu Akt. Tyto nálezy jsou konzistentní s dřívějšími zjištěními mediování účinků L-asparaginázy skrze mTORC1 signalizační dráhu, přičemž inhibice této signalizace zvyšuje účinnost tohoto chemoterapeutika in vitro (Ivana Heřmanová, 2015). Tyto dřívější poznatky, stejně jako naše výsledky ukazují na klíčovou roli mTORC1 v reakci na toto chemoterapeutikum.



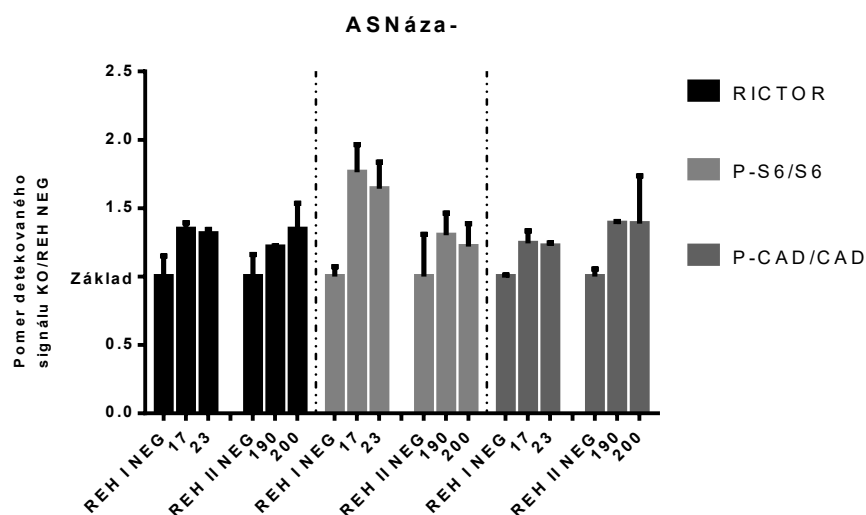
Graf 5.6: Změny v expresi a fosforylaci genů v reakci na ošetření média ASNázou u původních buněk (REH I neg, REH II neg). U proteinu S6 klesla hladina fosforylace po přidavku L-asparaginázy pod detekční limit přístroje.



Graf 5.7: Demonstrace signifikance změn v proteinové expresi a fosforylaci. Zobrazeny jsou odlišnosti průměrů jednotlivých statistických vzorků dat a 99 % konfidencní intervaly získané testem dle Sidaka. Signifikantní změny byli nalezeny pro všechny proteiny s výjimkou Beclin1 a fosforylací Akt a ACC u linie REH II.

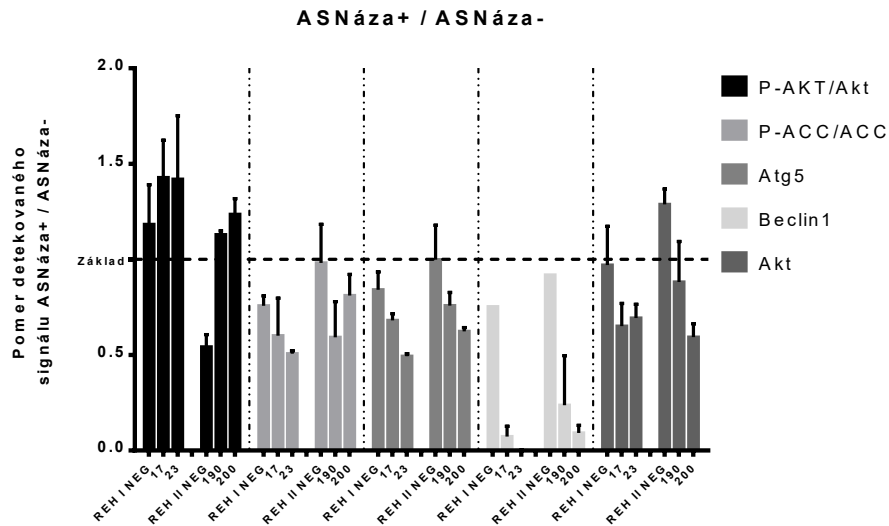
5.4.2 Vliv knockoutu fúzního genu na buněčnou signalizaci

Nepřítomnost fúzního genu však ve většině případů neovlivnila významně většinu ze sledovaných proteinů. Zvýšená byla bazální fosforylace CAD (poměr P-CAD/CAD) a S6 (poměr P-S6/S6) před ošetřením média L-asparaginázou (viz graf 5.8).

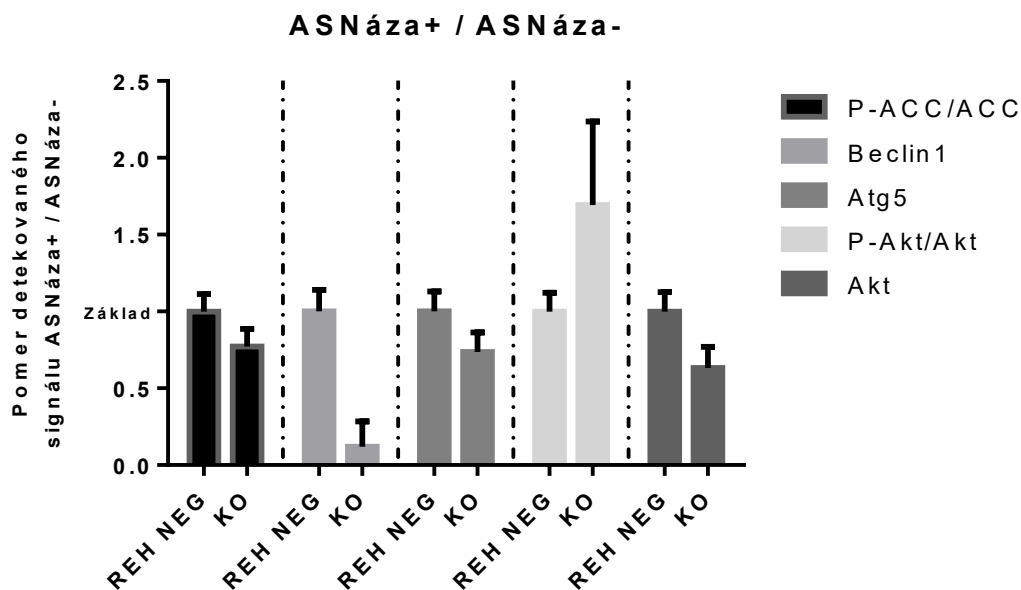


Graf 5.8: Signalizační rozdíly po odstranění fúzního proteinu před přidáním ASNázy. Patrný je nárůst aktivační fosforylace proteinů S6 a CAD u obou linií. Zvýšená fosforylace S6 byla statisticky významná (p-value <0.01), rozdíl fosforylace CAD ležel pak na hranici statistické významnosti (p-value 0.053) a rozdíl v koncentraci RICTOR statisticky významný nebyl.

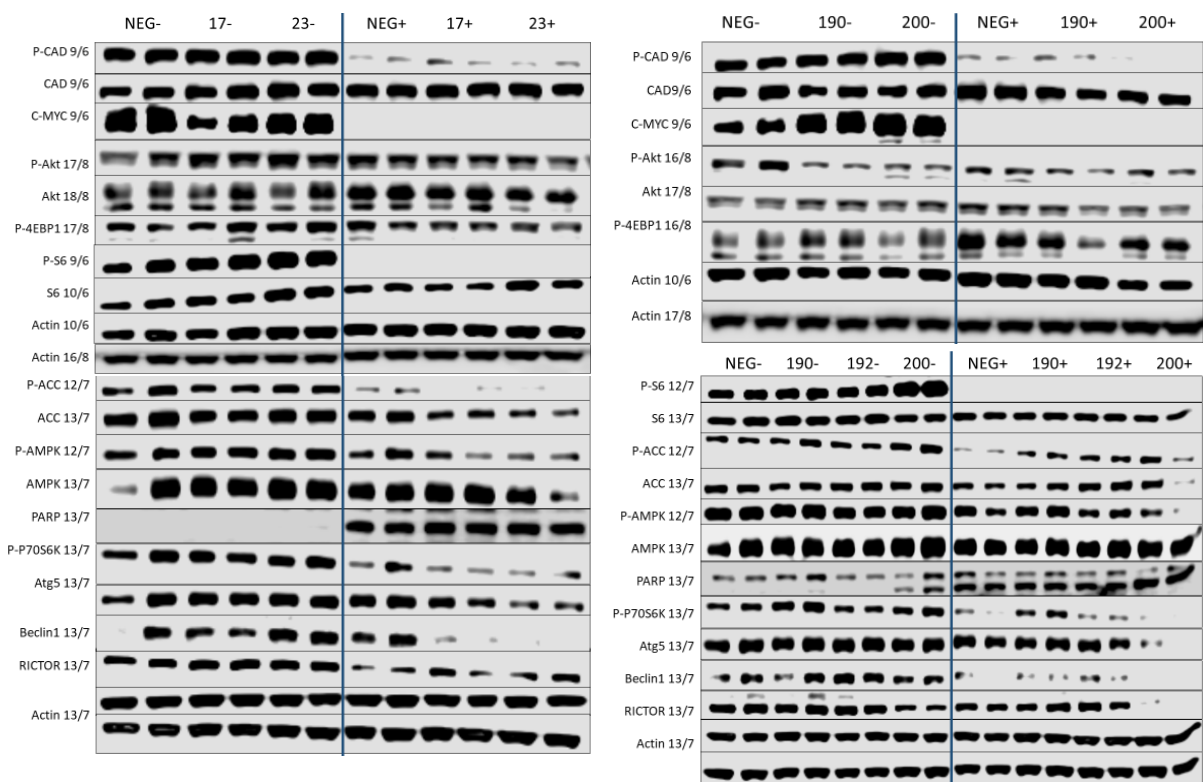
V reakci na kultivaci s ASNázou byla pozorována výraznější odpověď u mutantních buněk v případě poklesu proteinů Beclin1 (p-value <0.01) a Atg5 (p-value 0.083) asociovaných s autofagocytózou, nárůst fosforylace Akt (p-value <0.01) (oproti stagnaci, či poklesu u kontrolních linií), jež se významně podílí na regulaci dráhy mTOR a sama je regulována oběma komplexy mTORC1 a mTORC2. Naopak v případě celkové koncentrace proteinu Akt došlo v odpovědi na léčivo k poklesu (p-value <0.05). Mírný, avšak konzistentní, rozdíl v reakci na chemoterapeutikum byl zaznamenán i u fosforylace proteinu ACC, jež inhibuje jeho funkci a facilituje FAO. Tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti (p-value > 0.05). Uvedené rozdíly jsou uvedeny v grafech 5.9 a 5.10.



Graf 5.9: Změna celkové koncentrace jednotlivých proteinů v reakci na ASNázu, či jejich fosforylované frakce. K poklesu dochází u proteinů Atg5, Beclin1, Akt a P-ACC, naopak nárůst byl pozorován ve fosforylaci Akt.



Graf 5.10: Relativní zobrazení změny celkové koncentrace jednotlivých proteinů v reakci na ASNázu, či jejich fosforylované frakce vztažený ke změně detekované u kontrolních REH NEG klonů. K poklesu dochází u proteinů Atg5, Beclin1, Akt a P-ACC, naopak nárůst byl pozorován ve fosforylaci Akt.



Obr. 5.3: Zobrazení výsledků Western blotu před kvantifikací. Nalevo jsou znázorněny klony REH 17 a REH 23 s negativní kontrolou, napravo pak klony REH II 190, 192 a 200 s negativní kontrolou. *NEG-* = Negativní kontrola bez přítomnosti ASNázy, *NEG+* = negativní kontrola kultivovaná v přítomnosti ASNázy. Obdobně pro ostatní klony.

5.5 METABOLICKÝ PROFIL BUNĚK

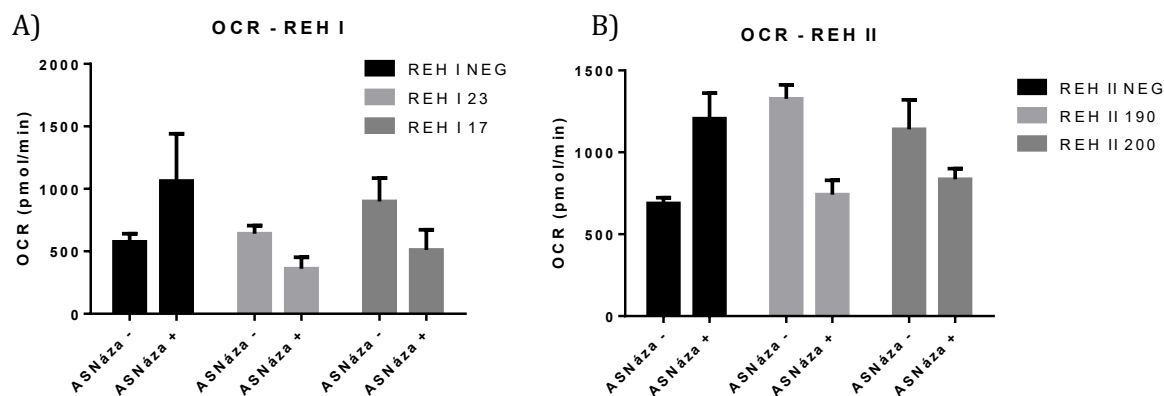
Metabolismus buněk byl monitorován pomocí dvou kategorií metod: S využitím přístroje Seahorse umožňující automatické přidávání účinných látek k adherovaným buňkám a pomocí radioaktivních esejí detekujících intenzitu metabolismus vybraných živin za předem zvolený časový úsek.

5.5.1 Seahorse

Analýza proběhla na 24 jamkové destičce na pracovišti Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR na přístroji Agilent Seahorse XF24. Přístroj byl použit pro zhodnocení mitochondriálního metabolismu oxidativní fosforylace. Při použití speciálního média bohužel bylo opomenuto, že toto médium neobsahuje neesenciální kyseliny a aminokyselina asparagin nebyla do média dodána což snižuje hodnotu získaných výsledků.

V reakci na přidání chemoterapeutika L-Asparaginázi bylo u kontrolních nemutovaných buněk zjištěno zvýšení maximální respirační kapacity. Toto zjištění je v souladu s předchozím výzkumem provedeným laboratoří (Ivana Heřmanová, 2015). Naopak nesouhlasí s výzkumem publikovaným (Takahashi et al., 2017). Zajímavou změnou byl však pokles maximální OCR po

přidání ASNázy u mutovaných buněk, jedná se se o opačnou reakci než u buněk s přítomností fúzního proteinu. Tento rozdíl je ve všech případech statisticky významný (p-value <0.01). Výsledky monitorace OCR po přidání rozpřahovače dýchacího řetězce jsou zobrazeny na grafu 5.11.

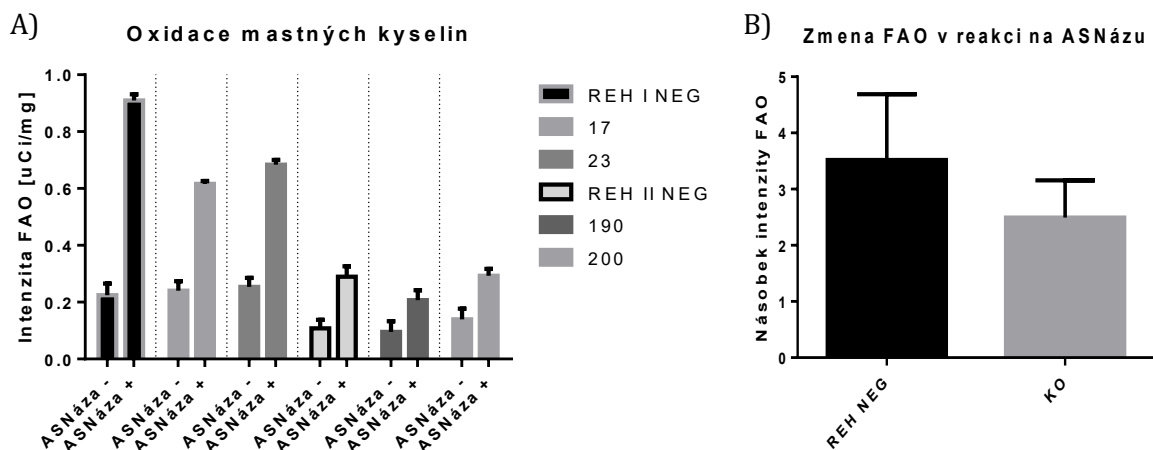


Graf 5.11: Změna maximální konzumce kyslíku u klonů REH I 17 a REH I 23 (A) a REH I 190 a REH I 200 (B) kontrolní linie v závislosti na kultivaci s ASNázou. Tento ukazatel indikuje aktivitu oxidativní fosforylace buněčných mitochondrií.

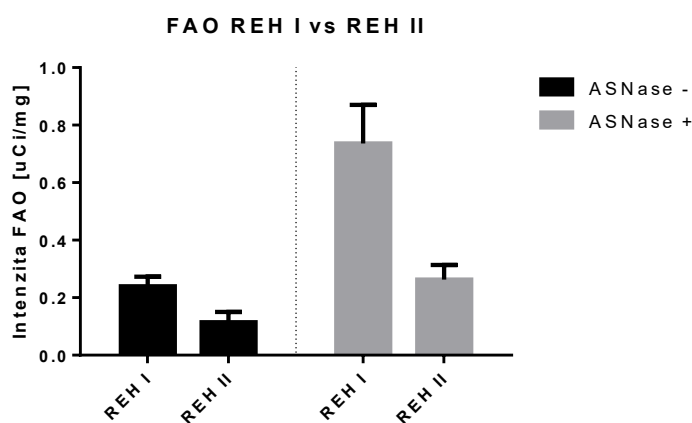
5.5.2 Oxidace mastných kyselin

Při experimentech zjišťujících intenzitu oxidativního metabolismu mastných kyselin (FAO) bylo využito faktu, že radioaktivní tritium z hydrofobní kyseliny palmitové (doplit 256 kDa) je přeneseno na nízkomolekulární H_2O volně propustnou připravenou kolonou. Doba inkubace činila 16 hod a ASNáza byla přidána do finální koncentrace 4 IU/ml.

Při ošetření média L-asparaginázou došlo k výraznému vzestupu FAO, jak je demonstrováno na grafu 5.12 A), ve všech případech byla změna FAO statisticky signifikantní (p-value <0.01). Za povšimnutí stojí rozdílná intenzita mitochondriální oxidace mastných kyselin u linií REH I a REH II související zřejmě z přítomností genetické variability mezi liniemi. Vzestup FAO byl intenzivnější v kontrolních buňkách s přítomností fúzního genu (REH I neg a RAH II neg), než v buňkách bez přítomnosti fúzního genu, jak je vyobrazeno v grafu 5.12 B). Rozdíl míry vzestupu FAO mezi knockoutními klony a negativními kontrolami byl statisticky významný (p-value <0.05). Zajímavým zjištěním byla i významná odlišnost aktivity FAO mezi liniemi REH I a REH II, a to bez i s přítomností ASNázy v médiu (p-value <0.01) zobrazená na grafu 5.13.



Graf 5.12: **A)** Změna intenzity oxidace mastných kyselin v reakci na kultivaci buněk s ASNázou. Ve všech případech dochází k nárůstu FAO, který je výraznější u negativních kontrol. Zároveň je z grafu patrný rozdíl v intenzitě FAO mezi liniemi REH I a REH II. **B)** Relativní změna FAO po přidání ASNázy do média. Intenzita oxidace mastných kyselin je vztažena k aktivitě FAO buněk kultivovaných bez přítomnosti chemoterapeutika.

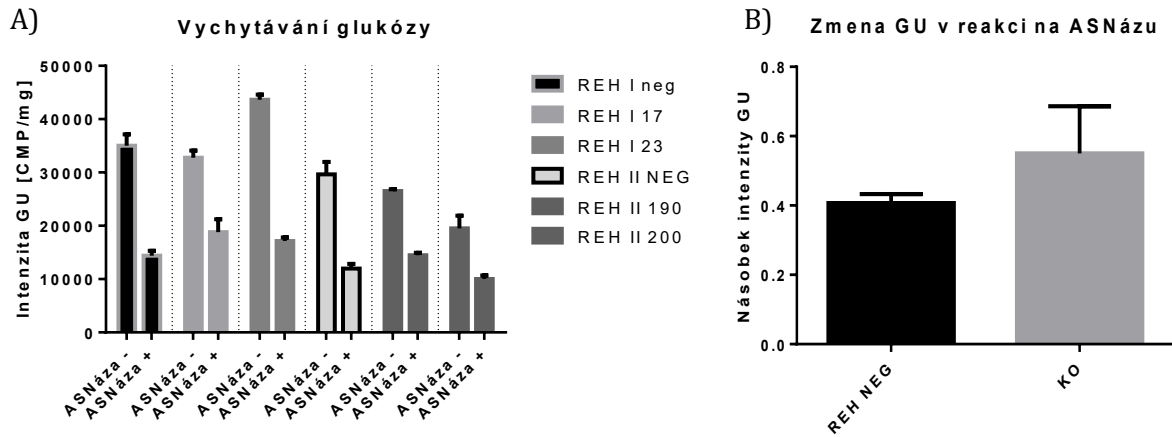


Graf 5.13: Pozorovaný rozdíl v intenzitě FAO před i po podání ASNázy mezi liniemi REH I a REH II

5.5.3 Vychytávání glukózy z média

Vychytávání glukózy z média bylo založeno na detekci radioaktivního metabolitu deoxyderivátu tohoto sacharidu, jež byl akumulován v buňkách. Doba inkubace i koncentrace ASNázy byly totožné s radioaktivní esejí použitou pro určení FAO.

Opět jsme zjistili výrazné a konzistentní snížení vychytávání glukózy z média po přidání L-asparaginázy. Za většiny okolností přenos glukózy intracelulárně dobře odpovídá jejímu metabolickému využití. Pokles utilizace glukózy z média byl výraznější u knockoutů REH 17, REH 190, REH 192 a REH 200 ve srovnání s původními klony. Získané výsledky odpovídají dobře snížení exprese c-Myc jako jednoho z účinných regulátorů glykolýzy.



Graf 5.14: **A)** Změna vychytávání glukózy v závislosti na přítomnosti L-asparaginázy v médiu. Po přidání chemoterapeutika nastává pokles vychytávání glukózy, který je s výjimkou klonu REH I 23 méně výrazný u buněk postrádajících fúzní protein ETV6-RUNX1. Ve všech případech je modulace vychytávání glukózy v reakci na chemoterapeutiku statisticky významná (p-values <0.01). **B)** Změna rychlosti vychytávání glukózy z média je výraznější u buněk postrádajících fúzní protein (p-value <0.01).

6 DISKUSE

I přes výrazný pokrok v léčbě dětské leukemie v posledních desetiletích se stále toto onemocnění části pacientů stává fatálním. Nezanedbatelnou roli na tomto faktu hraje vznik rezistence na chemoterapeutika včetně L-asparaginázy. Mechanismus rezistence však stále není plně objasněn a existuje několik teorií jejího vzniku. Citlivost na toto chemoterapeutikum je silně asociována s přítomností fúzního genu ETV6/RUNX1, jehož přítomnost je zároveň pozitivním prognostickým faktorem. Role tohoto fúzního genu ve vzniku preleukemického klonu prenatalně byla do značné míry objasněna, stejně jako jeho postradatelnost v pozdějších fázích udržení leukemického klonu. Naší otázkou tedy bylo, zda funkce produktu ETV6/RUNX1 přesahuje rámec indukce leukemického zvratu hematopoetických buněk a jakou roli tento protein hraje v udržování citlivosti na ASNázu. Zároveň nás zajímala i analýza změn buněk v absenci fúzní bílkoviny a snížení citlivosti na L-asparaginazu, která by mohla objasnit vznik rezistence na toto chemoterapeutikum.

6.1 VYTVOŘENÍ KNOCKOUTU FÚZNÍ GENU ETV6/RUNX1 A OVĚŘENÍ ZÍSKANÝCH KLONŮ

Vytvoření knockoutu pomocí systému CRISPR/Cas9 proběhlo úspěšně, jak bylo ověřeno na úrovni DNA (Sangerova sekvenace), mRNA (qPCR) i proteinu (Western-blot). Přítomnost proteinu jako nejdůležitějšího ukazatele úspěšnosti mutagenese byla skutečně prokázána pouze u negativních kontrol a mutant bez vytvoření posunu čtecího rámce. Pro zajímavost byla provedena i kvantitativní detekce mRNA fúzního genu, která vykazovala více než 50% pokles u všech testovaných klonů oproti negativním kontrolám, což svědčí o degradaci disfunkční mRNA pomocí mechanismu nonsense-mediated mRNA decay.

6.2 CYTOTOXICKÁ MTS ESEJ A BUNĚČNÁ PROLIFERACE

Od počátku bylo potvrzeno předchozí zjištění laboratoře, že fúzní protein genu ETV6/RUNX1 není nutný pro přežívání a proliferaci plně immortalizovaných leukemických blastů. Důkazem byl již pouhý fakt, že i po knockoutu ETV6/RUNX1 jsme byli schopni vytvořit a udržet monoklonální mutantní kultury buněk. I během měření proliferační rychlosti nebyla nalezena signifikantní spojitost mezi přítomností fúzního proteinu a průměrným časem duplikace buněk v suspenzi. Fúzní gen tedy facilituje vznik leukemické proliferace, dle výsledků našich pozorování však není nutný pro její udržení.

Během testování cytotoxicity ASNázy na jednotlivé klony pomocí MTS eseje bylo dosaženo smíšených výsledků. Pro vyhodnocení bylo použito určení koncentrace, při které 50 % buněk není schopno přežít, tzv. IC50, jehož zvýšení ukazovalo na nárůst rezistence leukemických

blastů. Porovnáním poměrů viabilních buněk bylo možné odlišit rezistentnější linie. Část mutantních kultivátů vykazovala zvýšenou rezistenci k chemoterapeutiku, avšak nezanedbatelný podíl knockoutů si zachoval citlivost, či projevoval dokonce citlivost vyšší. Tato senzitivita k L-asparagináze nebyla plně vysvětlena nepřítomností posunu čtecího rámce u některých z vytvořených mutantních monoklonálních kultur. Na podkladě tohoto zjištění byla provedena genetická analýza jednotlivých buněčných linií pomocí analýzy SNP, která vrhla světlo na tento problém.

REH II linie a subklony z ní vzniklé vykazovaly vyšší rezistenci k ASNáze než REH I buňky. To mohlo být zapříčiněno genetickými odlišnostmi obou linií, zejména pak monoalelickou delecí HIF1 α v případě REH II, jež je spjata s nižší citlivostí na chemoterapeutikum (nepublikovaná data skupiny CLIP).

6.3 SNP MICROARRAY

U klonu REH I 14 byla objevena delece q34 na chromozomu 5, která je asociovaná s vyšší citlivostí na ASNázu (nepublikovaná data skupiny CLIP) U klonu REH I 63, kde byla produkce fúzního proteinu zachována, byly nalezeny četné aberace včetně trizomie chromozomu 22, a delece HIF1A. Obě tyto změny mohou být potenciálně zodpovědné za pozorovanou vyšší rezistenci k depleci asparaginu a glutaminu. V případě klonu REH II 187 byla nalezena rozsáhlá amplifikace na chromozomu 11 v oblasti q22.3 zahrnující mimo jiné několik genů pro kaspázy. U klonů REH II 195 a 196 jsem pozoroval ztrátu amplifikace oblasti q21.2 na chromozomu 7 obsahující mj. i gen CDK6 pro cyklin dependentní kinázu účastnící se regulace buněčného cyklu. Klon 196 navíc vykazoval delecí rozsáhlé oblasti na chromozomu 16 obsahující transportér glukózy SLC5A2, predilekčně exprimovaný především v ledvinách a tumor supresorové geny ARMC5a TGF- β 1. Těmito nálezy se podařilo vysvětlit neočekávaně vysokou citlivost k použitému chemoterapeutiku v případě klonů REH I 14, REH II 187, 195 a 196 a naopak mírný nárůst rezistence klonu REH I 63 bez přítomnosti indukované mutace ve fúzním genu. Naproti tomu u klonů REH I 17 a 23 a REH II 190, 192 a 200 nebyly nalezeny žádné signifikantní genetické odlišnosti oproti kontrolám, což byla pozitivní informace pro pokračování v dalších experimentech. Toto zjištění totiž zvyšuje pravděpodobnosti, že změna v citlivosti k ASNáze byla způsobena knockoutem fúzního genu ETV6-RUNX1. Chromozomální aberace tedy vysvětlují nesrovnalosti v citlivosti získaných mutant na L-asparaginázu ve srovnání s negativními kontrolami.

Neočekávanou informací pro nás bylo podezření doktorky Markéty Žaliové PhD., že dvě buněčné linie se kterými jsme pracovali pochází ve skutečnosti z jedné původní kultury. V obou případech se jednalo o buněčnou linii REH. Omyl nastal při dodání druhé buněčné linie

z partnerské laboratoře v Nizozemsku. Ačkoliv se mělo jednat o linii AT-2, po konzultaci a ověření v partnerské laboratoři bylo potvrzeno, že skutečně došlo k záměně za leukemické buňky REH a buňky byly přeznačeny jako „REH II“. Bez zajímavosti však jistě nejsou odlišnosti zjištěné mezi oběma liniemi, které mohou vysvětlovat odlišnosti v jejich chování během MTS eseje i metabolických experimentů. Ačkoliv se jedná o buněčnou kulturu z jednoho počátku, v průběhu dlouhodobého pasážování došlo zřejmě subklonální expanzí k evoluci obou linií, jež získaly genetické odlišnosti. Během SNP analýzy vyšlo najevo, že REH II se oproti REH I vyznačují přítomností delece HIF1A na chromozomu 14 a krátké delece oblasti p21.1 na chromozomu X. Mikrodelece na X zasahuje pouze gen DMD a neměla tudíž význam pro další experimenty, delece HIF1A je však významná, jelikož tento gen ovlivňuje citlivost na L-asparaginázu. I přes totožný původ linií jsme se tedy po přeznačení rozhodli s oběma pokračovat. Pozoruhodným zjištěním pro mě zůstává genetická nehomogenita a proměnlivost nádorových linií, která může mít dopad na výsledky experimentů i jejich replikovatelnost s použitím neidentických kultur stejného původu.

6.4 BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Pro pozorování buněčné signalizace, apoptózy a autofagie byla zvolena metoda Western blot s použitím vhodných protilátek. Cíle monitorace signalizace byly rozděleny do čtyř skupiny: mTOR dráha, nutriční stav buňky a metabolismus, markery apoptózy a markery autofagie.

Na aktivitu mTORC1 dráhy bylo usuzováno z detekce proteinů S6 a p70S6K a jejich fosforylovaných forem, jejichž procentuální zastoupení zároveň koreluje s proteosyntetickou aktivitou buňky. V případě komplexu mTORC2 byla detekována koncentrace proteinu RICTOR, jež je nutnou součástí této multiproteinové struktury.

Pro detekci nutričního stavu buňky bylo mimo určení činnosti mTORC1 a mTORC2 využito stanovení fosforylace proteinu AMPK jež pozitivně koreluje s nedostatkem ATP. Fosforylace CAD pak umožňuje syntézu pyrimidinových nukleotidů a umožnilo tedy odhadnout intenzitu nukleosyntézy jako jednoho z důležitých markerů proliferace a klíčového markeru buněčného přežívání (Schulze and Harris, 2012). Přítomnost fosforylované formy proteinu ACC zvyšuje buněčnou produkci malonyl-CoA, jež inhibuje FAO. Úroveň fosforylace enzymu byla tedy použita jako negativní marker intenzity katabolického procesu oxidace mastných kyselin. Funkce Akt v buňce je komplexní. Nicméně jeho fosforylace je korelována s anabolickými procesy buněčného růstu, integrací pozitivních růstových signálů z extracelulárního prostředí a v případě fosforylované isoformy Akt2 dochází i k inhibici autofagie (Kang et al., 2011). C-myc byl monitorován pro jeho významnou roli v onkogenezi, anabolickém a proliferačním chování buněk a glykolýze (Smith et al., 2005).

Protein PARP je štěpen během apoptózy a detekce štěpných produktů této reakce posloužilo jako marker buněčné smrti v reakci na ASNázu.

Proteiny Atg5 a Beclin1 se účastní spouštění procesu autofagie a formování autofagických vezikul a jejich koncentrace tedy v mojí práci slouží jako ukazatel autofagické destrukce buněčných kompartment, jež bylo ukázáno jako klíčové pro indukci buněčné smrti v reakci na ASNázu.

6.4.1 Buněčná odpověď na L-asparaginázu

Zde popisují rozdíly v buněčné signalizaci v absenci a přítomnosti L-asparaginázy pozorované u kontrolních nemutovaných buněk. Odlišnosti mutant budou diskutovány v následující podkapitole. Reakce buněčných linií na ošetření média L-asparaginázou na úrovni monitorovaných signalizačních proteinů u kontrolních nevybočovala ze zjištění jiných pracovních skupin i předchozích výsledků pracovní skupiny CLIP.

Buňky na nedostatek asparaginu a glutaminu reagovali výrazným snížením aktivity mTORC1 projevujícím se snížením fosforylace p70S6K na 55 % původních hodnot a rovněž snížením fosforylace S6 až na nedetekovatelné hodnoty, což ukazuje na rozhodnou inhibici proteosyntézy a snahu o konzervaci zásoby aminokyselin. Bylo pozorováno též snížení koncentrace proteinu RICTOR o 53 %, svědčící o poklesu funkce komplexu mTORC2.

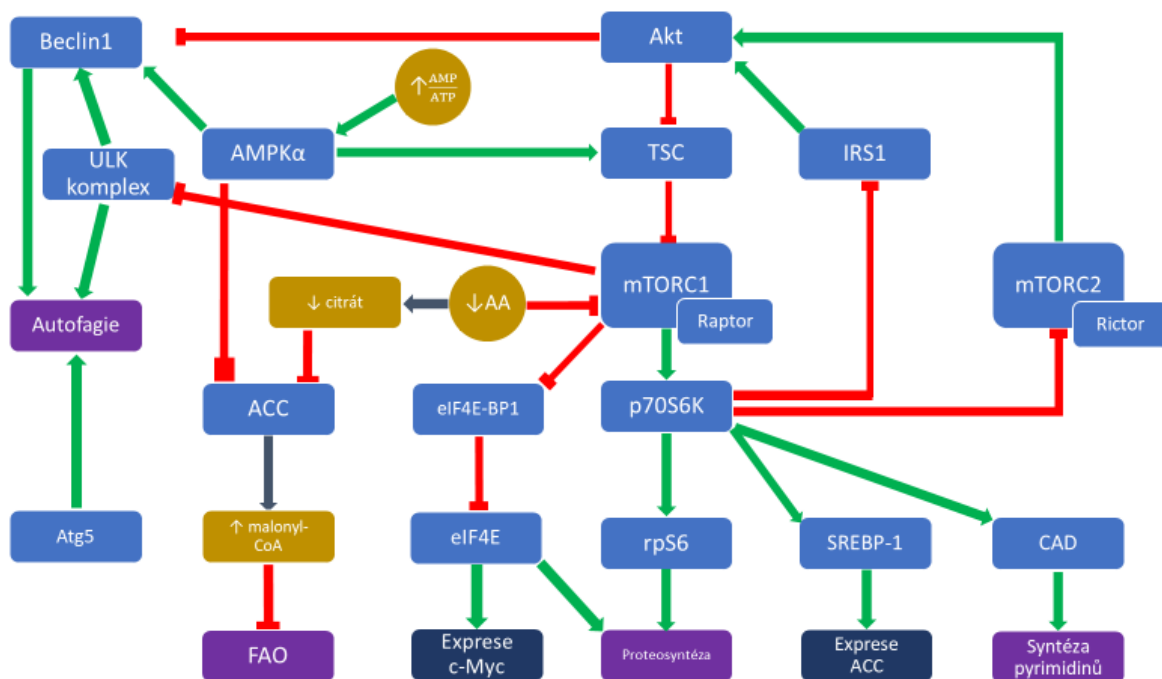
Fosforylace AMPK α byla opakovaně po přidavku ASNázy snížena, což naznačuje, že k snížení aktivity mTORC1 nedochází prostřednictvím zvýšení AMP a stimulace AMPK α . Stejně tak byla mírně snížena i koncentrace proteinu ACC, což mohlo mít podíl na zvýšení degradace mastných kyselin mitochondriální oxidací, jak bylo ukázáno během metabolické části práce. Exprese ACC je regulována mj. proteinem PPAR α , jež je inhibován komplexem mTORC1. Fosforylace ACC byla mírně snížena po přidavku ASNázy (více v případě REH I linie a), přičemž snížení bylo výraznější u buněk postrádajících fúzní gen ETV6/RUNX1 (diskutováno níže). Vzhledem k pouze lehkému snížení exprese ACC viditelné v našich experimentech je pravděpodobné, že pozorované zvýšení FAO po přidání ASNázy je zapříčiněno jiným mechanismem. V tomto případě by se mohlo jednat o alosterickou inhibici nedostatečnou koncentrací citrátu, jež nemůže být získáván zpracováním deficientních aminokyselin anaplerotickými drahami. Snížení exprese ACC může být vysvětleno i interakcí mTORC1 s transkripčním faktorem SREBP-1, zřejmě skrze protein p70S6K (Zoncu et al., 2011) a jeho následnou aktivací. Po snížení činnosti komplexu mTORC1 tedy došlo i k snížení celkového obsahu enzymu ACC.

Hladina c-myc klesla blízko detekční mezí metody, což si vysvětlují celkovou inhibicí proteosyntézy a relativně krátkým poločasem života proteinu c-myc. Pokles transkripčního

faktoru mohl způsobit i snížené vychytávání glukózy pozorované v metabolických experimentech.

Akt (PKB) hraje v buněčné signalizaci komplexní roli a účastní se mj. regulace proliferace, buněčného přežití, detekce stavu živin a aktivace autofagie. Pro můj výzkum je mimořádně důležitá negativní zpětná vazba Akt skrze aktivaci mTORC1 a následnou inhibici mTORC2 a IRS-1 (Insulin receptor substrate 1) a inhibice komplexu obsahující Beclin1 a aktivující proces autofagie. Při použití metody Western blot jsme se po náročné optimalizaci metody dočkali smíšených výsledků, v případě negativních kontrol linie REH I došlo po přidání ASNázy k mírné posílení fosforylace proteinu, u linie REH II naopak k oslabení. Konzistentním však byla vyšší aktivace proteinu u mutantních linií bez přítomnosti fúzního proteinu ETV6/RUNX1 po ošetření L-asparaginázou (diskutováno níže).

ASNáza vedla k mírnému snížení koncentrace proteinů Beclin1 a Atg5. Přítomnost tohoto chemoterapeutika dle těchto ukazatelů tedy nevedla k aktivaci autofagie jako záchranného mechanismu buněčného přežití v podmínkách nedostatku živin jak popsal Takahashi et al. naopak v roce 2017, k detekci byl však v jejich případě použit protein LC3. Inhibice autofagie ve výzkumu Takahashi et al. navíc vyvolala u rezistentních buněk mnohem nižší změnu chemorezistence, než u jejich citlivých protějšků a u rezistentních klonů nebyla dokumentována vyšší intenzita autofagie u klonů s indukovanou rezistencí vůči ASNáze. Cytotoxická autofagie byla na druhou stranu zjištěna více publikacemi u různých nádorových linií a často souvisela s výraznou inhibicí dráhy mTOR (Kondo et al., 2005; Sharma et al., 2014; Szlosarek, 2014). V našem případě nedošlo k zvýšení koncentrace proteinů Beclin1 a Atg5, je však třeba uvést, že autofagie je komplexně řízený proces a oba z proteinů mají mnoho interakčních partnerů a např. antiapoptotický faktor Bcl-2 může zcela změnit fungování Beclin 1 z cytotoxického na cytoprotektivní (Kang et al., 2011). K podrobnější analýze by bylo třeba provést detekci LC3, a to jak pomocí Western blotu, tak fluorescenční mikroskopie.



Obr. 6.1. Shrnutí monitorovaných signálních drah a jejich vzájemné komunikace.

6.4.2 Signalizační změny v odpovědi na ztrátu fúzního genu ETV6/RUNX1

Nejvýznamnější částí analýzy buněčné signalizace bylo porovnání kvantifikovaných dat z western blotu v pátrání po rozdílech mezi kontrolními buňkami bez mutagenese systémem CRIPR/Cas9 a klony bez přítomnosti fúzního proteinu ETV6/RUNX1. Byl porovnáván stav signalizace za kultivace v plném médiu, po ošetření média ASNázou, a především posun v reakci na přidání tohoto chemoterapeutika. Za signifikantní byla považována výrazná změna všech 4 testovaných knockoutních klonů stejným směrem oproti oběma kontrolním liniím. Zde mohlo dojít ke ztrátě potenciálně zajímavých rozdílů kvůli poloviční genetické dávce HIF1 α u linie REH II, ta však byla vyvážena vyšší konzistencí a tím i předpokládaným významem zjištěné změny v signalizaci.

V médiu s přítomností ASN a GLN vykazují knockoutní linie mírně vyšší fosforylaci proteinu S6 (v průměru o 32 %) a CAD (v průměru o 34 %). Tyto výsledky ukazují na vyšší intenzitu proteosyntézy a nukleosyntézy, což se však na fenotypu neprojevovalo zvýšením proliferace. Možným vysvětlením by byla větší velikost mutovaných buněk, velikost buněk však nebyla součástí provedených pozorování. Fosforylace těchto proteinů je ovlivněna aktivitou mTORC1 signální drahou. Fosforylace CAD po ošetření média ASNázou klesla u klonů postrádajících ETV6-RUNX1 protein úměrně kontrolním liniím, zůstala však vůči nim mírně zvýšena. Fosforylace S6 nebyla po ošetření detekovatelná, vzhledem k mnohem silnější signalizaci před ním a není tedy možné porovnat pokles fosforylace u knockoutních klonů a kontrol.

Dalším rozdílem byla v průměru o 27 % zvýšená koncentrace proteinu RICTOR, jež je nepostradatelnou součástí komplexu mTORC2. Nepřímým pozorováním bylo tedy zjištěno že knockoutní buňky reagují na ASNázu méně výrazným snížením aktivity komplexu mTORC1 a pravděpodobně mTORC2.

V reakci na 72 hod trvající kultivaci s ASNázou došlo u buněk postrádající fúzní protein k výraznějšímu poklesu fosforylace enzymu ACC, který mohl zapříčinit nižší vzestup FAO po přidání ASNázy u těchto klonů během metabolických experimentů. V případě proteinu Akt byla naopak fosforylace zvýšena, zatímco u kontrolních linií došlo k jejímu zachování, či poklesu. Změna fosforylace v porovnání s kontrolními klony byla o 20-50 % výraznější v pozitivním směru. Tento poznatek má široké důsledky vzhledem k napojení Akt na dráhu mTOR, autofagii, genovou expresi a řízení metabolismu. Nárůst fosforylace aktivuje komplex mTORC1, a naopak inhibuje mTORC2. Dochází také k snížení autofagie prostřednictvím proteinu Beclin 1.

Nejvýznamnější změnu jsem zjistil v případě markerů autofagie, Beclin 1 a Atg5. Zatímco u kontrolních linií došlo pouze k mírnému poklesu, v případě klonů s absencí ETV6/RUNX1 bylo detekované snížení koncentrace obou proteinů výraznější (13,4 % vs. 88,7 %, Beclin 1 a 8 % vs. 35 % Atg5) a v případě proteinu Beclin1 i statisticky významné. Snížení těchto proteinů v reakci na přítomnost ASNázy však nemusí nutně znamenat snížení autofagie a pro definitivní odpověď je třeba dalších experimentální práce. Snížení autofagie by bylo v rozporu s publikovanými výsledky skupiny Takahashi et al. z roku 2017, ve které však bylo využito proteinu LC3 jako markeru autofagie, přičemž tento protein se podílí na jiné části procesu autofagie a je ovlivňován odlišnou signalizací. Naopak konzistentní jsou výsledky se zvýšenou aktivací Akt a mTORC1 zjištěnou u mutantních klonů vůči kontrolám. Signalizace těchto proteinů má inhibiční efekt na autofagii a také přímo na Beclin 1. Také u jiných maligních onemocnění byla in vitro zjištěná v reakci na chemoterapeutika aktivace cytotoxické autofagie pomocí inhibice Akt a mTORC1 signalizace (Kang et al., 2011; Kondo et al., 2005; Sharma et al., 2014).

6.4.3 Aplikace zjištění na buněčný fenotyp

V reakci na ASNázu došlo v souladu s očekáváními k inhibici mTORC1 pozorované na poklesu fosforylace proteinů p70S6K, rpS6, CAD a eIF4E-BP1. Inhibice mTORC1 snížila skrze tyto prostředníky proteosyntézu, syntézu nukleotidů, expresi ACC a tím de novo syntézu mastných kyselin a expresi c-Myc a tím celkovou tendenci k proliferaci a vychytávání glukózy. Zároveň poklesla fosforylace AMPK, což ukazuje že u buněk nenastává závažný pokles ATP. Došlo i k poklesu proteinu RICTOR, klíčové součásti komplexu mTORC2. Nižší aktivita mTORC2 mohla zapříčinit deaktivaci Akt u linie REH II. Fosforylace Akt vykazovala smíšené výsledky, jež mohou být zapříčiněny monoalelickou delecí genu HIF1 α u linie REH II.

Buňky postrádající ETV6/RUNX1 vykazovaly vyšší aktivitu mTORC1, což se projevilo fosforylací rpS6 a CAD a potenciálně tedy zvýšenou syntézou proteinů a nukleotidů. Vyšší pokles fosforylace ACC v reakci na ASNázu se může podílet na méně vyjádřeném vzestupu FAO oproti kontrolním liniím. Vzhledem k mnohem výraznějšímu poklesu proteinů Beclin 1 a Atg5 reagují zřejmě knockoutní klony na přítomnost L-asparaginázy inhibicí autofagie závislé na těchto proteinech. Vezmeme-li současně v úvahu vyšší rezistenci těchto buněk na toto chemoterapeutikum, autofagie aktivovaná těmito drahami má zřejmě u leukemických klonů cytotoxické účinky. Hodnoty LC3 bohužel nemáme k dispozici. Inhibice autofagie a vyšší aktivita mTORC1 mohla být také způsobena zjištěným výraznějším nárůstem fosforylace proteinu Akt klonů postrádajících fúzní gen, oproti kontrolám.

Nižší citlivost k ASNáze u knockoutních klonů, tedy může být na základě western blotu vysvětlena buď nižší intenzitou cytotoxické autofagie, či více zachovalou syntézou nukleotidů a cytoprotektivní signalizací Akt.

6.5 METABOLICKÁ AKTIVITA

V reakci na depleci Asn a Gln způsobené ASNázou dochází k výrazným změnám buněčného metabolismu. Otázkou je, zda se jedná o záchranné mechanismy pomáhající buňce přežít nedostatek těchto aminokyselin, nebo jsou to známky metabolického rozvratu přispívající k buněčné smrti.

6.5.1 Seahorse

V souladu s našimi očekáváními došlo k zvýšení spotřeby kyslíku po podání ASNázy. Tento parametr svědčí o nárůstu intenzity oxidativní fosforylace. Důležitým pozorováním byla však opačná reakce buněk postrádajících fúzní protein na toto chemoterapeutikum. Vzhledem k vyšší viabilitě knockoutních buněk je zřejmě snížení aktivity dýchacího řetězce v mitochondriích žádoucím jevem pro buněčné přežití. Zřejmě přispívá ke snížení produkce ROS, snížení vytížení Krebsova cyklu, trpícího na podkladě nedostatku Asn a Gln nemožností doplňovat metabolity pomocí významných apaplerotických reakcí deaminace těchto aminokyselin a těmito opatřeními vede i k snížení poškození mitochondrií vedoucí k poklesu nutnosti jejich odstranění autofagií. Zvýšenou aktivaci dýchacího řetězce mohou leukemické blasty vyžadovat pro syntézu aspartátu jež byla při nárůstu oxidativní fosforylace zaznamenána (Birsoy et al., 2015). Jedná se o klíčovou aminokyselinu v buněčném metabolismu i syntéze nukleotidů. Knockoutní buňky jsou zřejmě schopny si tuto aminokyselinu syntetizovat jinou cestou a tím zabránit přetížení mitochondrií. Nižší spotřeba kyslíku v dýchacím řetězci vysvětluje nižší nárůst FAO u knockoutních klonů, na to navazující snížená produkce ROS a poškození mitochondrií pak mohou způsobit pokles potřeby autofagie jako cesty k odstranění poškozených mitochondrií a

tím vysvětlit nižší detekovanou koncentraci proteinů Beclin1 a Atg5 u buněk s absencí fúzního proteinu.

Dle těchto zjištění tedy schopnost regulace buněčného dýchání může stát ve středobodu mechanismu rezistence na toto chemoterapeutikum. Výsledky pozorování mitochondriální respirace pomocí přístroje Seahorse se nám bohužel nepodařilo vzhledem k problémům s metodikou statisticky významně reprodukovat a není tedy možné definitivně usuzovat na význam této modifikace buněčného metabolismu. Výsledky nicméně vybízí k zopakování těchto experimentů, možná s využitím robustnější metodiky.

6.5.2 FAO

U všech buněk nastalo po kultivaci s ASNázou výrazné zvýšení oxidace mastných kyselin. Toto zvýšení bylo však ve srovnání s kontrolními liniemi u buněk postrádajících ETV6/RUNX1 menší. To lze částečně vysvětlit vyšší fosforylací ACC zjištěnou u knockoutních klonů (viz výše). Stejně tak byl nalezen rozdíl mezi REH I a REH II liniemi, což může být způsobeno přítomností delece jedné alely genu HIF1 α (souhlasí s nepublikovanými poznatky laboratoře). Není bez zajímavosti, že nižší aktivita FAO u linie REH II opět korelovala s vyšší rezistencí vůči ASNáze přítomné u této linie. Nižší zvýšení FAO i její nižší celková aktivita tedy koreluje s poklesem citlivosti na ASNázu, což neodpovídá poznatkům publikace (Hermanova et al., 2016), kde po inhibici FAO společně s podáním ASNázy došlo synergické cytotoxické reakci.

Vysvětlením může být, že aktivace FAO je pouze kompenzatorní cytopatologická přispívající k záchraně buněčné viability. Díky vyšší rezistenci na ASNázu a lepšímu stavu buněčné signalizace a metabolismu však tato záchranná reakce není u buněk se ztrátou fúzního proteinu do takové míry nutná. Podobné vysvětlení by se mohlo týkat i autofagie.

6.5.3 Utilizace glukózy

Utilizace glukózy z extracelulárního prostoru v přítomnosti ASNázy klesla. Tento pokles byl s výjimkou klonu 23 výraznější v přítomnosti fúzního proteinu. Na tomto poklesu se pravděpodobně podílí nízká exprese genu c-Myc po ošetření média L-asparaginázou. Tím však nelze vysvětlit rozdíly mezi kontrolními liniemi a knockoutními klony. Nižší pokles glykolýzy buněk postrádajících ETV6-RUNX1 může být vysvětlen spíše nižší aktivací FAO, jako kompetující dráhy dodávající metabolity do Krebsova cyklu a dýchacího řetězce.

7 SOUHRN

Zde prezentovaná diplomová práce se zabývá spojitostí mezi specifickou chromozomální aberací t(12;21) s přítomností fúzního genu ETV6-RUNX1 na citlivost leukemických buněk na léčbu ASNázou. Zároveň vrhá nové světlo na mechanismus vzniku této rezistence i mechanismus účinku zmíněného chemoterapeutika.

Při tvorbě knockoutních klonů postrádajících fúzní protein bylo nutné čelit několika komplikacím, jež vedli k poznatku, že rezistence je mimo absence fúzního genu asociována s dalšími mutacemi jaderné DNA, např. delecí genu HIF1 α a že nádorové linie nejsou zdaleka geneticky homogenními kulturami. Byly však úspěšně získány knockoutní klony bez přítomnosti proteinu ETV6-RUNX1 v cytoplasmě a se stabilně zvýšenou rezistencí vůči ASNáze.

U knockoutních klonů byly zjištěny odlišnosti v buněčné signalizaci a koncentraci proteinů Beclin1 a Atg5 asociovaných s autofagií v porovnání s negativními kontrolami exprimujícími fúzní protein. Zvýšená byla fosforylace Akt a mTOR, jež mají na buňku anabolické, protiautofagické a antiapoptotické účinky. Dále byl zaznamenán v reakci na ASNázu vyšší pokles fosforylace proteinu ACC odrážející se v nižším nárůstu FAO oproti kontrolním buňkám.

Metabolické experimenty odhalily důležitou souvislost mezi rezistencí leukemických blastů na ASNázu a intenzitou dvou procesů spjatých s mitochondriálním metabolismem. Citlivé buňky reagovali na přítomnost chemoterapeutika výrazným nárůstem FAO i aktivity dýchacího řetězce. U rezistentních klonů došlo naopak k poklesu spotřeby kyslíku a aktivity dýchacího řetězce a k mírnějšímu nárůstu FAO. Zároveň si buňky postrádající fúzní protein zachovaly vyšší rychlost zpracování glukózy oproti svým protějškům s přítomností tohoto proteinu.

Rezistence na ASNázu tedy souvisí s vyšším počtem genetických přestaveb, které mění metabolickou reakci na toto chemoterapeutikum. Snížení aktivity dýchacího řetězce a nižší hyperaktivace FAO mohou vést k nižšímu poškození mitochondrií. S nižším poškozením mitochondrií může souviset nižší koncentrace autofagických proteinů Beclin1 a Atg5. Pro určení skutečné intenzity autofagie však nemáme dostatek podkladů. Vyšší aktivita mTORC1, Akt a CAD může poskytnou důležité signály pro buněčné přežití, stejně jako vhodnou modifikaci metabolismu.

Výsledky výzkumu přinesli řadu podnětných poznatků i stimulů pro další experimentální práci. S vhodným navázáním ve směru analýzy metabolismu a autofagie může další bádání přinést výsledky aplikovatelné do praxe ve formě předcházení, či zvrácení rezistence vůči ASNáze.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alberghina, L., and Gaglio, D. (2014). Redox control of glutamine utilization in cancer. Redox control of glutamine utilization in cancer. *Cell Death Dis. Cell Death Dis.* 5, 5, e1561, e1561–e1561.

Alpar, D., Wren, D., Ermini, L., Mansur, M.B., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Titley, I., Kearney, L., Szczepanski, T., Gonzalez, D., et al. (2015). Clonal origins of ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia* 29, 839–846.

Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 619–634.

Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J., and Gilliland, D.G. (2001). The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet. Cytogenet.* 130, 93–104.

Armstrong, J.S., Steinauer, K.K., Hornung, B., Irish, J.M., Lecane, P., Birrell, G.W., Peehl, D.M., and Knox, S.J. (2002). Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* 9, 252–263.

Bhojwani, D., Yang, J.J., and Pui, C.-H. (2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 47–60.

Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., et al. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24, 3470–3481.

Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., and Sabatini, D.M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 162, 540–551.

Brettingham-Moore, K.H., Taberlay, P.C., and Holloway, A.F. (2015). Interplay between Transcription Factors and the Epigenome: Insight from the Role of RUNX1 in Leukemia. *Front. Immunol.* 6, 499.

Broome, J.D. (1963). EVIDENCE THAT THE L-ASPARAGINASE OF GUINEA PIG SERUM IS RESPONSIBLE FOR ITS ANTILYMPHOMA EFFECTS. *J. Exp. Med.* 118, 99–120.

Bunpo, P., Dudley, A., Cundiff, J.K., Cavener, D.R., Wek, R.C., and Anthony, T.G. (2009). GCN2 Protein Kinase Is Required to Activate Amino Acid Deprivation Responses in Mice Treated with the Anti-cancer Agent l-Asparaginase. *J. Biol. Chem.* 284, 32742–32749.

Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B., and Weinstein, J.N. (2014). The glutaminase activity of l-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 123, 3596–3606.

Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887–891.

Christofk, H.R., Heiden, M.G.V., Wu, N., Asara, J.M., and Cantley, L.C. (2008a). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452, 181–186.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008b). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230–233.

- Clarkson, B., Krakoff, I., Burchenal, J., Karnofsky, D., Golbey, R., Dowling, M., Oettgen, H., and Lipton, A. (1970). Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer* 25, 279–305.
- Cooper, S.L., and Brown, P.A. (2015). Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 61–73.
- Covini, D., Tardito, S., Bussolati, O., R. Chiarelli, L., V. Paschetto, M., Digilio, R., Valentini, G., and Scotti, C. (2012). Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 7, 4–13.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M.-J., Basinko, A., and De Braekeleer, M. (2012). ETV6 fusion genes in hematological malignancies: A review. *Leuk. Res.* 36, 945–961.
- Diakos, C., Krapf, G., Gerner, C., Inthal, A., Lemberger, C., Ban, J., Dohnal, A.M., and Panzer-Grümayer, E.R. (2007). RNAi-mediated silencing of TEL/AML1 reveals a heat-shock protein- and survivin-dependent mechanism for survival. *Blood* 109, 2607–2610.
- Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., and Manning, B.D. (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol. Cell* 47, 535–546.
- Ettinger, L.J., Ettinger, A.G., Avramis, V.I., and Gaynon, P.S. (1997). Acute lymphoblastic leukaemia: a guide to asparaginase and pegaspargase therapy. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 7, 30–39.
- Evangelisti, C., Evangelisti, C., Chiarini, F., Lonetti, A., Buontempo, F., Neri, L.M., McCubrey, J.A., and Martelli, A.M. (2015). Autophagy in acute leukemias: A double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 14–26.
- Fan, J., Kamphorst, J.J., Mathew, R., Chung, M.K., White, E., Shlomi, T., and Rabinowitz, J.D. (2013). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.* 9, 712.
- Fenrick, R., Wang, L., Nip, J., Amann, J.M., Rooney, R.J., Walker-Daniels, J., Crawford, H.C., Hulboy, D.L., Kinch, M.S., Matrisian, L.M., et al. (2000). TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5828–5839.
- Fischer, M., Schwieger, M., Horn, S., Niebuhr, B., Ford, A., Roscher, S., Bergholz, U., Greaves, M., Löhler, J., and Stocking, C. (2005). Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (*ETV6/RUNX1*) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24, 7579.
- Ford, A.M., Palmi, C., Bueno, C., Hong, D., Cardus, P., Knight, D., Cazzaniga, G., Enver, T., and Greaves, M. (2009). The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF- β pathway in early B lineage progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 119, 826–836.
- Fuka, G., Kantner, H.-P., Grausenburger, R., Inthal, A., Bauer, E., Krapf, G., Kaindl, U., Kauer, M., Dworzak, M.N., Stoiber, D., et al. (2012). Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. *Leukemia* 26, 927.
- Gaglio, D., Soldati, C., Vanoni, M., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2009). Glutamine Deprivation Induces Abortive S-Phase Rescued by Deoxyribonucleotides in K-Ras Transformed Fibroblasts. *PLOS ONE* 4, e4715.
- Gameiro, P.A., Yang, J., Metelo, A.M., Pérez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W.K., Olumi, A., López-Larrubia, P., et al. (2013). In Vivo HIF-Mediated Reductive Carboxylation Is Regulated by Citrate Levels and Sensitizes VHL-Deficient Cells to Glutamine Deprivation. *Cell Metab.* 17, 372–385.

Growney, J.D., Shigematsu, H., Li, Z., Lee, B.H., Adelsperger, J., Rowan, R., Curley, D.P., Kutok, J.L., Akashi, K., Williams, I.R., et al. (2005). Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 106, 494–504.

Guo, F., and Cavener, D.R. (2007). The GCN2 eIF2 α Kinase Regulates Fatty-Acid Homeostasis in the Liver during Deprivation of an Essential Amino Acid. *Cell Metab.* 5, 103–114.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.-P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14484–14494.

Hays, J.L., Kim, G., Walker, A., Annunziata, C.M., Lee, J.-M., Squires, J., Houston, N., Steinberg, S.M., and Kohn, E.C. (2013). A phase II clinical trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced ovarian cancer: Early closure for safety. *Mol. Clin. Oncol.* 1, 565–569.

Heiden, M.G.V., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Hermanova, I., Zaliova, M., Trka, J., and Starkova, J. (2012). Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp. Hematol.* 40, 657–665.

Hermanova, I., Arruabarrena-Aristorena, A., Valis, K., Nuskova, H., Alberich-Jorda, M., Fiser, K., Fernandez-Ruiz, S., Kavan, D., Pecinova, A., Niso-Santano, M., et al. (2016). Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of l-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia* 30, 209–218.

Hettmer, S., Schinzel, A.C., Tchessalova, D., Schneider, M., Parker, C.L., Bronson, R.T., Richards, N.G., Hahn, W.C., and Wagers, A.J. Functional genomic screening reveals asparagine dependence as a metabolic vulnerability in sarcoma. *ELife* 4.

Hosios, A.M., Hecht, V.C., Danai, L.V., Johnson, M.O., Rathmell, J.C., Steinhauser, M.L., Manalis, S.R., and Vander Heiden, M.G. (2016). Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Dev. Cell* 36, 540–549.

House, S.W., Warburg, O., Burk, D., and Schade, A.L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* 124, 267–272.

Inaba, H., Greaves, M., and Mullighan, C.G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 381, 1943–1955.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. (2003a). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17, 1829–1834.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003b). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., et al. (2012). A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* 18, 1350–1358.

Ivana Heřmanová, I.H. (2015). Mechanismus účinku L-asparaginázy u dětské akutní lymfoblastické leukémie.

Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J.R., Pui, C.-H., and Campana, D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J. Clin. Invest.* 117, 1049–1057.

- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 571–580.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* *10*, 935–945.
- Kim, S.-G., Buel, G., and Blenis, J. (2013). Nutrient Regulation of the mTOR Complex 1 Signaling Pathway.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 726–734.
- Krall, A.S., and Christofk, H.R. (2015). Rethinking glutamine addiction. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1515–1517.
- Krall, A.S., Xu, S., Graeber, T.G., Braas, D., and Christofk, H.R. (2016). Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat. Commun.* *7*.
- Krejci, O., Starkova, J., Otova, B., Madzo, J., Kalinova, M., Hrusak, O., and Trka, J. (2004). Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* *18*, 434–441.
- Kuster, L., Grausenburger, R., Fuka, G., Kaindl, U., Krapf, G., Inthal, A., Mann, G., Kauer, M., Rainer, J., Kofler, R., et al. (2011). ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood* *117*, 2658–2667.
- Lam, K., and Zhang, D.-E. (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *17*, 1120–1139.
- Land, S.C., and Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible Factor 1 α Is Regulated by the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) via an mTOR Signaling Motif. *J. Biol. Chem.* *282*, 20534–20543.
- Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274–293.
- Li, H., Zhou, F., Du, W., Dou, J., Xu, Y., Gao, W., Chen, G., Zuo, X., Sun, L., Zhang, X., et al. (2015). Knockdown of asparagine synthetase by RNAi suppresses cell growth in human melanoma cells and epidermoid carcinoma cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* *63*, 328–333.
- Li, J., Song, P., Zhu, L., Aziz, N., Zhou, Q., Zhang, Y., Xu, W., Feng, L., Chen, D., Wang, X., et al. (2017). Synthetic lethality of glutaminolysis inhibition, autophagy inactivation and asparagine depletion in colon cancer. *Oncotarget* *8*, 42664–42672.
- Linka, Y., Ginzler, S., Krüger, M., Novosel, A., Gombert, M., Kremmer, E., Harbott, J., Thiele, R., Borkhardt, A., and Landgraf, P. (2013). The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer J.* *3*, e151.
- Miller, H.K., and Balis, M.E. (1969). Glutaminase activity of L-asparagine amidohydrolase. *Biochem. Pharmacol.* *18*, 2225–2232.
- Miller, C.A., White, B.S., Dees, N.D., Griffith, M., Welch, J.S., Griffith, O.L., Vij, R., Tomasson, M.H., Graubert, T.A., Walter, M.J., et al. (2014). SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput. Biol.* *10*, e1003665.
- Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, L.E., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C., and Greaves, M. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 8242–8247.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* *136*, 521–534.

Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K., Leeper, R.D., Tallai, L., Tan, C.C., Clarkson, B.D., Golbey, R.B., Krakoff, I.H., Karnofsky, D.A., et al. (1970). Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25, 253–278.

Offman, M.N., Krol, M., Patel, N., Krishnan, S., Liu, J., Saha, V., and Bates, P.A. (2011). Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* 117, 1614–1621.

Ohnuma, T., Holland, J.F., Freeman, A., and Sinks, L.F. (1970). Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man. *Cancer Res.* 30, 2297–2305.

Ohnuma, T., Waligunda, J., and Holland, J.F. (1971). Amino Acid Requirements in Vitro of Human Leukemic Cells. *Cancer Res.* 31, 1640–1644.

Oshima, K., Khiabani, H., da Silva-Almeida, A.C., Tzoneva, G., Abate, F., Ambesi-Impiombato, A., Sanchez-Martin, M., Carpenter, Z., Penson, A., Perez-Garcia, A., et al. (2016). Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11306–11311.

Parmentier, J.H., Maggi, M., Tarasco, E., Scotti, C., Avramis, V.I., and Mittelman, S.D. (2015). Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 39, 757–762.

Patel, D., Menon, D., Bernfeld, E., Mroz, V., Kalan, S., Loayza, D., and Foster, D.A. (2016). Aspartate Rescues S-phase Arrest Caused by Suppression of Glutamine Utilization in KRas-driven Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 9322–9329.

Pession, A., Valsecchi, M.G., Masera, G., Kamps, W.A., Magyarosy, E., Rizzari, C., van Wering, E.R., Lo Nigro, L., van der Does, A., Locatelli, F., et al. (2005). Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7161–7167.

Pike, L.S., Smift, A.L., Croteau, N.J., Ferrick, D.A., and Wu, M. (2011). 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 BBA - Bioenerg.* 1807, 726–734.

Povýšil, C. (2007). Speciální patologie (Galén).

prof. Starý (2017). Leukemie v dětském věku » Linkos.cz.

Pui, C.-H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., and Relling, M.V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165–1174.

Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q.J., and Deng, F. (2016). Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis.* 7, e2226.

Reinert, R.B., Oberle, L.M., Wek, S.A., Bunpo, P., Wang, X.P., Mileva, I., Goodwin, L.O., Aldrich, C.J., Durden, D.L., McNurlan, M.A., et al. (2006). Role of Glutamine Depletion in Directing Tissue-specific Nutrient Stress Responses to L-Asparaginase. *J. Biol. Chem.* 281, 31222–31233.

Richards, N.G.J., and Kilberg, M.S. (2006). Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629–654.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.

Schafer, Z.T., Grassian, A.R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H.Y., Gao, S., Puigserver, P., and Brugge, J.S. (2009). Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 461, 109–113.

- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* *24*, R453–R462.
- Schindler, J.W., Van Buren, D., Foudi, A., Krejci, O., Qin, J., Orkin, S.H., and Hock, H. (2009). TEL-AML1 Corrupts Hematopoietic Stem Cells to Persist in the Bone Marrow and Initiate Leukemia. *Cell Stem Cell* *5*, 43–53.
- Schuh, A., Becq, J., Humphray, S., Alexa, A., Burns, A., Clifford, R., Feller, S.M., Grocock, R., Henderson, S., Khrebtukova, I., et al. (2012). Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* *120*, 4191–4196.
- Schulze, A., and Harris, A.L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* *491*, 364–373.
- Sharma, K., Le, N., Alotaibi, M., and Gewirtz, D.A. (2014). Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 10034–10051.
- Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* *9*, 1985–1989.
- Simon, H.-U., and Friis, R. (2014). ATG5. *Autophagy* *10*, 176–177.
- Smith, E.M., Finn, S.G., Tee, A.R., Browne, G.J., and Proud, C.G. (2005). The Tuberous Sclerosis Protein TSC2 Is Not Required for the Regulation of the Mammalian Target of Rapamycin by Amino Acids and Certain Cellular Stresses. *J. Biol. Chem.* *280*, 18717–18727.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., and Shinohara, M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* *28*, 897–916.
- Stams, W.A.G., den Boer, M.L., Beverloo, H.B., Meijerink, J.P.P., Stigter, R.L., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., Slater, R., and Pieters, R. (2003). Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood* *101*, 2743–2747.
- Stams, W.A.G., den Boer, M.L., Beverloo, H.B., Meijerink, J.P.P., van Wering, E.R., Janka-Schaub, G.E., and Pieters, R. (2005). Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 2974–2980.
- Starý, J. (2010). Akutní leukemie u dětí. *Onkologie* *4*, 120–124.
- Stegink, L.D., Filer, L.J., Brummel, M.C., Baker, G.L., Krause, W.L., Bell, E.F., and Ziegler, E.E. (1991). Plasma amino acid concentrations and amino acid ratios in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria ingesting a hamburger and milk shake meal. *Am. J. Clin. Nutr.* *53*, 670–675.
- Sugimoto, K., Suzuki, H.I., Fujimura, T., Ono, A., Kaga, N., Isobe, Y., Sasaki, M., Taka, H., Miyazono, K., and Komatsu, N. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. *Cancer Sci.* *106*, 1534–1543.
- Sundaresh, A., and Williams, O. (2017). Mechanism of ETV6-RUNX1 Leukemia. *Adv. Exp. Med. Biol.* *962*, 201–216.
- Szlosarek, P.W. (2014). Arginine deprivation and autophagic cell death in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14015–14016.

- Takahashi, H., Inoue, J., Sakaguchi, K., Takagi, M., Mizutani, S., and Inazawa, J. (2015). Autophagy Inhibition Sensitizes Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to L-Asparaginase. *Blood* *126*, 3772–3772.
- Takahashi, H., Inoue, J., Sakaguchi, K., Takagi, M., Mizutani, S., and Inazawa, J. (2017). Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* *36*, 4267–4276.
- Tallal, L., Tan, C., Oettgen, H., Wollner, N., McCarthy, M., Helson, L., Burchenal, J., Karnofsky, D., and Murphy, M.L. (1970). E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer* *25*, 306–320.
- Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S.U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., Miletic, H., Sakariassen, P.Ø., Weinstock, A., Wagner, A., et al. (2015). Glutamine Synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1556–1568.
- Tasian, S.K., Loh, M.L., and Hunger, S.P. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy. *Cancer* *121*, 3577–3590.
- Tong, W.H., Pieters, R., Hop, W.C.J., Lanvers-Kaminsky, C., Boos, J., and van der Sluis, I.M. (2013). No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatr. Blood Cancer* *60*, 258–261.
- Torrano, V., Procter, J., Cardus, P., Greaves, M., and Ford, A.M. (2011). ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. *Blood* *118*, 4910–4918.
- University of Schleswig-Holstein (2010). International Collaborative Treatment Protocol For Children And Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov.
- Valente, G., Morani, F., Nicotra, G., Fusco, N., Peracchio, C., Titone, R., Alabiso, O., Arisio, R., Katsaros, D., Benedetto, C., et al. (2014). Expression and Clinical Significance of the Autophagy Proteins BECLIN 1 and LC3 in Ovarian Cancer. *BioMed Res. Int.* *2014*.
- Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 11269–11274.
- Warburg, O. (1928). Stoffwechsel der Karzinomzelle. In *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*, (J.F. Bergmann-Verlag, Munich), pp. 11–18.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* *123*, 309–314.
- Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., and Jemal, A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* *64*, 83–103.
- Wiemels, J. (2012). Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem. Biol. Interact.* *196*, 59–67.
- Xiao, D., Herman-Antosiewicz, A., Antosiewicz, J., Xiao, H., Brisson, M., Lazo, J.S., and Singh, S.V. (2005). Diallyl trisulfide-induced G₂-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc25C. *Oncogene* *24*, 6256–6268.
- Yang, J.J., Bhojwani, D., Yang, W., Cai, X., Stocco, G., Crews, K., Wang, J., Morrison, D., Devidas, M., Hunger, S.P., et al. (2008). Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *112*, 4178–4183.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., Panis, D.N.D., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* *29*, 2082–2096.

- Ye, J., Palm, W., Peng, M., King, B., Lindsten, T., Li, M.O., Koumenis, C., and Thompson, C.B. (2015). GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev.* 29, 2331–2336.
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metab.* 15, 157–170.
- Zaliova, M., Madzo, J., Cario, G., and Trka, J. (2011). Revealing the role of TEL/AML1 for leukemic cell survival by RNAi-mediated silencing. *Leukemia* 25, 313–320.
- Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P.T., Kannan, K., Kiarash, R., Mason, J., Huang, P., Sawyer, S.K., Fuerth, B., Faubert, B., et al. (2011). Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* 25, 1041–1051.
- Zdráhalová, K., Štěřba, J., Domanský, J., Blažek, B., Ptoszková, H., Mihál, V., Novák, Z., Hak, J., Procházková, D., Černá, Z., et al. (2015). [The prospects for children with acute lymphoblastic leukemia of being cured has increased in the Czech Republic in the 21st century to 90% - outcome of the ALL-IC BFM 2002 trial]. *Cas. Lek. Cesk.* 154, 79–89.
- Zelent, A., Greaves, M., and Enver, T. (2004). Role of the *TEL-AML1* fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 23, 4275.
- Zhang, J., Fan, J., Venneti, S., Cross, J.R., Takagi, T., Bhinder, B., Djaballah, H., Kanai, M., Cheng, E.H., Judkins, A.R., et al. (2014). Asparagine Plays a Critical Role in Regulating Cellular Adaptation to Glutamine Depletion. *Mol. Cell* 56, 205–218.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1- phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 11, 468–476.
- Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35.
- Zuna, J., Madzo, J., Krejci, O., Zemanova, Z., Kalinova, M., Muzikova, K., Zapotocky, M., Starkova, J., Hrusak, O., Horak, J., et al. (2011). ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood* 117, 368–369.