

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



### **Studium drah zodpovědných za rezistenci leukemických buněk na L-asparaginasu**

Analysis of the pathways responsible  
for the resistance of leukaemic cells towards L-asparaginase

Markéta Šimčíková

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha 2013



## Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, Csc., bez jehož podpory by tato práce nikdy nevznikla.

Můj velký dík patří také Mgr. Júlii Starkové, Ph.D. a Mgr. Ivaně Heřmanové za jejich vedení, odborné rady a trpělivost.

V neposlední řadě děkuji celému kolektivu laboratoří CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) za vytvoření tvůrčí a přátelské atmosféry.



Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24. 5. 2013

Podpis autora

# Abstrakt

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastější maligní onemocnění u dětí. Přestože je terapie ALL velmi úspěšná, relaps onemocnění postihuje 20-25 % dětí. Jedna z možných příčin relapsu je rezistence k léčivům. Léčba leukemie spočívá v kombinované chemoterapii, jejíž důležitou součástí je L-asparaginasa. Tento enzym přeměňuje extracelulární asparagin na asparát a glutamin na glutamát. Jeho antagonistou je enzym asparagin syntetasa, který syntetizuje intracelulární asparagin. Specifický antileukemický účinek L-asparaginasy je vysvětlován nižší aktivitou asparagin syntetasy v leukemických buňkách v porovnání s buňkami zdravými. Nedostatek asparaginu a glutaminu vede k poškození proteosyntézy a navození apoptózy. Detailní mechanismus působení L-asparaginasy a příčiny vzniku rezistence však nebyly dosud objasněny.

Tato bakalářská práce je součástí studia příčin rezistence leukemických buněk vůči L-asparaginase. Na modelu leukemické buněčné linie REH byla objevena delecí del(5)(q34), která není přítomna u rezistentního klonu této linie. Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na potvrzení rozdílné citlivosti leukemických buněk s delecí a bez ní k L-asparaginase. Metodou limitního ředění byly získány klony linie REH pozitivní či negativní na studovanou delecii. U těchto klonů byla sledována viabilita pomocí apoptotických a cytotoxických testů. K navození apoptózy byla použita L-asparaginasa a ultrafialové záření, které reprezentovalo nespecifický impuls pro buněčnou smrt.

Výsledky v této práci potvrzují participaci delecí del(5)(q34) na procesech spojených s citlivostí leukemických buněk vůči L-asparaginase. Buňky s touto delecí jsou na cytotoxické účinky L-asparaginasy citlivější, zatímco její nepřítomnost vede k větší rezistenci buněk. Tento mechanismus by mohl ovlivňovat i odpověď pacientů na léčbu.

## Klíčová slova

L-asparaginasa, leukemie, rezistence, delecie, apoptosa



# Abstract

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most frequent malignancy in childhood. Despite the very successful ALL therapy, relapses occur to 15-20 % of children. One of the possible relaps causes is the resistance to therapeutics. ALL is treated with combined chemotherapy in which cytostatic agent L-asparaginase plays the essential role. L-asparaginase depletes extracellular asparagine and glutamine. Antagonist of the L-asparaginase is asparagine synthetase enzyme, which synthesizes the cellular asparagine. The specific antileukaemic effect of L-asparaginase is believed to be thanks to lower activity of the asparagine synthetase in leukaemic cells comparing to the healthy cells. The asparagine and glutamine deficiency harms the cellular proteosynthesis and induces apoptosis. Mechanism of the L-asparaginase cytotoxic effect and mechanism of corresponding resistance is still not fully explained.

This bachelor thesis is a part of a project studying mechanisms of leukaemic cells resistance to L-asparaginase. In the model leukaemic REH cell line a deletion del(5)(q34) was discovered, which cannot be found in the resistant clone of these cells. This thesis focuses on proving different sensitivity of leukaemic cells, with or without the deletion, to L-asparaginase. The limiting dilution was used to obtain REH clone cell lines positive or negative for the deletion. In order to determine the impact of the deletion del(5)(q34) on the viability of these cells lines, the apoptotic and cytotoxic tests were used. The L-asparaginase enzyme and ultraviolet radiation were used as the apoptotic inducers. The L-asparaginase was chosen for its specific effects on leukaemic cells whereas the UV radiation represented a non-specific lethal signal.

Results of this bachelor thesis confirm the participation of deletion del(5)(q34) in processes responsible for the sensitivity of leukaemic cells to L-asparaginase. Cells with this deletion are more sensitive to the cytotoxic effects of L-asparaginase, whereas absence of this deletion leads to higher resistance of the cells. This likely relates with the response of ALL patients to their therapy. (In Czech)

## Keywords

L-asparaginase, leukaemia, resistance, deletion, apoptosis





# Obsah

<b>Poděkování</b>	<b>3</b>
<b>Abstrakt</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>3</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>5</b>
1.1 Leukemie . . . . .	5
1.1.1 Vznik leukemie . . . . .	5
1.1.2 Molekulární genetika leukemií . . . . .	6
1.1.3 Rozdělení leukemií . . . . .	7
1.1.4 Léčba leukemií, remise a relaps onemocnění . . . . .	8
1.2 Akutní lymfoblastická leukemie v dětském věku . . . . .	9
1.2.1 Klinické projevy ALL . . . . .	9
1.2.2 Chromosomální aberace u dětských ALL . . . . .	10
1.3 Léčba dětské akutní lymfoblastické leukemie . . . . .	11
1.3.1 Počátky léčby dětské ALL . . . . .	12
1.3.2 Současná léčba dětské ALL . . . . .	12
1.3.3 Podpůrná léčba . . . . .	13
1.4 L-asparaginasa . . . . .	13
1.4.1 Použití v terapii ALL . . . . .	13
1.4.2 Mechanismus účinku . . . . .	14
1.4.3 Rezistence vůči L-asparaginase . . . . .	14
1.4.4 Delece del(5)(q34) . . . . .	16
<b>2 Cíl práce</b>	<b>17</b>
<b>3 Materiál a metody</b>	<b>19</b>
3.1 Chemikálie . . . . .	19
3.2 Přístroje . . . . .	20
3.3 Metody . . . . .	22
3.3.1 Práce s buněčnými liniemi . . . . .	22
3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk . . . . .	22
3.3.1.2 Rozmražení buněk . . . . .	22

3.3.1.3	Pasážování buněk . . . . .	23
3.3.1.4	Počítání buněk . . . . .	23
3.3.1.5	Zamražení buněk . . . . .	23
3.3.2	Příprava monoklonálních buněčných linií . . . . .	24
3.3.3	Cytotoxický test s použitím MTS . . . . .	24
3.3.4	Měření apoptosy . . . . .	26
3.3.5	Stanovení hladiny laktátu . . . . .	27
3.3.5.1	Laktát . . . . .	28
3.3.5.2	Celkové množství proteinu . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>31</b>
4.1	Příprava monoklonálních buněčných linií . . . . .	31
4.2	Cytotoxický test s použitím MTS . . . . .	32
4.3	Měření apoptosy . . . . .	33
4.4	Stanovení hladiny laktátu . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>39</b>
	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>41</b>

# Seznam použitých zkratek

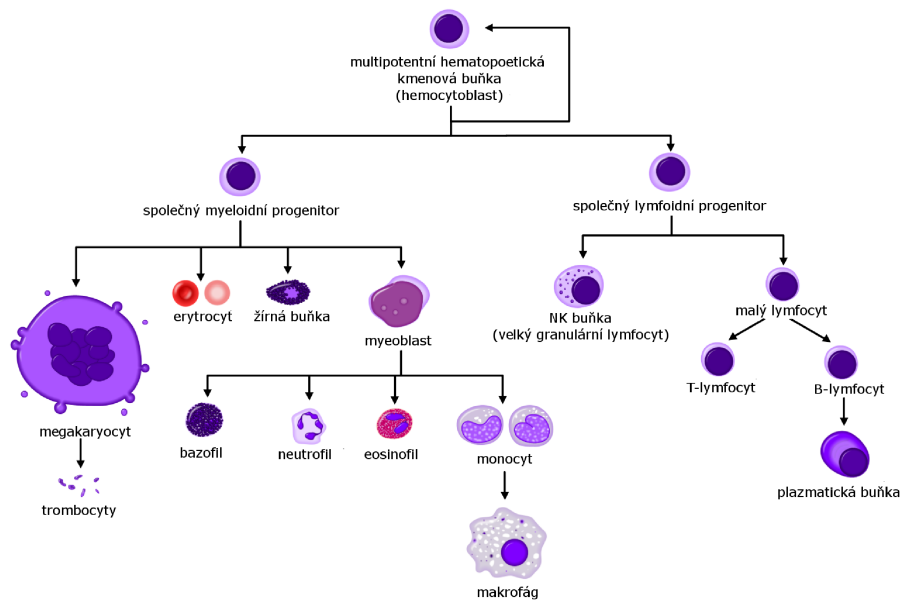
ABL	gen (Abelson Murine Leukaemia)
AF4	gen (ALL-1 Fused gene from chromosome 4)
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
AML	gen (Acute Myeloid Leukaemia)
ASNS	asparagin syntetasa
ATLL	T-buněčná leukemie/lymfom dospělých (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma)
ATP	adenosintrifosfát
BCR	gen (Breakpoint Cluster Region)
BCR/ABL	fúzní gen
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CLL	chronická lymfatická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (DeoxyriboNucleic Acid)
EFS	přežití bez události (Event Free Survival)
FAB	francouzsko-americko-britská spolupracující skupina (French-American-British Cooperative Group)
FBS	fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HCL	vlasatobuněčná leukemie (Hairy Cell Leukemia)
HLA	lidské leukocytární antigeny (Human Leukocyte Antigen)
HR	pacienti s vysokým rizikem (High Risk)
IR	pacienti se středním rizikem (Intermediate Risk)
K	kontrolní buňky
L-asp	L-asparaginasa
LGL leukemie	leukemie z velkých granulovaných lymfocytů (Large Granular Lymphocytic)
MLL	gen (Mixed Lineage Leukaemia)
MLL/AF4	fúzní gen
MRN	minimální reziduální nemoc (MRD – Minimal Residual Disease)
mTORC1	proteinový komplex (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1)

MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)- -2-(4 sulfofenyl)-2H-tetrazolium)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
Ph	philadelphský chromosom
PMSF	phenylmethylylsulfonylfluorid
PLL	promyelocytární leukemie
REAL	revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfoidních nádorů (Revised European-American Lymphoma)
rezREH	buněčná linie REH rezistentní vůči L-asparaginase
RIPA pufr	lyzační pufr (RadioImmunoPrecipitation Assay)
RTG	rentgenové záření
SR	pacienti se standardním rizikem (Standard Risk)
TEL	gen (Translocated E-twenty six Leukaemia)
TEL/AML1	fúzní gen
UV	ultrafialové záření
UV-C	ultrafialové záření typu C
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

# 1. Úvod

## 1.1 Leukemie

Pojem leukemie dnes zahrnuje celou řadu maligních onemocnění postihujících hemopoetický systém. Všechny buňky krve vznikají ze stejné pluripotentní kmenové buňky postupnou diferenciací (obrázek 1, str. 5). Leukemické buňky však nedospívají tak, jak by měly, jsou zachyceny na některém stupni krvetvorby a začnou proliferovat. Tyto nezralé krevní buňky – leukemické blasty vznikají v kostní dřeni a zaplňují krevní řečiště. [1], [2]



Obrázek 1: Schéma krvetvorby (převzato z [3])

### 1.1.1 Vznik leukemie

Všeobecně uznávaná teorie vícestupňového procesu při vzniku maligního onemocnění je platná i v případě leukemií. Na procesu vzniku onemocnění se podílí celá řada faktorů, které můžeme rozlišit na vnější a vnitřní. Vnější faktory můžeme dále dělit dle jejich povahy na:

- fyzikální – ionizující záření (nejznámější rizikový faktor), neionizující záření
- chemické – cytostatická léčba jiných druhů rakoviny, různé chemikálie
- biologické – viry (přímé i nepřímé působení) [4].

Mezi vnitřní faktory řadíme již existující chromosomální změny a genetické dispozice jedince. Leukemie však není chorobou dědičnou [4]. Dalšími důležitými faktory podílejícími se na vzniku onemocnění jsou věk, pohlaví, zdravotní stav (především stav imunitního systému) a životní styl (strava, kouření [5]).

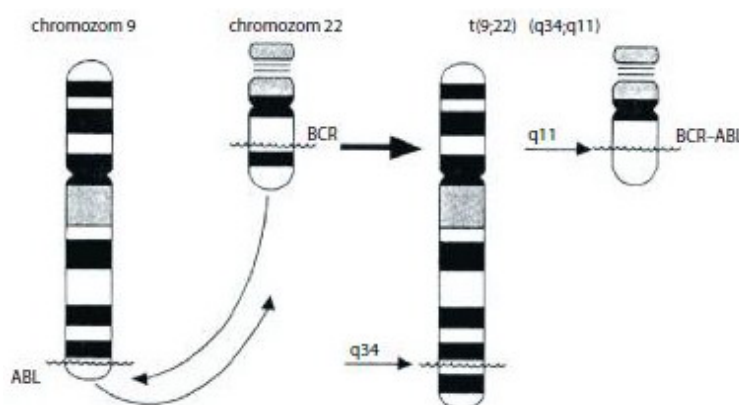
Jednou z teorií vzniku leukemie v dětském věku je i abnormální odpověď organismu na setkání s pro něj neznámou virovou infekcí [6].

Doložené případy vrozených leukemií a onemocnění novorozeneckého či kojeneckého věku ukazují na možnost počátku leukemogenního procesu již do období prenatálního vývoje [7].

### 1.1.2 Molekulární genetika leukemií

Vznik leukemie je spojen s hromaděním mutací v genomu kmenových buněk nebo progenitorů, což jsou částečně diferencované buňky jednotlivých řad krvetvorby [1]. Tyto změny mohou být pouze bodovými mutacemi, kdy je provedena záměna jednotlivých bazí nukleových kyselin, ale i velkými změnami na úrovni počtu chromosomů [8]. Jako důkaz genové podstaty leukemií posloužily například myší modely, u kterých se po přenesení určitých genů podařilo vyvolat choroby podobné lidské akutní promyelocytární leukemii [9].

První skupinou genů zodpovědných za vznik malignity jsou onkogeny. Tyto geny se v nemutované formě nazývají protoonkogeny a účastní se regulace proliferace buněk. Jako aktivované onkogeny však produkují proteiny se zvýšenou aktivitou nebo bez regulačních vlastností [4]. Příkladem takové aktivace onkogenu může být bodová mutace, fúze genů (translokace (obrázek 2, str. 6), delece) nebo transpozice genu do transkripčně aktivní oblasti jiného genu [10].



Obrázek 2: Vznik fúzního genu BCR/ABL (upraveno podle [11]). Jedna z možných příčin aktivace onkogenu spojená s rozvojem leukemií.

Druhou skupinou genů participujících na procesu leukemogeneze jsou antionkogeny. Ty tlumí proliferaci a stimulují diferenciaci či apoptosu. Mutace způsobují jejich inhibici, a tak je podpořena buněčná proliferace na úkor diferenciace [4]. Prodloužení doby života leukemických buněk v důsledku defektu apoptosy a ztráta schopnosti diferenciace při zachování proliferace je to, co činí tyto buňky nebezpečnými pro náš organismus. Při aktivaci onkogenu postačuje mutace pouze v jedné jeho alele (mutace dominantní), zatímco u antionkogenů je mutace recesivní a musí k ní tedy dojít na obou alelách [12].

### 1.1.3 Rozdělení leukemií

Existují dva základní systémy pro dělení leukemií. První je tzv. FAB (French-American-British Cooperative Group) klasifikace [13] a druhou je tzv. WHO (World Health Organisation) klasifikace [14], vybudovaná na základech původní tzv. REAL (Revised European-American Lymphoma) klasifikace z roku 1994 [15].

#### **FAB klasifikace:**

- 1) akutní leukemie
  - a) akutní myeloidní leukemie (AML)
    - podtypy M0 – M7
    - vzácné typy AML
  - b) akutní lymfoblastická leukemie (ALL)
    - podtypy L1 – L3
    - vzácné typy ALL
  - c) akutní nediferencovatelná leukemie
  - d) bilineární/bifenotypická akutní leukemie
- 2) chronické leukemie
  - a) chronická myeloidní leukemie (CML)
  - b) chronické leukemie vycházející z lymfatické řady
    - chronická lymfatická leukemie (CLL)
    - prolymfocytární leukemie (PLL)
    - vlasatobuněčná leukemie (HCL), její variantní forma
    - leukemie z velkých granulovaných lymfocytů (LGL leukemie)
    - T-buněčná leukemie/lymfom dospělých (ATLL)

3) myelodysplastický syndrom

#### **WHO klasifikace:**

- 1) nádory myeloidních tkání, včetně myelodysplastického syndromu
- 2) nádory z lymfatických tkání, včetně tzv. potransplantačních lymfoproliferativních onemocnění
- 3) nádorová onemocnění vycházející z mastocytů
- 4) nádory z histiocytů a dendritických buněk

### **1.1.4 Léčba leukemií, remise a relaps onemocnění**

Jednotlivé typy leukemie se léčí za pomoci chemoterapie, radioterapie a bioterapie podle speciálních protokolů. Dochází také k jejich úpravám a jsou pacientovi individualizovány dle jeho prognostických vyhlídek tak, aby byla léčba co nejefektivnější [16]. Pacienti s leukemií se nejčastěji dělí do tří základních prognostických skupin:

- s vysokým rizikem (HR)
- se středním rizikem (IR)
- se standardním rizikem (SR).

Hlavními parametry pro toto rozdělení jsou časná odpověď na léčbu a chromosomální aberace leukemických buněk [12].

Remise je stav, kdy vymizí známky onemocnění a při vyšetření krve nejsou nalezeny žádné leukemické buňky nebo jsou v určitém tolerovaném množství [17]. Přítomnost reziduálních leukemických buněk pacientů v remisi se nazývá minimální reziduální nemoc (MRN). Dle způsobu jejího stanovení rozlišujeme tři druhy remise:

- hematologická remise – založená na pozorování buněk
- cytogenetická remise – pozorující absence chromosomálních markerů
- molekulární remise – studující absence specifických genů nebo jejich přestaveb [18], [19].

Relaps onemocnění je hlavním problémem komplikujícím léčbu leukemií a postihuje 20 – 25 % dětských pacientů [20]. Jde o návrat onemocnění po období, kdy bylo již v remisi. Z hlediska časového rozděluje relapsy na časně a pozdní, z pohledu



lokalizačního na dřevňové a mimodřevňové. Nejhorší prognózu mají časné dřevňové relapsy, zatímco relapsy pozdní mimodřevňové jsou prognosticky nejlepší. Mimodřevňovými relapsy bývá nejčastěji postižena centrální nervová soustava nebo varlata u chlapců [21]. Léčba relapsu je vždy obtížnější než dosažení prvotní remise, protože buňky jsou většinou rezistentní k původní terapii [22]. U nízkorizikových pacientů se k léčbě využívá pouze intenzivní chemoterapie, ale u vysocerizikových pacientů musí být zakončena transplantací kostní dřeně od HLA-identického sourozence nebo vhodného dárce [23].

Velmi důležitým pojmem je také tzv. přežití bez události (EFS). Tento parametr označuje dobu, po kterou nedošlo k definované události, nejčastěji relapsu onemocnění [21].

## 1.2 Akutní lymfoblastická leukemie v dětském věku

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastějším nádorovým onemocněním dětského věku a tvoří 80 % všech leukemií [2]. Ročně je v České republice diagnostikováno kolem 70 nových dětí [24]. V současnosti je pravděpodobnost jejího vyléčení 75 – 80 %, přičemž úspěšnost léčby je velmi závislá na podtypu ALL [20]. K relapsům onemocnění dochází nejčastěji u rizikových pacientů s nepříznivými prognostickými faktory nebo v případě vzniku rezistence na léčbu. Největší část pacientů jsou děti ve věku 2 – 5 let. Kojenci do jednoho roku tvoří 3 – 5 % a děti starší deseti let 30 %. Tato choroba častěji postihuje chlapce než děvčata [2].

ALL není jednou chorobou, je to heterogenní onemocnění, jehož jednotlivé formy se velmi liší. Rozdílnosti lze sledovat v klinických příznacích, laboratorních nálezech, odpovědi na léčbu i ve věku nástupu choroby. Jednotlivé podskupiny jsou přesně genotypově i imunofenotypově charakterizovány [25].

### 1.2.1 Klinické projevy ALL

Problémy související s rozvojem ALL u většiny pacientů přetrvávají týdny až měsíce, ale výjimečně mohou i zcela chybět.

Horečka bývá jedním z průvodních symptomů onemocnění ALL. Je buď indukována jako odpověď na pyrogenní cytokiny produkované leukemickými buňkami nebo vzniká v důsledku infekce získané díky potlačenému imunitnímu systému [25]. Dalšími častými projevy nemoci jsou nechutenství, únava a bledost. Mohou se také objevit podlitiny v důsledku poruch srážlivosti krve [21].

Obvykle dochází ke zvětšení uzlin, sleziny (splenomegalie) a jater (hepatomegalie) a mohou nastat i obtíže s dýcháním. Velmi závažně bývají často postiženy i ledviny [2].

U jedné třetiny dětí se leukemie projevuje bolestmi kostí a kloubů. Na RTG snímku jsou vidět změny v jejich struktuře, nejčastěji ve formě příčných prosvětlených proužků v oblasti mezi střední částí a kloubním koncem (oblast metafýzy) dlouhých kostí nebo jako kompresivní zlomeniny obratlů [20].

Krevní obraz pacientů se velmi liší dle podtypu leukemie. Počet bílých krvinek může být zvýšený, normální i snížený [25]. Průběh nemoci bývá doprovázen nebezpečnými krvácivými stavy s hrozbou krvácení do mozku či do plic [2].

Iniciální leukemická infiltrace mozku se projevuje bolestmi hlavy, zvracením a krvácením na očním pozadí. Leukemická infiltrace varlat se vyznačuje tuhým nebolestivým zduřením jednoho nebo obou varlat [21].

K projevům samotné leukemie se přidávají také potíže jiných chorob, kterými pacienti v důsledku oslabeného imunitního systému velmi často trpí [25].

## 1.2.2 Chromosomální aberace u dětských ALL

Chromosomální změny se vyskytují u 90 % dětských pacientů s ALL [25]. Tyto genotypové abnormality mají zásadní prognostický význam a slouží také k individualizaci léčebných protokolů. Nejtypičtější jsou translokace vedoucí ke vzniku fúzních genů a změny v počtech homologních sad chromosomů [26].

- TEL/AML1+ ALL

Tento druh leukemie vychází z prekurzorů B-lymfatické řady a vyskytuje se u 25 % dětských ALL. Fúzní gen TEL/AML1 je produktem translokace t(12;21) a je příznivým prognostickým znakem. Buňky tohoto typu leukemie jsou velmi citlivé na L-asparaginasu a šance na vyléčení dosahuje až 90 % [27].

- Hyperdiploidie nad 50 chromosomů

Hyperdiploidie se vyskytuje až u 25 % dětských pacientů s ALL. Bývá spojována s menším počtem translokací než u jiných druhů ALL. Prognóza pacientů s více než 50 chromosomy v blastech je velmi dobrá. Tyto formy leukemie jsou velmi citlivé na léčbu antimetabolity a pravděpodobnost vyléčení je až 90 % [26].

- Ph+ ALL, BCR/ABL+ ALL

Philadelphský chromosom a/nebo fúzní gen BCR/ABL (obrázek 2, str. 6) se vyskytuje u 3 – 4 % dětských ALL. Jsou nositeli velmi špatné prognózy. Důležitá je u těchto leukemií reakce na iniciální léčbu. Šance na přežití se u dobře reagujících pacientů pohybuje kolem 40 % a transplantace kostní dřeně ji ještě zvyšuje. Bohužel děti s pomalou odpovědí na počáteční léčbu mají extrémně špatnou

prognózu s pravděpodobností vyléčení v rozmezí 0 – 10 %. Tyto druhy leukemie bývají také často spojeny s nálezem iniciální leukemické infiltrace mozku [28].

- Přestavby dlouhého raménka chromosomu 11 (11q23)

Nejčastějším postižením tohoto chromosomu je translokace  $t(4;11)$ , jež vede ke vzniku fúzního genu MLL/AF4 [26]. Ten se vyskytuje u 50 % kojeneckých ALL a často také u dospívajících pacientů. U dětí ve věku 1 – 10 let prakticky chybí. Jedná se o extrémně nepříznivý prognostický znak, přičemž šance na vyléčení je 5 – 10 %. Tento typ leukemie je spojován s iniciální infiltrací mozku a velmi nezralým fenotypem B-buněk, který vyžaduje speciální léčbu kombinující schéma pro ALL i AML. Také další změny postihující tento chromosom jsou špatným znakem pro léčbu [29].

- Translokace  $t(8;14)$

Tato translokace je nejčastěji spojována s ALL zralých B-buněk a mohou při ní vznikat nitrobřišní nádorové masy. Pokud však léčba probíhá podle speciálního protokolu, je prognosticky příznivá a pravděpodobnost vyléčení dosahuje 80 % [26].

- Hypodiploidie

K hypodiploidii dochází u dětských pacientů velmi vzácně, a to u 3 – 9 %. Tento typ leukemie má extrémně špatnou prognózu a je nutné provést transplantaci kostní dřeně v první kompletní remisi [26].

- Komplexní změny karyotypu

Takovéto změny se objevují u 10 % dětí s ALL a jsou většinou spojeny s negativní prognózou [26].

### 1.3 Léčba dětské akutní lymfoblastické leukemie

Za posledních šedesát let bylo v léčbě dětské ALL dosaženo obrovského pokroku. V padesátých letech 20. století panovalo přesvědčení, že je tato nemoc bez výjimky smrtelná a cytostatika byla používána pouze k její paliativní léčbě, tedy ke zlepšení kvality života nemocných a nikoli k úplnému vyléčení [24]. Nyní je vyléčeno 80 - 85 % dětí [20]. Zásadní roli ve vývoji léčby sehrály randomizované studie.

### 1.3.1 Počátky léčby dětské ALL

Prvním důležitým momentem bylo zahájení klinických studií, využívajících k léčbě dětské ALL kombinovanou chemoterapii, které inicioval v letech 1962 – 1966 profesor Donald Pinkel v St. Jude Hospital v Memphisu [30]. Pacienti byli měsíc v indukční léčbě, kdy jim byl podáván prednison a vinkristin. Na ni navazovala udržovací terapie složená z merkaptopurinu, metotrexátu a pulsů vinkristinu a prednisonu. Celková doba léčby byla 2 – 3 roky, přičemž se remise podařilo dosáhnout u 90 – 95 % dětí a dlouhodobý EFS dosáhl 9 %. Většina dětí však v průběhu této léčby či po jejím skončení prodělala relaps leukemie, který v 50 % případů postihl centrální nervový systém [31]. Z tohoto důvodu se k léčbě ALL přidalo profylaktické ozáření CNS v dávce 24 Gy. Účinnost ozáření v prevenci CNS relapsu byla prokázána v randomizované studii a jeho výskyt klesl pod 10 %. Do schématu indukční léčby byl v 60. a 70. letech přidán daunorubicin a EFS se tak zvýšil až na 36 % [32]. Postupem času byla léčba upravována pomocí dalších látek a časově stratifikována tak, aby se dosáhlo co nejlepších výsledků.

### 1.3.2 Současná léčba dětské ALL

V současné době jsou v České republice používány německé léčebné protokoly tzv. BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), které mají jedny z nejlepších výsledků na světě. Aktuálně používaným je protokol AIEOP-BFM ALL 2009 [33]. Léčba je složena z několika fází. První se nazývá indukce a slouží k navození remise onemocnění v trvání jednoho měsíce. Jako chemoterapeutika se zde používají prednison, vinkristin, daunorubicin a L-asparaginasa [34]. Dále pokračuje konzolidační fáze, kdy je podáván cytosinarabinosid, merkaptopurin [35], cyklofosamid a vysokodávkovaný metotrexát [36]. Poslední fází intenzivní léčby je tzv. pozdní intenzifikace, kdy je zopakována obdoba indukční fáze [20]. Jako prevence a léčba leukemické infiltrace mozku je používáno podávání metotrexátu injekční formou v oblasti bederní páteře [36], které je u rizikových pacientů doplněno radioterapií. Intenzivní chemoterapie je následována udržovací léčbou, při které je pacientovi podáván merkaptopurin a metotrexát do celkové délky terapie dvou let. U skupiny dětí vysokého rizika je v první remisi ALL transplantována kostní dřeň od HLA-identického sourozence či vhodného dárce [23].

Speciální skupinu při léčbě tvoří pacienti mladší jednoho roku, jelikož většinou trpí odlišným typem ALL s velmi nezralými prekurzory a přestavbou MLL genu. Při standardní chemoterapii dochází k velmi špatné odpovědi, a proto je používán mezinárodní protokol Interfant, který v sobě spojuje léčebné prvky z terapie akutní lymfoblastické i myeloidní leukemie [29]. Také léčba pacientů s BCR/ABL pozitivní ALL probíhá po-

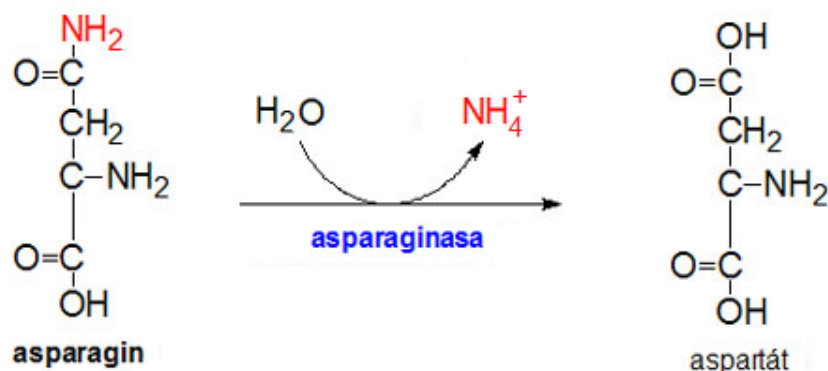
dle speciálního protokolu [28]. Pro zlepšení prognózy tohoto nepříznivého typu leukemie je do terapie zařazen „lék nové generace“. Je jím imatinib mesylát (Glivec/Gleevec), který specificky inhibuje patologickou BCR/ABL tyrosinkinasu [37].

### 1.3.3 Podpůrná léčba

Nezbytnou součástí náročné chemoterapie je podpůrná léčba. V důsledku dlouhodobých úbytků všech krevních buněk je nutností podávat pacientům krevní deriváty [20]. Dále pak je důležité včas řešit problémy vzniklé oslabením imunitního systému pacienta a četné vedlejší účinky podávaných léků. Při nedostatečném zásahu může díky infekčním komplikacím dojít až ke smrti dítěte. Jako nejkritičtější se považuje období do dosažení remise základního onemocnění [24].

## 1.4 L-asparaginasa

L-asparaginasa je enzym, který katalyzuje přeměnu aminokyseliny asparaginu na aspartát (obrázek 3, str. 13) a zároveň má také glutaminasovou aktivitu, jelikož je schopen přeměňovat i glutamin na glutamát [38], [39]. Hydrolýza těchto aminokyselin probíhá za uvolňování amoniaku. Přirozeně se vyskytuje u rostlin, živočichů i mikroorganismů, ze kterých je získáván pro terapeutické účely [40].



Obrázek 3: Hydrolýza asparaginu na aspartát působením enzymu L-asparaginasa

### 1.4.1 Použití v terapii ALL

Protinádorové účinky L-asparaginasy byly objeveny v roce 1953, kdy byl pozorován úbytek lymfomů u myši a krys po aplikaci séra z morčete [41]. Záhy bylo zjištěno, že samotné sérum není za potlačení nádoru zodpovědné, ale obsahuje enzym, který má

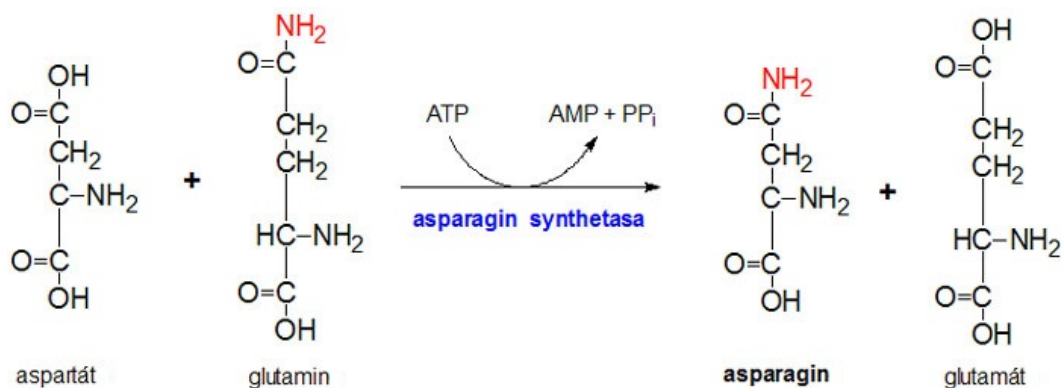
léčebné účinky [42]. Pro aplikaci pacientům s leukemií se nyní využívá L-asparaginasa izolovaná z kmene *Escherichia coli* nebo *Erwinia carotovora*. Velkou výhodou je, že při vzniku alergie na enzym od jednoho kmene se může v následující terapii používat L-asparaginasa kmene druhého, jelikož protilátky vznikající proti jednomu preparátu nemají zkříženou reakci se druhým [43]. V monoterapii L-asparaginasou se dosahuje kompletní remise u 40 – 60 % všech dětských ALL pacientů [44], [45], [46], je tedy esenciální komponentou moderních léčebných protokolů. Navíc je to jeden z prvních léků, které působí cíleně proti nádorovým buňkám a má ve srovnání s jinými chemoterapeutiky málo vedlejších účinků. Již více než 20 let nebyly do iniciální léčby ALL přidány žádné nové léky a potenciál těch stávajících se zdá být vyčerpán. Nadějí je však L-asparaginasa, jejíž optimální dávka a schéma podání je stále předmětem randomizovaných léčebných studií a dle posledních výzkumů skýtá ještě spoustu neobjevených možností [39].

### 1.4.2 Mechanismus účinku

Růst maligních i normálních buněk je závislý na přísunu látek nezbytných pro metabolismus buňky. Cytotoxický efekt L-asparaginasy spočívá v přeměně extracelulárního asparaginu a glutaminu, čímž dochází ke snížení jejich hladiny v krevním séru [38]. Obě tyto aminokyseliny jsou nepostradatelné pro optimální růst buněk a tkání. Zdravé buňky si jejich nízkou hladinu kompenzují pomocí asparagin synthetasy a jsou schopné i zvýšit aktivitu tohoto enzymu jako odpověď na nedostatek asparaginu [48]. Asparagin synthetasa (ASNS) je antagonistka L-asparaginasy, tedy enzym, který je schopný endogenní syntézy asparaginu. Tato ligasa přenáší aminoskupinu z glutaminu na aspartát za spotřeby ATP (obrázek 4, str 15). V eukaryotních buňkách je označována jako glutamin-dependentní, protože nevyužívá jiné substráty [49]. Leukemické blasty mají však expresi ASNS v porovnání se zdravými buňkami sníženou a jsou tedy závislé na extracelulárním asparaginu a glutaminu [50], [51]. Při jejich nedostatku dochází k poškození proteosyntézy a následně k navození buněčné smrti.

### 1.4.3 Rezistence vůči L-asparaginase

Velkým problémem u dětské ALL je relaps onemocnění, který postihuje 15 – 20 % pacientů [20]. Jednou z příčin jeho vzniku může být neúčinnost terapie v důsledku rezistence vůči L-asparaginase. Přesné mechanismy vzniku rezistence zatím ještě nejsou známy, je však jisté, že je to komplexní proces, na kterém se podílí celá řada faktorů. Při lepším pochopení přesného mechanismu účinku L-asparaginasy bude jednodušší objasnit



Obrázek 4: Syntéza asparaginu enzymem asparagin synthetasa

i vznik rezistence.

Jednotliví pacienti s ALL se liší citlivostí k L-asparaginase a také hladinou exprese genu ASNS [52], [53]. Zvýšená exprese tohoto genu jako původce rezistence se stala prvotní hypotézou a počáteční studie na modelech leukemických linií ji potvrzovaly. ALL buněčné linie rezistentní vůči L-asparaginase mají zvýšenou expresi ASNS a naopak zvýšená exprese ASNS vede ke vzniku rezistentního fenotypu [52]. Ovšem studie prováděné na vzorcích od pacientů na stejný závěr nepoukazovaly. Jedním z faktů potvrzujících nezávislost rezistence na expresi ASNS je paradox nalezený u ALL pacientů s fúzním genem TEL/AML1 [54], [55]. Byla u nich zjištěna zvýšená exprese ASNS, přesto jsou citlivější na léčbu L-asparaginasou než pacienti bez tohoto fúzního genu. Bylo dokázáno, že hladina exprese genu ASNS se u jednotlivých pacientů liší, ale celkově je velmi nízká a nekoreluje s citlivostí na terapii L-asparaginasou[56].

Další teorie vzniku rezistence vůči L-asparaginase byla založena na možnosti ochrany leukemických buněk před nedostatkem asparaginu prostřednictvím jeho syntézy mesenchymálními buňkami kostní dřeně [57]. V období indukční léčby, kdy je L-asparaginasa podávána, byla měřena hladina asparaginu v krvi a kostní dřeni. Zvýšená koncentrace v kostní dřeni ovšem nebyla prokázána, a tak tato hypotéza zřejmě pravdivá není [58].

Při porovnávání citlivých buněčných linií a jejich rezistentních protějšků bylo objeveno, že vznik rezistence by mohl souviset s regulací translace a metabolismem leukemických buněk [59]. Metabolické změny maligních buněk jsou spolu s dalšími procesy řízeny onkogeny a tumorsupresory [60]. Transformace buněčného metabolismu jsou uskutečňovány k zajištění přísunu intermediálních metabolitů pro syntetické pochody a k tvorbě dostatečného množství energie ve formě ATP a redukčních ekvivalentů [61]. Hlavním zdrojem energie nádorových buněk je glutamin [62], který je i důležitým aktivátorem dráhy regulující translaci [63]. L-asparaginasa tak díky své glutaminasové aktivitě zřejmě ovlivňuje i tyto buněčné pochody [59].

Vliv L-asparaginasy na translační dráhu byl popsán již v roce 1999 [64]. Jejím klíčovým členem je proteinový komplex mTORC1, který je také zodpovědný za regulaci autofagie. Tento proces degraduje poškozené membránové struktury, jejichž složky mohou být využity jako alternativní zdroj energie. Při rozsáhlém poškození může autofagie vést až k buněčné smrti [65]. L-asparaginasa zřejmě inhibuje mTORC1, a tak navozuje autofagii. Indukce autofagie L-asparaginasou byla popsána v ovariaálních nádorových buňkách [66]. Probíhající studie naznačují, že L-asparaginasou by mohla být ovlivňována i autofagie u buněk leukemických, přičemž exprese genů tohoto procesu je u rezistentních pacientů změněná [59].

Typickou metabolickou změnou nádorových buněk je tzv. Warburgův efekt, kdy je pro získání energie upřednostňována až 200x rychlejší glykolýza před oxidativní fosforylací [67], [68], [69]. U zdravých buněk je v případě stresu možný přesmyk z glykolýzy k energeticky výhodnější oxidativní fosforylaci [70]. Jako jedno z možných působení cytostatik se tedy nabízí indukce změny zisku energie ve prospěch oxidativní fosforylace [71]. Publikovaná data naznačují, že procesy související s tímto metabolismem by mohly ovlivňovat rezistenci vůči L-asparaginase. U rezistentních pacientů byla nalezena zvýšená exprese genů, jejichž produkty jsou klíčovými enzymy při oxidativní fosforylaci [72].

#### 1.4.4 Delece del(5)(q34)

Při studiu mechanismů rezistence leukemických buněk na L-asparaginasu byla v laboratořích CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) objevena delece na chromosomu 5 u buněčné linie REH [59]. Modelová linie REH je tvořena leukemickými blasty prekurzorů pro B-lymfocyty, které nesou translokaci t(12;21) vedoucí ke vzniku fúzního genu TEL/AML1 [73], [74]. Zkoumaná delece se vyskytuje u buněk citlivých na L-asparaginasu, zatímco u buněk rezistentních není zastoupena téměř vůbec (tabulka 1, str. 16). Její procentuální zastoupení je již pod rozlišovací schopností metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace), kterou byly buněčné linie vyšetřeny. Ve zkoumané deleci nebyly nalezeny žádné kódující oblasti. Může však obsahovat regulační oblasti pro geny, které ovlivňují mechanismy vedoucí k rezistenci [59]. Stala se tak předmětem dalšího výzkumu, jehož součástí je i tato bakalářská práce.

Tabulka 1: Zastoupení delece u citlivých a rezistentních buněčných linií

	bez delece / %	del(5)(q34) / %
REH	24,7	75,3
rezREH	94,4	5,6



## 2. Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo prozkoumat vliv delece  $\text{del}(5)(\text{q}34)$  na citlivost leukemických buněk vůči L-asparaginase. Objasnění mechanismů vedoucích k rezistenci na toto cytostatikum by mohlo pomoci zlepšit terapeutické postupy. Pokud by došlo k identifikaci znaků, kterými by bylo možné rozlišovat jednotlivé pacienty s akutní lymfoblastickou leukemií na základě senzitivity k L-asparaginase, mohlo by se dosáhnout větší individualizace léčebných protokolů.

Pro tento cíl bylo nejprve nutné získat klony buněk pozitivní a negativní na tuto delecí. Dále byly provedeny experimenty sledující závislost mezi přítomností delece a schopností buněk přežít v prostředí s L-asparaginasou. Další apoptotické testy a měření byly uskutečňovány se snahou zjistit odlišnosti klonů vzniklé přítomností či nepřítomností delece  $\text{del}(5)(\text{q}34)$ .



# 3. Materiál a metody

## 3.1 Chemikálie

**Bio-Rad**, Německo

- sada pro stanovení proteinu: DC Protein Assay Kit II (reagent A, B, S, BSA standard)

**EXBIO**, Česká republika

- annexinový pufr: Annexin V Binding Buffer (10x)
- annexin: Annexin V Dyomics 647

**Lékárna FN Motol**, Česká republika

- fosfátový pufr (PBS), pH 7,2

**Life technologies**, USA

- kultivační médium: Gibco®<sup>®</sup>, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, GlutaMAX™
- směs antibiotik a antimykotik: Gibco®<sup>®</sup>, Antibiotic-Antimycotic, 100X
- fetální hovězí sérum: Gibco®<sup>®</sup>, Fetal Bovine Serum Qualified (USA origin)

**Lonza**, Švýcarsko

- trypanová modř: BioWhittaker™<sup>™</sup>, Trypan Blue 0,4% Solutio

**MACS Miltenyi Biotec**, Japonsko

- propidium jodid: Propidium Iodide Solution

**Medac**, Německo

- L-asparaginasa: Asparaginase Medac

**Merck**, Německo

- Triton®<sup>®</sup> X-100

**Penta**, Česká republika

- chlorid sodný: NaCl

#### **Promega, USA**

- MTS: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

#### **Roche, Švýcarsko**

- proteasový inhibitor: Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets
- phenylmethanolsulfonylfluorid: PMSF
- chlorid hořečnatý: MgCl<sub>2</sub> Solution 25mM

#### **Serva, Německo**

- pufr: Tris-HCl pH 7,5, 1M solution

#### **Sigma-Aldrich, USA**

- dimethylsulfoxid: DMSO ≥ 99,9 %
- dodecylsulfát sodný: SDS BioUltra
- ethylendiamintetraoctová kyselina: EDTA BioUltra
- sulfid sodný: NaF BioXtra ≥ 99,0 %
- orthovanadát sodný: Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 90 %

#### **Trinity Biotech, Irsko**

- sada pro měření laktátu: Lactate Kit: Reagent 10 x 10 ml, Standart Set

## **3.2 Přístroje**

#### **BD, USA**

- průtokový cytometr: LSR II
- cytometrické zkumavky: Round-Bottom Tube 5 ml

#### **Bio Centrix, USA**

- sterilní špičky na pipety s filtrem: Pipette Tips

#### **Greiner bio-one, USA**

- plastové šroubovací zkumavky: Cell Star Tubes 15, 50 ml

**Hettich**, Německo

- centrifugy: Universal 32R (rotor 1619, 1653), Universal 320 (rotor 1624)

**Hirschmann**, Německo

- automatický nástavec na pipety: pipetus®

**IKA**, Německo

- vírník: Vortex 3

**Julabo**, Německo

- vodní lázeň: TW8

**Labnet International**, USA

- stolní minicentrifuga: Minifuge™

**Life technologies**, USA

- automatická počítací buněk: Countess®, Automated Cell Counter
- počítací sklíčko: Countess®, Cell Counting Chamber Slide

**Molecular Devices**, USA

- spektrofotometr pro 96-jamkové destičky: VersaMAX Microplate reader

**Nichiryo**, Japonsko

- automatické pipety: Nichipet EX

**Philips**, Nizozemsko

- germicidní lampa: TUV 30W T8 (UV-C)

**Schoeller Instruments**, Česká republika

- laminární box: Euroflow EF/S (Clean Air)

**Thermo Scientific**, USA

- inkubátor: Hera Cell 150
- zamrazovací zkumavky: Nunc, Cryo Tube Vials 1,0 ml
- zamrazovací nádoba: Nalgene, „Mr. Frosty” freezing container 1C

**TPP**, Švýcarsko

- kultivační láhve: Tissue Culture Flasks 25, 75 cm<sup>2</sup>
- jamkové destičky: Tissue Culture Test Plates 6, 12, 24, 96 wells

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Práce s buněčnými liniemi

Buněčná linie REH používaná v experimentech byla získána od německé firmy DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. Je to B-prekursorová leukemická buněčná linie nesoucí translokaci t(12;21), která vede ke vzniku fúzního genu TEL/AML1. Tyto malé kulaté buňky tvoří suspenzní populaci.

Buňky byly uchovávány v inkubátoru (Hera Cell 150, Thermo Scientific) při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> v kultivačních láhvích se šroubovacím uzávěrem s filtrem (Tissue Culture Flasks, TPP). Ideální koncentrace buněk při kultivaci je 0,5·10<sup>6</sup> buněk/ml, a tak byly dle potřeby a počtu buněk používány dvě velikosti láhví, s plochou pro růst buněk 25 cm<sup>2</sup> (5 ml média) nebo 75 cm<sup>2</sup> (15 ml média).

Veškerá práce s buňkami byla prováděna ve sterilním prostředí mikrobiologického laminárního boxu (Euroflow EF/S, Schoeller Instruments), aby nedošlo ke kontaminaci buněčných kultur mikroorganismy z vnějšího prostředí. Pouze zahřívání ve vodní lázni a používání velkých specializovaných strojů (centrifuga, cytometr, spektrofotometr) bylo uskutečňováno vně boxu.

#### 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk

Médium, v němž byly buňky kultivovány a které bylo používáno při všech experimentech (dále již jen „médium“), se skládalo z živného roztoku Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640, Life technologies) s 10% (v/v) obsahem inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS, Life technologies) a 1% (v/v) obsahem směsi antibiotik s antimykotiky (Antibiotic-Antimycotic, Life technologies).

Inaktivované FBS se získalo jeho rozmražením při 37°C ve vodní lázni (TW 8, Julabo) a následnou inaktivací při teplotě 56°C po dobu 30 minut.

#### 3.3.1.2 Rozmražení buněk

Buněčné linie skladované v tekutém dusíku byly na ledu přeneseny do vodní lázně (TW 8, Julabo), kde byly rozmrazeny při teplotě 37°C. Obsah zamrazovací zkumavky byl přepipetován do plastové šroubovací zkumavky, opatrně k němu bylo přikapáno 10 ml předem vytemperovaného média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) a zkumavka byla centrifugována (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) při 169g po dobu 5 minut při teplotě 25°C. Supernatant byl odstraněn, buněčná peleta resuspendována v 1 ml média a přenesena do kultivační láhve. Kultivační láhev

byla doplněna médiem na 5 ml a vložena do inkubátoru. Dále byly buňky pravidelně pasážovány (viz. 3.3.1.3 Pasážování buněk, str. 23) a když jich narostl dostatečný počet, byly přesazeny do větší kultivační láhve s 15 ml média. Část jich byla zamrazena a uložena zpět do tekutého dusíku (viz. 3.3.1.5 Zamražení buněk, str. 23).

### **3.3.1.3 Pasážování buněk**

Rostoucí a množící se buňky při kultivaci postupně z média odčerpávají živiny, proto je důležité médium pravidelně měnit. Zachovají se tak ideální podmínky a navíc také odstraní mrtvé buňky. Tento proces se nazývá pasážování a byl prováděn dvakrát týdně.

Do plastové šroubovací zkumavky byl přepipetován obsah kultivační láhve. Ta byla ještě promyta sterilním fosfátovým puforem (PBS, Lékárna FN Motol) a i ten byl přidán do zkumavky, která byla centrifugována (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) po dobu 5 minut při 169g a teplotě 25°C. Po ukončení centrifugace byl supernatant odlit a buněčná peleta resuspendována v 1 ml média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22). Po spočítání buněk (viz. 3.3.1.4 Počítání buněk, str. 23) byl odpipetován takový objem buněčné suspenze ze zkumavky do kultivační láhve, který obsahoval  $7,5 \cdot 10^6$  buněk. Kultivační láhev byla doplněna čerstvým médiem do 15 ml a vložena zpět do inkubátoru.

### **3.3.1.4 Počítání buněk**

Počítání buněk bylo prováděno na automatické počítače buněk (Automated Cell Counter, Life technologies). 10  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze bylo smícháno s 10  $\mu\text{l}$  trypanové modři (Trypan Blue, Lonza). 10  $\mu\text{l}$  této směsi bylo přeneseno do počítacího sklíčka (Cell Counting Chamber Slide, Life technologies) a vloženo do automatické počítačky. Získané hodnoty jsou celkový počet buněk v 1 ml, počet živých a mrtvých buněk v 1 ml, viabilita a velikost buněk.

### **3.3.1.5 Zamražení buněk**

Po centrifugaci (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) při 169g po dobu 5 minut za teploty 25°C byla buněčná peleta resuspendována v 1 ml média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) a buňky spočítány (viz. 3.3.1.4 Počítání buněk, str. 23). Poté byl odpipetován takový objem buněčné suspenze do zamrazovací zkumavky, který obsahuje  $10 \cdot 10^6$  buněk a doplněn médiem do objemu 600  $\mu\text{l}$ . Dále bylo do zkumavky připipetováno 100  $\mu\text{l}$  dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma-Aldrich) a 300  $\mu\text{l}$  inaktivovaného FBS (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22). Kvůli vysoké toxicitě DMSO musela být všechna práce prováděna velmi rychle a poté byla

zamrazovací zkumavka vložena v mrazící nádobě (Mr. Frosty, Thermo Scientific) na 24 hodin do teploty  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nakonec byla zamrazovací zkumavka s buňkami přemístěna do boxu s tekutým dusíkem pro dlouhodobé skladování.

### 3.3.2 Příprava monoklonálních buněčných linií

Nejprve bylo třeba získat monoklonální populace buněk, z nichž některé budou na delecii del(5)(q34) pozitivní a jiné negativní. K tomu bylo využito limitního ředění, které bylo provedeno níže popsáním způsobem.

Po spočítání buněk (viz. 3.3.1.4 Počítání buněk, str. 23) byla ve zkumavce jejich koncentrace upravena přidáním média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22 ) tak, aby dosahovala hodnoty  $1.10^6$  buněk/ml. Tato buněčná suspenze byla dále 100x naředěna, odpipetováním  $200\ \mu\text{l}$  do zkumavky s 20 ml média a tím byla získána koncentrace  $1.10^4$  buněk/ml. Poté byly připraveny zkumavky s koncentracemi 50 buněk na 10 ml, 300 buněk na 10 ml a 1000 buněk na 10 ml pipetováním 5, 30 a  $100\ \mu\text{l}$  buněčné suspenze ( $1.10^4$  buněk/ml) do zkumavek s 10 ml média. Nakonec byly připraveny tři 96-jamkové destičky. Do první byl po  $100\ \mu\text{l}$  rozpipetován obsah první zkumavky s počtem 50 buněk, a tak získána koncentrace 0,5 buněk ve  $100\ \mu\text{l}$ , tedy v jedné jamce. Stejně tak byla rozpipetována druhá i třetí zkumavka a získány destičky s koncentracemi 3 buňky a 10 buněk ve  $100\ \mu\text{l}$ .

Destičky byly vloženy do inkubátoru a každý den byl pod mikroskopem sledován růst a množení buněk. V některých jamkách se buňky vypěstovat nepodařilo, ale tam, kde buňky rostly, bylo opatrně odebíráno staré médium a přidáváno čerstvé. Když se buňky dostatečně namnožily, byly postupně přepipetovány a pěstovány v 24, 12 a 6-jamkových destičkách a nakonec v kultivačních láhvích. Buněčné linie z destičky s původní koncentrací 10 buněk/ $100\ \mu\text{l}$  byly vyřazeny, protože u nich byla pravděpodobnost monoklonality nejmenší. Nakonec bylo získáno 10 buněčných klonů.

Vzorky klonů byly poslány Doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. do Centra nádorové cytogenetiky v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze), kde bylo pomocí metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace) stanoveno procentuální zastoupení buněk pozitivních a negativních na delecii.

### 3.3.3 Cytotoxický test s použitím MTS

Tento cytotoxický test je založen na redukci MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4 sulfofenyl)-2H-tetrazolium) na formazan, která probíhá v ži-



vých buňkách pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Množství vzniklého barevného produktu se pak hodnotí spektrofotometricky.

Test byl proveden s monoklonálními liniemi 3, 4, 8 získanými limitním ředěním (viz. 3.3.2 Příprava monoklonálních linií, str. 24) i s původní linií REH podle stejného postupu uvedeného níže.

Při pasážování buněk (viz. 3.3.1.3 Pasážování buněk, str. 23) bylo nasazeno  $3 \cdot 10^6$  buněk do 6 ml média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) v 6-jamkové destičce a ponecháno přes noc v inkubátoru. Druhý den byly buňky spočítány (viz. 3.3.1.4 Počítání buněk, str. 23), část jich odebrána do plastové zkumavky a doplněna médiem tak, aby se získalo 600 000 buněk ve 4 ml média. Tato buněčná suspenze pak byla rozpipetována po  $80 \mu\text{l}$  do 3 x 9 jamek v 96-jamkové destičce, čímž se získala koncentrace 12 000 buněk v jedné jamce. Do třech jamek bylo napipetováno pouze  $100 \mu\text{l}$  média, a tím se získal slepý vzorek pro spektrofotometrické měření. Do první řady po obvodu celé destičky bylo napipetováno  $150 \mu\text{l}$  PBS (Lékárna FN Motol), aby nedocházelo k vysychání jamek se vzorky (obrázek 5, str. 26).

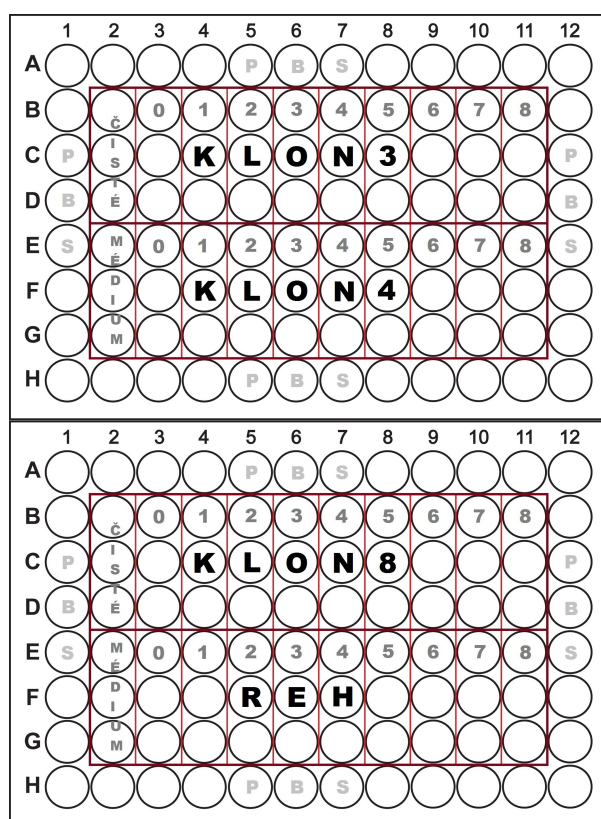
Dále bylo připraveno 9 roztoků L-asparaginasy (Asparaginase, Medac) o různých koncentracích. Do osmé plastové mikrozukavky bylo pipetováno  $490 \mu\text{l}$  média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) a  $10 \mu\text{l}$  roztoku L-asparaginasy o koncentraci  $1 \text{ IU}/\mu\text{l}$ . Vzniklý roztok měl tedy koncentraci  $20 \text{ IU}/\text{ml}$ . Další roztoky L asparaginasy byly do mikrozukavek č. 7 – 1 připraveny desítkovým ředěním (tabulka 2, str. 25). Mikrozukavka č. 0 obsahovala pouze čisté médium, tedy nulovou koncentraci L-asparaginasy.

Tabulka 2: Koncentrace roztoků L-asparaginasy a výsledná koncentrace v buněčné suspenzi

č.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
koncentrace roztoku (IU/ml)	0	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0,002	0,02	0,2	2	20
koncentrace v jamce (IU/ml)	0	$4 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0,004	0,04	0,4	4

Z každé mikrozukavky pak bylo pipetováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku L-asparaginasy do tří jamek buněčné suspenze, aby mohlo být měření provedeno v triplicátech. Nakonec byla

destička vložena do inkubátoru na dobu 72 hodin.



Obrázek 5: Schéma rozložení vzorků při MTS cytotoxickém testu pro všechny buněčné linie

Po třech dnech od přidání roztoků L-asparaginy k buněčným suspenzím byla destička vyjmuta z inkubátoru. Do každé jamky (kromě okrajových jamek s PBS) bylo přidáno 14  $\mu$ l MTS reagentie (CellTiter 96, Promega) a destička vložena zpět do inkubátoru.

Po třech hodinách inkubace byla destička opět vyjmuta z inkubátoru a na spektrofotometru (VersaMAX, Molecular Devices) změřena absorbance produktů v jamkách při 490 nm proti slepému vzorku.

### 3.3.4 Měření apoptosy

Měření apoptosy bylo provedeno na cytometru pomocí fluorescenčně značeného annexinu V a propidium jodidu. Annexin se váže na fosfatidyl serin, který je za normálních podmínek ukryt na vnitřní straně buněčné membrány. Pokud je však buňka v apoptotickém či nekrotickém procesu, stává se fosfatidyl serin pro annexin přístupný a buňka je označena. Naproti tomu propidium jodid se pevně váže k nukleovým kyselinám, označí tedy pouze populace v nekróze, protože přes membránovou bariéru živých a apop-

totických buněk se k nukleovým kyselinám nedostane. Při měření jsou tedy apoptotické buňky annexin-pozitivní, mrtvé buňky jsou značeny annexinem i propidium jodidem a živé buňky žádnou fluorescenci nevykazují.

Stanovení bylo provedeno u monoklonálních linií 3, 4, 8 získaných limitním ředěním (viz. 3.3.2 Příprava monoklonálních linií, str. 24) i u původní linie REH podle stejného postupu uvedeného níže.

Při pasážování buněk (viz. 3.3.1.3 Pasážování buněk, str. 23) bylo nasazeno třikrát  $3 \cdot 10^6$  buněk v 6 ml média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) do tří 6-jamkových destiček a ponecháno přes noc v inkubátoru. Jamka s buněčnou suspenzí v destičce č. 1 byla označena jako kontrola, v destičce č. 2 jako L-asp a bylo do ní druhý den přidáno 16  $\mu\text{l}$  L-asparaginasy (Asparaginase, Medac, 1 IU/ $\mu\text{l}$ ), a tak získána koncentrace 4 IU/ml. Jamka s buněčnou suspenzí v destičce č. 3, označená jako UV, byla druhý den osvětlena ultrafialovým zářením typu C z germicidní lampy (TUV T8, Philips) po dobu 30 s a vrácena zpět do inkubátoru. Po 24 hodinách od přidání L-asparaginasy či osvětlení UV zářením byla buněčná suspenze přepipetována do plastové šroubovací zkumavky a centrifugována (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) po dobu 5 minut při 169g a teplotě 25°C. Supernatant byl slit, peleta resuspendována v 5 ml sterilního PBS (Lékárna FN Motol) a opět centrifugována po dobu 5 minut při 169g (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) a teplotě 25°C. Supernatant byl slit, peleta resuspendována ve 400  $\mu\text{l}$  sterilního PBS a tato buněčná suspenze byla přepipetována do cytometrické zkumavky umístěné na ledu. Do zkumavky bylo dále přidáno 50  $\mu\text{l}$  10x ředěného annexinového pufru (Annexin V Binding buffer, EXBIO), 5  $\mu\text{l}$  annexinu (Annexin V Dyomics 647, EXBIO), 2  $\mu\text{l}$  propidium jodidu (MACS Miltenyi Biotec) a byla ponechána 30 minut na ledu ve tmě. Poté do ní bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  annexinového pufru a zkumavka byla centrifugována (Universal 320 R (rotor 1624), Hettich) po dobu 5 minut při 577g a teplotě 25 °C. Supernatant byl slit a peleta resuspendována ve 150  $\mu\text{l}$  annexinového pufru. Fluorescenční měření bylo provedeno na průtokovém cytometru (LSR II, BD) a získaná data vyhodnocena v programu FlowJo.

### 3.3.5 Stanovení hladiny laktátu

Tato metoda je založena na rozkladu laktátu pomocí laktát oxidasy na pyruvát a peroxid vodíku, v jehož přítomnosti křenuvát peroxidasa katalyzuje oxidativní kondenzaci chromogenních prekursorů, které poskytnou barevné zabarvení vzorku přímo úměrné koncentraci laktátu.

Stanovení bylo provedeno u monoklonálních linií 3, 4, 8 získaných limitním ředěním (viz. 3.3.2 Příprava monoklonálních linií, str. 24) i u původní linie REH podle stejného

postupu uvedeného níže.

Při pasážování buněk (viz. 3.3.1.3 Pasážování buněk, str. 23) bylo nasazeno dvakrát  $2 \cdot 10^6$  buněk do 4 ml média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) v 6-jamkové destičce a ponecháno přes noc v inkubátoru. Jedna jamka byla označena jako kontrola a druhá jako L-asp, do níž bylo druhý den přidáno  $16 \mu\text{l}$  L-asparaginy (Asparaginase, Medac,  $1 \text{ IU}/\mu\text{l}$ ), a tak získána koncentrace  $4 \text{ IU}/\text{ml}$ . Další den, po 24 hodinové inkubaci s L-asparaginasou, byly buněčné suspenze ze všech jamek přepipetovány do plastových šroubovacích zkumavek a centrifugovány (Universal 32 R (rotor 1619), Hettich) po dobu 5 minut při 243g a teplotě  $8^\circ\text{C}$ .

### 3.3.5.1 Laktát

Po centrifugaci (viz. 3.3.5 Stanovení hladiny laktátu, str. 27) bylo odebráno z jedné zkumavky  $10 \mu\text{l}$  supernatantu, smícháno s 1 ml reakčního roztoku pro stanovení laktátu (Lactate Kit, Trinity Biotech) a po 10 minutové inkubaci rozpipetováno po  $100 \mu\text{l}$  do 9 jamek v 96-jamkové destičce. Stejný postup byl proveden se všemi buněčnými suspenzemi a standardními roztoky laktátu (Lactate Kit, Trinity Biotech) o koncentraci 20, 80 a  $120 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ , které byly zapotřebí ke konstrukci kalibrační přímky. Jako slepý vzorek pro spektrofotometrické měření sloužil roztok vzniklý smícháním  $10 \mu\text{l}$  čistého média (viz. 3.3.1.1 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 22) s 1 ml reakčního roztoku. U všech vzorků byla na spektrofotometru (VersaMAX, Molecular Devices) změřena absorbance při 540 nm proti slepému vzorku.

### 3.3.5.2 Celkové množství proteinu

Toto stanovení bylo provedeno podle modifikovaného principu Lowryho metody. Ta spočívá v reakci proteinů s mědí v alkalickém prostředí (roztok A – Alkaline Copper Tartare Solution, DC Protein Assay Kit II, Bio-Rad). Upravené proteiny následně redukují přidané činidlo (roztok B – Folin Reagent, DC Protein Assay Kit II, Bio-Rad) a vzniká modré zabarvení roztoku, které se měří spektrofotometricky při 750 nm. Na redukcii mají podíl zejména aminokyseliny tyrosin a tryptofan.

Po odebrání vzorku pro stanovení laktátu (viz. 3.3.5.1 Laktát, str. 28) byl supernatant odstraněn a buněčné pelety resuspendovány v  $80 \mu\text{l}$  upraveného lyzačního RIPA pufru následujícího složení:

- lyzační pufr – 72 % (v/v)
  - 1 % (v/v) Triton X-100 (Merck)
  - 0,1 % (v/v) SDS (Sigma-Aldrich)

- 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- 150 mM NaCl (Penta)
- 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Serva)
- NaF – 5 % (v/v) (Sigma-Aldrich)
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – 0,05 % (v/v) (Sigma-Aldrich)
- mix inhibitorů proteas – 14,45 % (v/v) (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)
- PMSF – 0,5 % (v/v) (Roche)
- MgCl<sub>2</sub> – 8 % (v/v) (Roche).

Po 30 minutové inkubaci s RIPA pufrem za občasného promíchání na vírníku (Vortex 3, IKA) byly buněčné suspenze centrifugovány (Universal 32 R (rotor 1653), Hettich) po dobu 3 minut při 9496g a teplotě 8°C. Supernatant byl přepipetován do mikrozkušavek na ledu a buněčná peleta byla vyhozena.

Nejprve byl připraven roztok A' smísením 1200  $\mu$ l roztoku A a 25  $\mu$ l roztoku S ze sady pro stanovení proteinu (DC Protein Assay Kit II, Bio-Rad). Do 32 pozic 96-jamkové destičky bylo pipetováno 200  $\mu$ l roztoku B ze sady pro stanovení proteinu (DC Protein Assay Kit II, Bio-Rad) a 25  $\mu$ l roztoku A'. Vzorok s proteiny a standardní roztoky proteinu (DC Protein Assay Kit II, Bio-Rad) byly do destičky přidány po 5  $\mu$ l v duplikátech. Jako standardy pro sestavení kalibrační křivky posloužily roztoky BSA o koncentracích 0,125, 0,250, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 a 2,80  $\mu$ g.  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Slepým vzorkem byl standard BSA o koncentraci 0  $\mu$ g.  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Obsah jamek byl důkladně promíchán a po 15 minutách inkubace byla na spektrofotometru (VersaMAX, Molecular Devices) změřena absorbance vzorků i standardů proti slepému vzorku při 750 nm.



# 4. Výsledky

## 4.1 Příprava monoklonálních buněčných linií

Pro studium vlivu delece del(5)(q34) bylo potřebné získat monoklonální buněčné linie pozitivní nebo negativní na tuto delecii. Pro jejich získání bylo využito limitního ředění (viz. 3.3.2 Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 24). Vzorky deseti klonů, získaných z buněčné linie REH, byly zaslány Doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. do Centra nádorové cytogenetiky v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze), kde bylo metodou FISH (fluorescenční in situ hybridizace) stanoveno zastoupení buněk pozitivních a negativních na delecii del(5)(q34) (tabulka 3, str. 31).

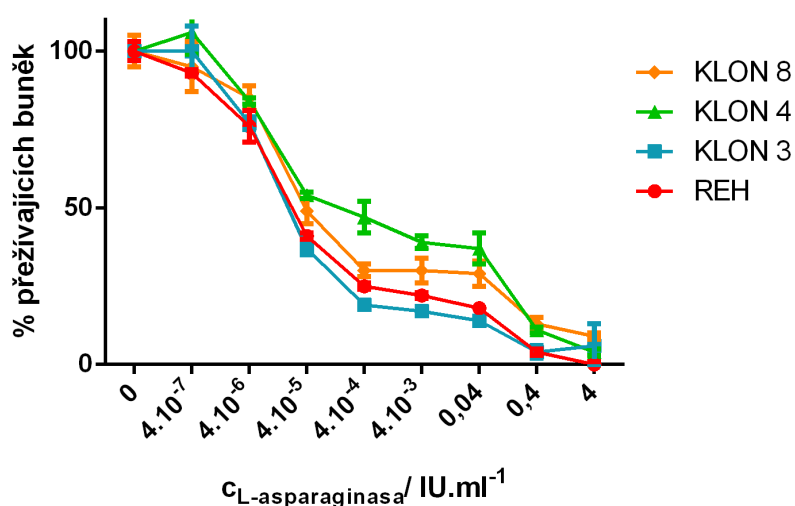
Tabulka 3: Zastoupení delece del(5)(q34) u buněčných linií získaných limitním ředěním

linie	počet buněk bez delece	%	počet buněk s del(5)(q34)	%
1	249	69,2	111	30,8
2	446	92,9	34	7,1
3	11	1,1	989	98,9
4	980	98,0	20	2,0
5	147	14,7	853	85,3
6	478	47,8	522	52,2
7	837	83,7	163	16,3
8	973	97,3	27	2,7
9	396	99,2	3	0,8
10	290	99,3	2	0,7

Pro další výzkum vlivu delece na rezistenci vůči L-asparaginase byly vybrány linie 3, 4 a 8. U těchto vzorků byl vyšetřen největší počet buněk a nalezeno nejvýraznější zastoupení jednoho druhu (tabulka 3, str.31 ). Linie 3 tedy dále sloužila jako linie pozitivní na delecii del(5)(q34). Linie 4 a 8 byly modelovými liniemi s buňkami bez delece. U všech experimentů byla také používána původní linie REH, která obsahuje buňky pozitivní i negativní na delecii.

## 4.2 Cytotoxický test s použitím MTS

Prvním experimentem k prokázání vlivu delece del(5)(q34) na citlivost buněk vůči L-asparaginase byl cytotoxický test s použitím MTS reagencie (viz. 3.3.3 Cytotoxický test s použitím MTS, str. 24). Tento test je založen na redukci MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4 sulfofenyl)-2H-tetrazolium) na formazan, která probíhá v živých buňkách pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Množství vzniklého barevného produktu se nakonec vyhodnotí spektrofotometricky při 490 nm. Měření bylo provedeno v triplikátech a výsledné hodnoty jsou jejich průměrem. Buněčné linie byly 72 hodin inkubovány s různými koncentracemi L-asparaginasy. Jako kontrola sloužily buňky bez přidání L asparaginasy, vůči kterým bylo stanovení porovnáváno, a tak se získalo procentuální zastoupení přežívajících buněk (obrázek 6, str. 32).



Obrázek 6: Procentuální zastoupení přežívajících buněk po inkubaci s L-asparaginasou při cytotoxickém testu s použitím MTS

Jednotlivé buněčné linie (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31) byly inkubovány s L-asparaginasou o různých koncentracích, jejichž hodnoty jsou vyneseny na ose x. Procentuální zastoupení přežívajících buněk na ose y bylo získáno porovnáním s kontrolními buňkami, které nebyly účinkům L-asparaginasy vystaveny.

Ze získaných dat (obrázek 6, str. 32) je jasně vidět, že jednotlivé klony se v citlivosti na L-asparaginasu liší. Bylo provedeno statistické porovnání neparametrickým testem Mann-Whitney v programu Statview, pro něž byly použity hodnoty přežívajících buněk při koncentracích L-asparaginasy  $4 \cdot 10^{-6}$  – 0,4 IU/ml. Klon 3 s delecí del(5)(q34) je nejcitlivější a přežívá u něj menší procento buněk než u ostatních buněčných linií. Tento rozdíl je signifikantní vůči klonu 4 ( $p = 0,02$ ) i vůči klonu 8 ( $p = 0,08$ ), ne však vůči původní linii REH. Procenta přežívajících buněk linie REH, která je



složená z obou typů buněk, se nalézají mezi liniemi s delecí a bez ní. Tyto výsledky naznačují, že delece del(5)(q34) má pravděpodobně opravdu souvislost s citlivostí leukemických buněk na L-asparaginasu.

Experiment byl několikrát zopakován pro ověření správnosti výsledků. Získaná data byla vždy téměř identická a vedla ke stejným závěrům.

### 4.3 Měření apoptosy

Cytometrická měření apoptosy byla provedena k ověření výsledků získaných cytotoxickým testem s použitím MTS (viz. 4.2 Cytotoxický test s použitím MTS, str. 32). Dále bylo zkoumáno, zda delece del(5)(q34) neovlivňuje všeobecnou náchylnost k iniciaci apoptosy.

Fluorescenční měření buněk značených annexinem V a propidium jodidem bylo provedeno na průtokovém cytometru. V experimentu byly použity buňky kontrolní, inkubované s L-asparaginasou (4 IU/ml) po dobu 24 hodin a buňky vystavené účinkům záření UV-C po dobu 30 s (viz. 3.3.4 Měření apoptosy, str. 26 ). Získaná data byla vyhodnocena v programu FlowJo.

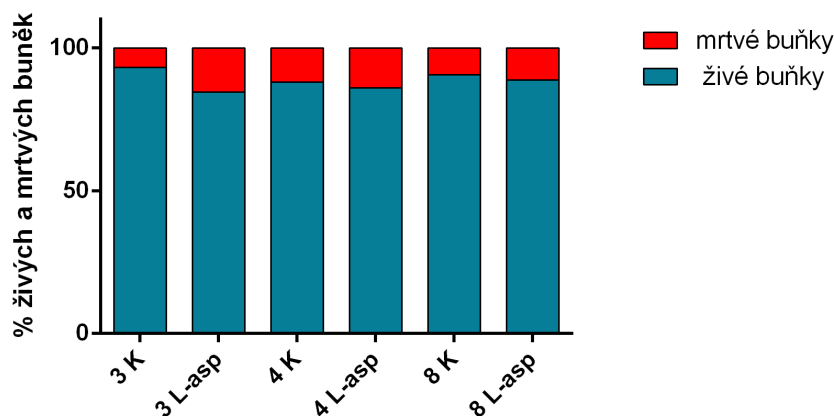
Apoptotický test (obrázek 7, tabulka 4, str. 34) buněk inkubovaných s L-asparaginasou potvrzuje výsledky získané cytotoxickým testem s použitím MTS (viz. 4.2 Cytotoxický test s použitím MTS, str. 32). Klon 3 je na účinky L-asparaginasy nejcitlivější a apoptosa je navozena u největšího počtu buněk při porovnání s kontrolou. U klonů 4 a 8 je menší procentuální změna v zastoupení mrtvých buněk.

Tabulka 4: Procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk po inkubaci s L-asparaginasou

Buňky jednotlivých buněčných linií (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31) byly inkubovány 24 hodin s L-asparaginasou o koncentraci 4 IU/ml a poté bylo stanoveno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk pomocí průtokového cytometru.

K – kontrolní buňky, L-asp – buňky inkubované s L-asparaginasou

vzorek		% živých buněk	% mrtvých buněk	pokles v zastoupení živých buněk / %
3	K	93,2	6,8	8,6
	L-asp	84,6	15,4	8,6
4	K	88,0	12,0	2,0
	L-asp	86,0	14,0	2,0
8	K	90,5	9,5	1,7
	L-asp	88,8	11,2	1,7



Obrázek 7: Zastoupení živých a mrtvých buněk u buněčných linií po inkubaci s L-asparaginasou

Buňky jednotlivých buněčných linií (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 32) byly inkubovány 24 hodin s L-asparaginasou o koncentraci 4 IU/ml a poté bylo stanoveno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk pomocí průtokového cytometru.

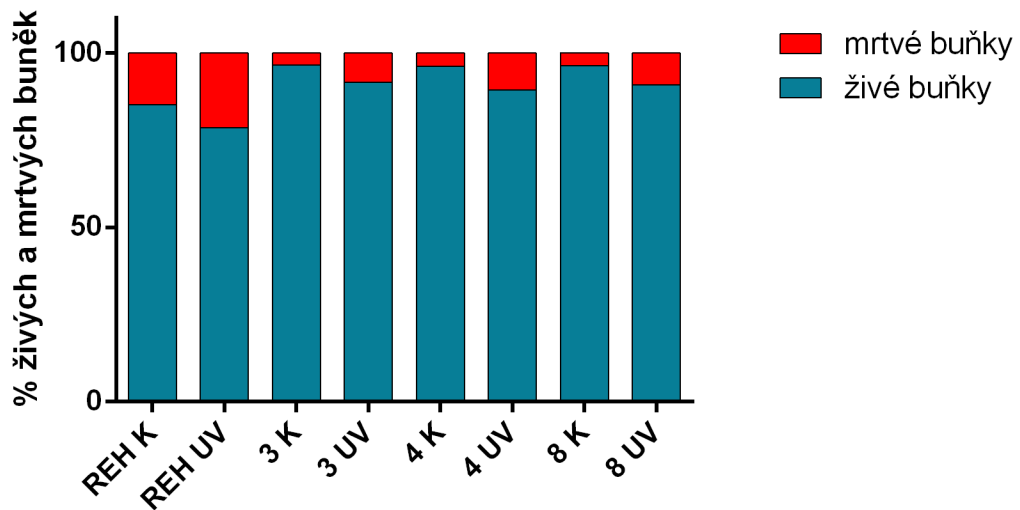
K – kontrolní buňky, L-asp – buňky inkubované s L-asparaginasou

Procentuální zastoupení mrtvých buněk (obrázek 8, tabulka 5, str. 35) po ozáření UV-C paprsky je při porovnání s kontrolou u všech buněčných linií přibližně stejné. Rozdíly jsou pouze velmi malé, pod hranicí statistické významnosti. Delece del(5)(q34) tedy zřejmě neovlivňuje všeobecnou citlivost buněk k navození apoptosy.

Tabulka 5: Procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk po ozáření paprsky UV-C  
Buňky jednotlivých buněčných linií (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31) byly ozářeny paprsky UV-C po dobu 30 s a poté bylo stanoveno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk pomocí průtokového cytometru.

K – kontrolní buňky, UV – buňky ozářené paprsky UV-C

vzorek		% živých buněk	% mrtvých buněk	pokles v zastoupení živých buněk / %
3	K	96,5	3,5	4,9
	UV	91,6	8,4	4,9
4	K	96,2	3,8	6,9
	UV	89,3	10,7	6,9
8	K	96,4	3,6	5,5
	UV	90,9	9,1	5,5
REH	K	85,2	14,8	6,6
	UV	78,6	21,4	6,6



Obrázek 8: Zastoupení živých a mrtvých buněk u buněčných linií po ozáření paprsky UV-C

Buňky jednotlivých buněčných linií (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31) byly ozářeny paprsky UV-C po dobu 30 s a poté bylo stanoveno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk pomocí průtokového cytometru.

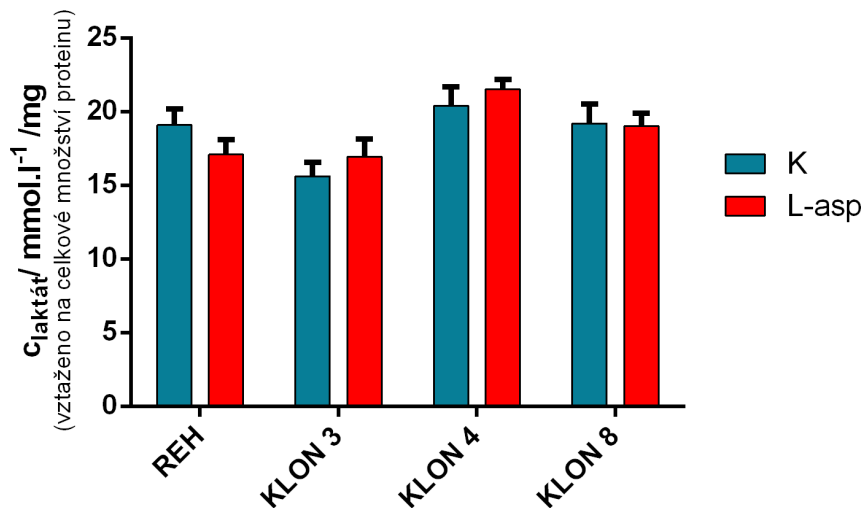
K – kontrolní buňky, UV – buňky ozářené paprsky UV-C

## 4.4 Stanovení hladiny laktátu

Laktát je jedním z produktů při získávání energie pomocí glykolýzy. Dosud nepublikované výzkumy naznačují, že L-asparaginasu by mohla působit jako inhibitor glykolýzy. Stanovení extracelulárního laktátu je jedním ze způsobů, jak sledovat glykolýzu v buňkách.

Buněčné linie byly 24 hodin inkubovány v médiu s L-asparaginasou o koncentraci 4 IU/ml, poté centrifugovány a supernatant použit pro spektrofotometrické stanovení laktátu při 540 nm (viz. 3.3.5.1 Laktát, str. 28). K určení koncentrace laktátu byla využita metoda kalibrační přímky, vytvořené použitím standardů o známé koncentraci. Buněčná peleta, získaná centrifugací, byla použita ke spektrofotometrickému stanovení celkového množství proteinu ve vzorku při 750 nm (viz. 3.3.5.2 Celkové množství proteinu, str. 28) a vyhodnocení získaných hodnot bylo opět provedeno metodou kalibrační přímky. Nakonec byla koncentrace laktátu vztažena na celkové množství proteinu, aby mezi sebou byla získaná data porovnatelná. Pro jeden vzorek byla koncentrace laktátu změřena devětkrát a celkové množství proteinu dvakrát. Výsledná hodnota je průměrem získaným všemi možnými kombinacemi naměřených hodnot při výpočtu.

Výsledky získané tímto experimentem (obrázek 9, str. 36) jsou poněkud nejednoznačné. U kontrolních buněk jsou vidět rozdíly v množství laktátu mezi jednotlivými



Obrázek 9: Množství extracelulárního laktátu vztažené na celkové množství proteinu ve vzorku

Buňky jednotlivých buněčných linií (viz. 4.1. Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31) byly inkubovány 24 hodin s L-asparaginasou o koncentraci 4 IU/ml a poté bylo stanoveno množství extracelulárního laktátu vztažené na celkové množství proteinu.

K – kontrolní buňky, L-asp – buňky inkubované s L-asparaginasou

mi klony, které by odpovídalo přítomnosti či nepřítomnosti delece a původní linie REH se nachází mezi nimi. Tato závislost zůstává stejná i u buněk inkubovaných s L-asparaginasou. Hodnoty basální hladiny laktátu klonu 3 se významně liší od všech ostatních klonů i linie REH ( $p < 0,0001$ ). Toto statistické porovnání bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney v programu Statview. Ovšem při porovnání kontrolních buněk a těch, které byly inkubovány s L asparaginasou u stejného klonu však dochází k rozdílným změnám. Někde množství laktátu stoupá, jinde klesá. Tento fakt komplikuje interpretaci získaných dat.

## 5. Diskuze

Rezistence vůči L-asparaginase je velkým problémem při terapii dětských pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukemií. Léčba této choroby je v současné době velmi úspěšná, avšak relaps onemocnění stále ještě postihuje 15 – 20 % dětí [20]. Jednou z možných příčin relapsu je právě rezistence vůči L-asparaginase. Tento enzym je chemoterapeutikem používaným při léčbě [34]. Mechanismy vzniku rezistence, ale ani přesné působení L asparaginasy se všemi jeho důsledky zatím není zcela objasněno.

V předkládané bakalářské práci byl sledován vliv delece del(5)(q34) na citlivost leukemických buněk vůči L-asparaginase. Tento úsek DNA, který u rezistentních buněk není deletován, neobsahuje žádné kódující oblasti. Jeho funkce není známa, ale pravděpodobně se v něm budou nacházet určité regulační oblasti. Z dosud nepublikovaného výzkumu však vyplývá, že by právě tato delece mohla ovlivňovat citlivost buněk vůči L-asparaginase [59]. Ke sledování zmíněné závislosti byla použita buněčná linie REH a monoklonální linie 3,4 a 8 získané jejím limitním ředěním (viz. 4.1 Příprava monoklonálních buněčných linií, str. 31). Linie 3 byla na delecí del(5)(q34) pozitivní a očekávala se její větší citlivost k L-asparaginase. Klony 4 a 8 byly bez této delece, tudíž u nich byla předpokládána rezistence vůči L-asparaginase.

Prvním experimentem k ověření výše zmíněné hypotézy byl cytotoxický test s použitím MTS reagentie. Spektrofotometricky získaná data (viz. 4.2 Cytotoxický test s použitím MTS, str. 32) ukazují, že klon 3 je opravdu nejcitlivější na účinky L-asparaginasy, zatímco klony 4 a 8 vykazují větší rezistenci. Data původní linie REH se nachází mezi výsledky linií 3 a 8, což odpovídá tomu, že je složená z buněk pozitivních i negativních na zkoumanou delecí. Nejlépe patrné rozdíly v odpovědi na L-asparaginasu jsou při inkubaci s tímto enzymem o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  – 0,04 IU/ml.

Fluorescenční měření apoptosy bylo provedeno na průtokovém cytometru a data vyhodnocena v programu FlowJo. První test zahrnoval porovnání buněk inkubovaných s L-asparaginasou vůči kontrolním buňkám. Výsledky tohoto experimentu (viz. 4.3 Měření apoptosy, str. 33) dopadly dle očekávání a potvrdily data získaná cytotoxickým testem s použitím MTS (viz. 4.2 Cytotoxický test s použitím MTS, str. 32). Klon 3 vykazoval větší náchylnost k apoptose, zatímco klony 4 a 8 byly rezistentnější. Při druhém měření byla snaha o zjištění, zda zkoumaná delece nemá vliv na indukci apoptosy všeobecně. Jako nesespecifický impuls pro spuštění buněčné smrti bylo vybráno ultrafialové záření. Porovnávány byly buňky vystavené UV-C záření s buňkami kontrolními. Průkazné rozdíly mezi jednotlivými klony z dat získaných tímto měřením (viz. 4.3 Měření apoptosy, str. 33) nejsou patrné. Přítomnost delece del(5)(q34) tedy zřejmě

nemá vliv na všeobecnou náchylnost buněk ke spouštění apoptosy.

Dalším testem pro zjištění odlišností mezi klony bylo spektrofometrické stanovení extracelulárního laktátu. Měření bylo prováděno u kontrolních buněk a buněk inkubovaných s L-asparaginasou. Zjištěná koncentrace laktátu byla vztažena na celkové množství proteinu ve vzorku. Z dosud nepublikovaných dat byla vyvozena teorie, že cytotoxický efekt L-asparaginasy by mohl spočívat v inhibici glykolýzy leukemických buněk [59]. Laktát je jedním z produktů při tomto procesu, a tak jeho stanovení pomáhá sledovat aktivitu glykolýzy. Výsledky získané v této bakalářské práci (viz. 4.4 Stanovení hladiny laktátu, str. 35) ukazují, že jednotlivé klony se basální produkcí laktátu mezi sebou liší. Klon 3, který je na deleci pozitivní, má signifikantně nižší koncentraci laktátu než klony 4 a 8. Hodnoty původní linie REH se opět nacházejí uprostřed. Tato závislost naznačuje, že delece  $\text{del}(5)(q34)$  by mohla ovlivňovat mechanismy spojené s aktivitou glykolýzy v buňkách. Klon 3 by pak byl citlivější k účinkům L-asparaginasy právě proto, že glykolýza u něj neprobíhá v takovém měřítku jako u buněk bez delece. Ovšem při sledování účinku L-asparaginasy na produkci laktátu u jednotlivých klonů získané výsledky hypotézu nepotvrzují. U některých linií dochází k poklesu hladiny laktátu, u jiných k jejímu zvýšení, ikdyž tyto rozdíly nejsou příliš výrazné. Pro objasnění tohoto faktu a přesného mechanismu působení L-asparaginasy na proces glykolýzy bude třeba dalšího výzkumu.

## 6. Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývala vlivem delece  $del(5)(q34)$  na citlivost leukemických buněk vůči L-asparaginase.

Tato závislost byla studována na buněčné linii REH a klonech, pozitivních či negativních na delecii, odvozených z původní linie.

Výsledky bakalářské práce ilustrují, že přítomnost této delece ovlivňuje odpověď maligních buněk na terapii L-asparaginasou. Buňky s delecí  $del(5)(q34)$  vykazují větší citlivost na L-asparaginasu, zatímco buňky bez ní jsou rezistentnější. Přesný mechanismus tohoto působení zatím není znám a je příležitostí pro další výzkum.

Získané poznatky připívají ke snahám o objasnění vzniku rezistence na L-asparaginasu. Prozkoumání tohoto procesu je velmi důležité, neboť je jednou z příčin relapsů onemocnění u dětí postižených akutní lymfoblastickou leukemií.





# Seznam použité literatury

- [1] ENVER T., GREAVES M. : *Loops, lineage and leukemia*. Cell 1998; 94(1): 9-12.
- [2] PUI C.H., EVANS W.E. : *Acute lymphoblastic leukemia*. The New England Journal of Medicine 1998; 339(9): 605-615.
- [3] WEB : <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/Hematopoeza.png> (17. 5. 2013).
- [4] WIEMELS J. : *Perspectives on the causes of childhood leukemia*. Chemico-Biological Interactions 2012; 196(3): 59-67.
- [5] CHANG J.S. : *Parental smoking and childhood leukemia*. Methods In Molecular Biology 2009; 472: 103-137.
- [6] CHANG J.S., WIEMELS J.L., BUFFLER P.A. : *Allergies and childhood leukemia*. Blood Cells, Molecules and Diseases 2009; 42(2): 99-104.
- [7] WIEMELS J.L., CAZZANIGA G., DANIOTTI M., EDEN O.B., ADDISON G.M., MASERA G., SAHA V., BIONDI A., GREAVES M.F. : *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. Lancet 1999; 354(9189): 1499-1503.
- [8] BAGG A., KALLAKURY B.V.S. : *Molecular pathology of leukemia and lymphoma*. American Journal of Clinical Pathology 1999; 112(1): 76-92.
- [9] MELNICK A., LICHT J.D. : *Deconstructing a disease: RAR, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia*. Blood 1999; 93(10): 3167-3224.
- [10] GREAVES M. : *Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia*. European Journal of Cancer 1999; 35(2): 173-185
- [11] MELO J.V. : *The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype*. Blood 1996; 88(7): 2375-2384.
- [12] RUBNITZ J.E., PUI C.H. : *Molecular diagnostics in the treatment of leukemia*. Current Opinion in Hematology 1999; 6(4): 229-235.
- [13] BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.T., FLANDRIN G., GALTON D.A., GRALNICK H.R., SULTAN C. : *Proposals for the classification of acute leukaemias*. French-American-British (FAB) co-operative group. British Journal of Haematology 1976; 33(4): 451-458.

- [14] SWERDLOW S.H., CAMPO E., HARRIS N.L., JAFFE E.S., PILERI S.A., STEIN H., THIELE J., VARDIMAN J.W. : *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th Ed)*. IARC Press, Lyon 2008.
- [15] PAPAŽÍK T., RAIDA L., INDRÁK K. : *REAL/WHO klasifikace nádorů lymfatické tkáně: 10 let fungování společného jazyka z pohledu klinické praxe*. Vnitřní lékařství 2005; 51(6):690-698.
- [16] KERSEY J.H. : *Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia*. Blood 1997; 90(11): 4243-4251.
- [17] PUI C.H., CAMPANA D. : *New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia 2000; 14(5): 783-785.
- [18] LIU YIN J.A., TOBAL K. : *Detection of minimal residue disease in acute myeloid leukaemia: methodologies, clinical and biological significance*. British Journal of Haematology 1999; 106(3): 578-590.
- [19] COUSTAN-SMITH E., SANCHO J., HANCOCK M.L., BOYETT J.M., BEHM F.G., RAIMONDI S.C., SANDLUND J.T., RIVERA G.K., RUBNITZ J.E., RIBEIRO R.C., PUI C.H., CAMPANA D. : *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2000; 96(8): 2691-2696.
- [20] PUI C.H., EVANS W.E. : *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. The New England Journal of Medicine 2006; 354: 166-178.
- [21] BRENNER M.K., PINKEL D. : *Cure of leukemia*. Seminars in Hematology 1999; 36(7): 73-83.
- [22] CHESSELLS J.M. : *Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge*. British Journal of Haematology 1998; 102(2): 423-438
- [23] BARRET J., HOROWITZ M.M., POLLOCK B.H., ZHANG M.J., BORTIN M.M., BUCHANAN G.R., CAMITTA B.M., OCHS J., GRAHAM-POLE J., ROWLINGS P.A. : *Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission*. The New England Journal of Medicine 1994, 331(19): 1253-1258.
- [24] TRKA J., ŠRÁMKOVÁ L. : *Akutní lymfoblastická leukemie v dětském věku*. Postgraduální medicína 2004; 6(5): 496-500.

- [25] PUI C.H. : *Acute lymphoblastic leukemia in children*. Current Opinion In Oncology 2000; 12(1): 3-12.
- [26] HAN X., BUESO-RAMOS C.E. : *Advances in the pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia*. Annals of Diagnostic Pathology 2005; 9(4): 239-57.
- [27] ZUNA J., HRUŠÁK O., KALINOVÁ M., MUŽÍKOVÁ K., STARÝ J., TRKA J. : *TEL/AML1 positivity in childhood ALL: better or average prognosis?*. Leukemia 1999; 13: 22-24.
- [28] ARICÓ M., VALSECCHI M.G., CARNITTA B., SCHRAPPE M., CHESSELLS J., BARUCHEL A., GAYNON P., SILVERMAN L., JANKA-SCHAUB G., KAMPS W., PUI C.H., MASERA G. : *Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. The New England Journal Of Medicine 2000; 342(14): 998-1006.
- [29] DORDELMANN M., REITER A., BORKHARDT A., LUDWIG W.D., GOTZ N., VIEHMANN S., GADNER H., RIEHM H., SCHRAPPE M. : *Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in interfant acute lymphoblastic leukemia*. Blood 1999; 94(4): 1209-1217.
- [30] PINKEL D : *A study of „total therapy“ of acute lymphocytic leukemia in children*. The Journal of Pediatrics 1968; 72(3): 399-408.
- [31] PINKEL D. : *Lessons from 20 years of curative therapy of childhood acute leukaemia*. British Journal of Cancer 1992; 65(2): 148-153.
- [32] PINKEL D. : *Therapy of acute lymphoid leukemia in children*. Leukemia 1992; 6(2): 127-131.
- [33] WEB : [http://www.bfm-international.org/aieop/informationen/informationen\\_medizinisch\\_studienkonzept.html](http://www.bfm-international.org/aieop/informationen/informationen_medizinisch_studienkonzept.html). (17. 5. 2013)
- [34] AMYLN M.D., SHUSTER J., PULLEN J., BERARD C., LINK M.P., WHARAM M., KATZ J., YU A., LAVER J., RAVINDRANATH Y., KURTZBERG J., DESAI S., CAMITTA B., MURPHY S.B. : *Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study*. Leukemia 1999; 13(3): 335-342.

- [35] PINKEL D. : *Intravenous mercaptopurine: life begins at 40*. Journal of Clinical Oncology 1993; 11(9): 1826-1831
- [36] WALL A.M., GAJJAR A., LINK A., MAHMOUD H., PUI C.H., RELLING M.V. : *Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia 2000; 14(2): 221-225.
- [37] OKADA M., ADACHI S., IMAI T., WATANABE K., TOYOKUNI S., UENO M., ZERVOS A.S., KROEMER G., NAKAHAKA T. : *A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR ABL positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity*. Blood 2004; 103(6): 2299-2307.
- [38] AGHAIYPOUR K., WLODAWER A., LUBKOWSKI J. : *Structural basis for the activity and substrate specificity of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase*. Biochemistry 2001; 40(19): 5655-5664.
- [39] RAMYA L.N., DOBLE M., REKHA V.P., PULICHERLA K.K. : *L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia*. Applied Biochemistry and Biotechnology 2012; 167(8): 2144-2159.
- [40] SHRISTAVA A., KHAN A.A., JAIN S.K., SINGHAL P.K., JAIN S., MARROTA F., YADAV H. : *Biotechnological advancement in isolation of anti-neoplastic compounds from natural origin: a novel source of L-asparaginase*. Acta Bio Medica Atenei Parmensis 2010; 81(2): 104-108.
- [41] KIDD J.G. : *Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum*. The Journal of Experimental Medicine 1953; 98: 565-606.
- [42] BROOME J.D : *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects*. The Journal of Experimental Medicine 1963; 118(1): 99-148.
- [43] ZALEWSKA-SZEWCZYK B., GACH A., WYKA K., BODALSKI J., MLYNARSKI W. : *The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations*. Clinical and Experimental Medicine 2009; 9(2): 113-116.
- [44] TALLAL L., TAN C., OETTGEN H. WOLLNER N., MCCARTHY M., HELSON L., BURCHENAL J., KARNOFSKY D., MURPHY M.L. : *E. coli L-asparaginase in*

- the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children.* Cancer 1970; 25(2): 306-320.
- [45] CORTES J.E., KANTARJIAN H.M. : *Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy.* Cancer 1995; 76(12): 2393-2417.
- [46] PIETERS R., KLUMPER E., KASPERS G.J., VEERMAN A.J. : *Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Critical Reviews in Oncology/Hematology. 1997; 25(1): 11-26.
- [47] BALASUBRAMANIAN M.N., BUTTERWORTH E.A., KILBERG M.S. : *Asparagine synthetase: Regulation by cell stress and involvement in tumor biology.* American Journal of Physiology 2013; 304(4): 789-799.
- [48] CHEN H., PAN Y.X., DUDENHAUSEN E.E., KILBERG M.S. : *Amino acid deprivation increases the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation.* Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(49): 50829-50839.
- [49] RICHARDS N.G., SCHUSTER S.M. : *Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis.* Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 1998; 72: 145-198.
- [50] ASSELIN B.L., RYAN D., FRANTZ C.N., BERNAL S.D., LEAVITT P., SALLAN S.E., COHEN H.J. : *In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase.* Cancer Research 1989; 49(15): 4363-4368.
- [51] HASKELL C.M., CANELLOS G.P. : *L-asparaginase resistance in human leukemia-asparagine synthetase.* Biochemical Pharmacology 1969; 18(10): 2578-2580.
- [52] ASLANIAN A.M., FLETCHER B.S., KILBERG M.S. : *Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells.* Biochemical Journal 2001; 357(1): 321-328.
- [53] DEN BOER M.L., PIETERS R., KAZEMIER K.M., ROTTIER M.A., ZWAAN C.M., KASPERS G.J.L., JANKA-SCHAUB G., HENZE G., CREUTZIG U., SCHEPER R.J., VEERMAN A.J.P. : *Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia.* Blood 1998; 91(6): 2092-2098.

- [54] KREJČÍ O., STARKOVÁ J., OTOVÁ B., MADZO J., KALINOVÁ M., HRUŠÁK O., TRKA J : *Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells*. Leukemia 2004; 18(3): 434-441.
- [55] STAMS W.A.G, DEN BOER M.L., BEVERLOO H.B., MEIJERINK J.P.P., STIGTER R.L.L., VAN WERING E.R., JANKA-SCHAUB G.E., SLATER R., PIETERS R. : *Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL*. Blood 2003; 101(7): 2743-2747.
- [56] HEŘMANOVÁ I., ŽALIOVÁ M., TRKA J., STARKOVÁ J. : *Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase*. Experimental Hematology 2012; 40(8): 657-665.
- [57] IWAMOTO S., MIHARA K., DOWNING J.R., PUI C.H., CAMPANA D. : *Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase*. Journal of Clinical Investigation. 2007; 117(4): 1049-1057.
- [58] TONG W.H., PIETERS R., HOP W.C.J., LANVERS-KAMINSKY C., BOOS J., VAN DER SLUIS I.M. : *No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy*. Pediatric Blood & Cancer 2013; 60(2): 258-61.
- [59] STARKOVÁ J., HEŘMANOVÁ I.  
osobní sdělení (dosud nepublikováno)
- [60] BARGER J.F., PLAS D.R. : *Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis* Endocrine-Related Cancer 2010; 17(4): 287-304.
- [61] DEBERARDINIS R.J., LUM J.J., HATZIVASSILIOU G., THOMPSON C.B. : *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metabolism 2008; 7(1): 11-20.
- [62] GAO P., TCHERNYSHYOV I., CHANG T.C., LEE Y.S., KITA K., OCHI T., ZELLER K.I., DE MARZO A.M., VAN EYK J.E., MENDELL J.T., DANG C.V. : *c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism*. Nature 2009; 458(7239): 762-765.
- [63] WISE D.R., THOMPSON C.B. : *Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer*. Trends in Biochemical Sciences 2010; 35(8): 427-433.

- [64] IBOSHI Y., PAPST P.J., HUNGER S.P., TERADA N. : *L-Asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 260(2): 534-539.
- [65] LEVINE B., KLIONSKY D.J. : *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Developmental Cell. 2004; 6(4): 463-477.
- [66] YU M., HENNING R., WALKER A., KIM G., PERROY A., ALESSANDRO R., VIRADOR V., KOHN E.C. : *L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2012; 16(10): 2369-2378.
- [67] RACKER E. : *Bioenergetics and the problem of tumor growth*. American Scientist. 1972; 60(1): 56-63.
- [68] WARBURG O. : *On respiratory impairment in cancer cells*. Science 1956; 124(3215): 269-270.
- [69] WARBURG O. : *On the origin of cancer cells*. Science 1956; 123(3191): 309-314.
- [70] KAELIN W.G., THOMPSON C.B. : *Cancer: clues from cell metabolism*. Nature 2010; 465(7298): 562-564.
- [71] SUGANUMA K., MIWA H., IMAI N., SHIKAMI M., GOTOU M., GOTO M., MIZUNO S., TAKAHASHI M., YAMAMOTO H., HIRAMATSU A., WAKABAYASHI M., WATARAI M., HANAMURA I., IMAMURA A., MIHARA H., NITTA M. : *Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation*. Leukemia & Lymphoma 2010; 51(11): 2112-2119.
- [72] HOLLEMAN A., CHEOK M.H., DEN BOER M.L., YANG W., VEERMAN A.J.P., KAZEMIER K.M., PEI D., CHENG C.H., PUI C.H., RELLING M. : *Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment*. The New English Journal of Medicine. 2004; 351(6): 533-542.
- [73] WANG L., HIEBERT S.W. : *TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3*. Oncogene. 2001; 20(28): 3716-3725.
- [74] ROSENFELD C., GOUTNER A., VENUAT A.M., CHOQUET C., PICO J.L., DORE J.F., LIABEU F., DURANDY A., DESGRANGE C., DE THE G. : *An effective human leukaemic cell line: Reh1*. European Journal of Cancer 1965; 13(4): 377-379.

