

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Markéta Šimčíková

Studium metabolismu leukemických buněk ve vztahu k citlivosti na terapii

Study of leukemic cells' metabolism in association with
response to the therapy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala Mgr. Júlii Starkové, Ph.D a RNDr. Aleně Pecinové, Ph.D za 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 závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13.8.2015

Podpis autora

Abstrakt

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním u dětí. Navzdory velkým úspěchům v léčbě tohoto onemocnění, relaps stále postihuje 15 – 20 % pacientů. Jedním z možných důvodů relapsu je vznik rezistence na cytostatika. Důležitou složkou chemoterapie u dětské ALL je L-asparagináza a právě rezistence vůči ní často komplikuje průběh léčby. Příčiny vzniku rezistence zatím nebyly dostatečně popsány. Tato diplomová práce je součástí rozsáhlého projektu, který se snaží objasnit mechanismy účinku L-asparaginázy a příčiny vzniku rezistence na toto chemoterapeutikum. Rozdílné metabolické nároky u nádorových buněk byly popsány již v roce 1924 O. H. Warburgem a jsou předmětem zkoumání dodnes.

Cílem této práce bylo zjistit vztah mezi bazálním metabolickým nastavením leukemických buněk a jejich citlivostí na L-asparaginázu. Za tímto účelem byly podrobně prozkoumány dvě metabolické dráhy, glykolýza a oxidativní fosforylace, pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer. Dále byla detekována exprese vybraných genů, jejichž produkty se podílí na procesu glykolýzy. Studován byl také obsah mitochondriálního retikula v buňkách, exprese genu pro asparagin syntetázu a velikost buněk. Experimenty byly prováděny na 19 modelových leukemických buněčných liniích, které reprezentovaly genotypicky i fenotypicky různé druhy leukemie. 11 buněčných linií představovalo akutní lymfoblastickou leukemii, z toho 9 zástupců bylo z B-prekurzorové řady (B-ALL) a 2 byli z T-prekurzorové řady (T-ALL). Zbýlých 8 buněčných linií reprezentovalo myeloidní leukemii v akutní (AML) nebo chronické (CML) fázi. Výsledky této práce potvrzují souvislost mezi glykolytickou aktivitou buněk a jejich citlivostí vůči L-asparagináze. Bylo objeveno několik genů, jejichž zvýšená exprese koreluje se zvýšenou glykolytickou aktivitou buněk. Mohly by se tak stát potenciálními markery metabolického nastavení u patientských vzorků.

Klíčová slova

L-asparagináza, leukemie, rezistence, metabolismus, glykolýza, oxidativní fosforylace

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant disease in children. Despite great advancements in treatment of this disease, around 15-20 % of patients suffer a relapse. One of the possible reasons for relapse is developed resistance to cytostatic drugs. L-asparaginase is an important chemotherapy component for childhood ALL and resistance to this drug often complicates treatment. To date, causes of developing resistance have not been sufficiently described. This thesis is a part of a greater research project focusing on mechanisms of L-asparaginase's activity and reasons for developing resistance to this chemotherapeutic agent. Differential metabolic requirements of cancerous cells have been described as early as 1924 by O. H. Warburg and they have been subject to scientific inquiry since.

This study aimed to describe the relationship between basal metabolic determinants of leukemia cells and their sensitivity to L-asparaginase. For this reason, two metabolic pathways, glycolysis and oxidative phosphorylation, were studied in detail using a Seahorse Bioanalyzer. Further, expression of specific genes involved in glycolysis was detected. Content of mitochondrial reticulum in cells, expression of the asparagine synthetase gene, and cell size were also studied. Experiments were conducted on 19 leukemia cell line models, which represented both genotypes and phenotypes of various types of leukemia. 11 cell lines represented acute lymphoblastic leukemia, 9 of which were B-precursor lines (B-ALL) and 2 were T-precursor lines (T-ALL). The remaining 8 cell lines represented myeloid leukemia in the acute (AML) or chronic (CML) phase. Findings of this study confirm the relationship between glycolytic activity in cells and their sensitivity to L-asparaginase. Several genes have been discovered, whose increased expression is correlated to increased glycolytic activity in cells. As a result, these could become potential markers of metabolic determinants in patient samples.

(In Czech)

Keywords

L-asparaginase, leukemia, resistance, metabolism, glycolysis, oxidative phosphorylation

Obsah

Poděkování	2
Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam použitých zkratk	3
1 Úvod	5
1.1 Leukemie	5
1.1.1 Vznik leukemie	6
1.1.2 Rozdělení leukemií	7
1.1.3 Výskyt leukemie	8
1.1.4 Léčba leukemie	9
1.2 Metabolismus nádorových buněk	14
1.2.1 Warburgův efekt	14
1.2.2 Glykolýza a leukemie	15
2 Cíle práce	17
3 Metody	18
3.1 Práce s buněčnými liniemi	18
3.1.1 Buněčné linie používané při experimentech	18
3.1.2 Příprava média pro kultivaci buněk	18
3.1.3 Rozmražení buněk	19
3.1.4 Pasážování buněk	19
3.1.5 Počítání buněk	19
3.1.6 Zamražení buněk	20
3.2 Velikost buněk	20
3.3 Cytotoxický test s použitím MTS	21
3.4 Energetický profil buněk	21
3.5 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	22
3.5.1 Příprava buněk	23
3.5.2 Izolace RNA	23
3.5.3 Reverzní transkripce	23
3.5.4 qRT-PCR	23

3.5.5	Izolace DNA	25
3.5.6	qPCR	25
3.5.7	Výpočet relativní normalizované hladiny mRNA či DNA	26
4	Výsledky	27
4.1	Cytotoxický test s použitím MTS	27
4.2	Energetický profil buněk	28
4.2.1	Glykolytická aktivita buněk	28
4.2.2	Mitochondriální respirace	35
4.3	Expresse genů	40
4.3.1	Expresse genů glykolytické dráhy	40
4.3.2	Mitochondriální geny	47
4.3.3	Asparagin syntetáza	48
4.4	Velikost buněk	49
4.5	Korelační testy	50
5	Diskuze	53
5.1	Cytotoxický test s použitím MTS	54
5.2	Energetický profil buněk	54
5.2.1	Glykolytická aktivita buněk	54
5.2.2	Mitochondriální respirace buněk	57
5.3	Velikost buněk	58
5.4	Asparagin syntetáza	59
6	Závěr	60
	Seznam použité literatury	61

Seznam použitých zkratek

2-DG	2-deoxy-D-glukóza
ABL	gen (Abelson Murine Leukemia)
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ASNS	asparagin syntetáza
ATP	adenosintrifosfát
β 2m	beta-2-microglobulin
B-ALL	Akutní lymfoblastická leukemie řady B
CML	chronická myeloidní leukemie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECAR	změna pH (extracellular acidification rate)
EV	electronic volume
FAB	francouzsko-americko-britská spolupracující skupina (French-American-British Cooperative Group)
FBS	fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenáza
GLUT1	glukózový transporter 1
GLUT3	glukózový transporter 3
GLUT5	glukózový transporter 5
GUSB	glukuronidáza B
HK2	hexokináza 2
HPRT1	hypoxantin fosforibosyl transferasa
LDHA	laktátdehydrogenáza A
LDHB	laktátdehydrogenáza B
MCT1	monokarboxylový transporter 1
MCT4	monokarboxylový transporter 4
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)- -2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)

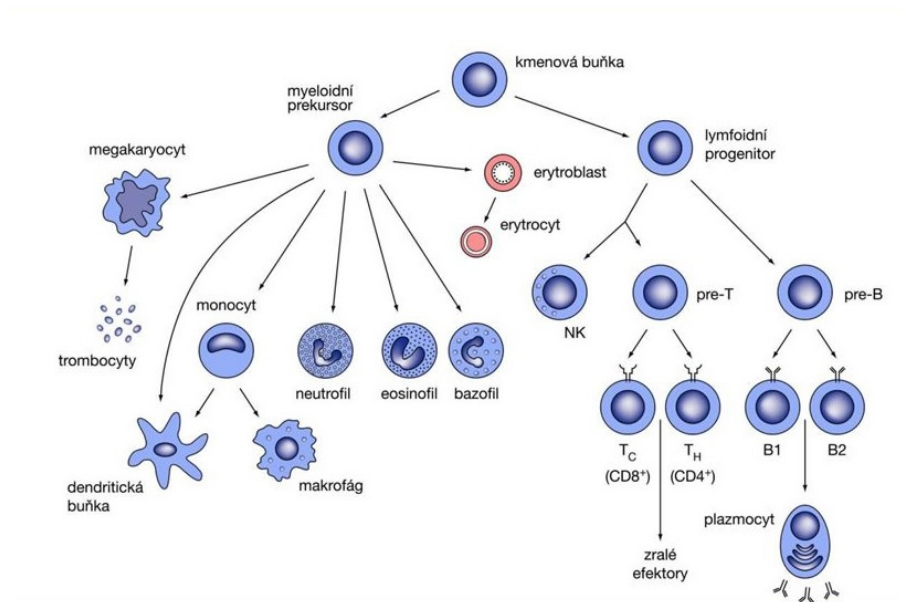
OCR	spotřeba kyslíku (oxygen consumption rate)
PCR	polymerázová reakce
PFKM	6-fosfofruktokináza M
PGM1	fosfoglukomutáza 1
PKM2	pyruvát kináza M2
qPCR	kvantitativní polymerázová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová reakce s reverzní transkripcí
T-ALL	akutní lymfoblastická leukémie řady T
TEL/AML1	fúzní gen
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

1. Úvod

1.1 Leukemie

Pojem leukemie zahrnuje celou řadu maligních onemocnění postihujících hemopoetický systém. Toto označení, v originále leukämie, bylo poprvé použito již v roce 1849 německým lékařem Rudolfem Virchowem (Mayer et al., 2002).

Za vznikem všech krevních buněk stojí stejná pluripotentní kmenová buňka (obrázek 1.1, str. 5). Díky nesymetrickému dělení vzniká z mateřské buňky vždy jedna buňka s mateřskými vlastnostmi a jedna dceřinná buňka, která dále podléhá postupné diferenciaci. Tímto procesem je zachována rovnováha a obnova krevního systému. v případě postižení organismu leukemií je však tento proces narušen. Vývoj krevních buněk je v určitém stádiu blokován, nedochází k úplné maturaci a buňky si zachovávají schopnost proliferovat (Pui et al., 1998). Tyto nezralé krevní buňky, leukemické blasty, vznikají v kostní dřeni, zaplavují krevní řečiště, jsou postupně šířeny do lymfatických uzlin, jater a jiných orgánů a vytěsňují zdravou populaci krevních buněk (Enver et al., 1998).



Obrázek 1.1: Schéma krvetvorby (převzato z Hořejší et al., 2013)

1.1.1 Vznik leukemie

Stejně jako u většiny maligních onemocnění není přesná příčina vzniku leukemie známa. Teorie vícestupňového procesu při vzniku nádorového onemocnění je tak přijímána jako platná i u leukemií. Přeměna v maligní buňku probíhá v několika krocích a díky jednotlivým genetickým změnám dochází k pozitivní selekci preleukemických buněk, z nichž se postupně stávají buňky leukemické (Greaves, 1999). Dle této teorie se na vzniku leukemie podílí celá řada faktorů. Můžeme je rozdělit na vnější a vnitřní. Vnější faktory se dále dělí na fyzikální (ionizující a neionizující záření), chemické (chemikálie, cytostatická léčba jiných onemocnění) a biologické (především viry) (Wiemels, 2012). Mezi vnitřní faktory patří genetické dispozice jedince a již existující chromozomální změny. Dědičnost tohoto onemocnění však nebyla prokázána. Dalšími neopomenutelnými faktory ovlivňujícími vznik leukemie jsou věk, pohlaví, zdravotní stav (klíčovou roli zde hraje imunitní systém) a životní styl (strava, kouření (Chang, 2009)) (Mayer et al., 2002).

Výzkumy leukemie u novorozenců, jednovaječných i vícevaječných sourozenců pomalu vnášejí světlo do etiologie leukemií a jejich počátečních fází. Jsou doloženy případy vrozených leukemií, které poukazují na možnost jejího počátku již v prenatálním období (Wiemels et al., 1999).

Jedna z teorií vzniku leukemie v dětském věku poukazuje i na možnost jejího propuknutí jako abnormální imunitní reakce po styku dítěte s pro něj neznámou virovou infekcí nebo jiným antigenem (Chang et al., 2009).

1.1.1.1 Leukemogeneze na molekulární úrovni

Leukemické buňky mají vlastnosti typické pro většinu nádorových buněk. Těmi například jsou: ztráta schopnosti diferenciaci při zachování, někdy i zvýšení, proliferace; defekty apoptózy vedoucí k prodloužení života buňky; nezávislost na vnějších růstových faktorech a změny v metabolických drahách (Mayer et al., 2002).

Za vznikem většiny z těchto transformací stojí hromadění mutací v genomu kmenových buněk nebo progenitorů, tedy částečně diferencovaných buněk jednotlivých řad krvetvorby (Enver et al., 1998).

Může se jednat o velké změny na úrovni počtu celých chromozomů, stejně tak jako pouze o bodové mutace, při nichž dochází k záměnám jednotlivých bází nukleových kyselin. Typickým jevem bývá vznik fúzního genu pomocí translokace nebo delece (Greaves, 1999). Klíčové jsou mutace ve dvou typech

genů, a to v protoonkogenech a antionkogenech (tumor supresorových genech). Protoonkogeny jsou geny účastníci se především regulace a stimulace buněčné proliferace. Jejich mutacemi dochází ke vzniku aktivovaných onkogenů, které produkují proteiny v nadbytku, se zvýšenou aktivitou nebo bez regulačních vlastností (Wiemels, 2012). Antionkogeny naopak tlumí proliferaci a stimulují diferenciaci či apoptózu. Mutacemi dochází k jejich inhibici a buněčná proliferace je zvýšena na úkor diferenciace. Dochází také k defektům v apoptotických drahách a buňky jsou schopné uniknout programované buněčné smrti (Mayer et al., 2002). K aktivaci onkogenů je dostačující mutace v jedné jeho alele, jedná se tedy o mutaci dominantní. Naopak mutace antionkogenů je recesivní a k jejímu uskutečnění musí dojít na obou alelách genu (Rubnitz et al., 1999).

Důkazem genové podstaty vzniku leukemií jsou mimo jiné i experimenty s myšími modely. Přenesením fúzního genu PML/RAR α se u nich podařilo vyvolat onemocnění podobné lidské akutní promyelocytární leukemii (Melnick et al., 1999).

1.1.2 Rozdělení leukemií

Jako leukemie je označována velmi heterogenní skupina všech malignit postihujících hemopoetický systém. Oficiální dělení a nomenklatura využívá celou řadu parametrů k vymezení jednotlivých subtypů. Existují dva používané systémy pro rozřazení tohoto onemocnění. Tím prvním je tzv. WHO (World Health Organisation) klasifikace, která člení toto onemocnění především podle původu postižených buněk (Swerdlow et al., 2008). Druhou, ač starší, přesto používanější, je tzv. FAB (French-American-British Cooperative Group) klasifikace (Bennett et al., 1976). U tohoto systému jsou základními charakteristikami průběh onemocnění a linie hemopoetických buněk, ze které pocházejí leukemické blasty.

Členění dle průběhu rozděluje leukemie na akutní a chronické. Akutní leukemie se vyznačují prudkým nástupem bez předchozí hematologické anamnézy. Buňky krvetvorby jsou blokovány v raných stádiích svého vývoje, tedy zejména plně nezralé. Tento typ leukemie se vyskytuje především v dětském věku. Zatímco chronické leukemie jsou doménou dospělých a u dětí se vyskytují jen velmi zřídka. Postiženy jsou buňky v pozdějších stádiích diferenciace a onemocnění má pomalejší průběh (Mayer et al., 2002).

Akutní i chronická leukemie dále zahrnuje celou řadu subtypů v několika

úrovních. Toto další členění probíhá na základě cytogenetických, imunologických, molekulárně genetických a morfologických analýz maligně transformovaných buněk (Rubnitz et al., 1999).

1.1.2.1 Akutní leukemie

Akutní leukemie tvoří většinu případů tohoto onemocnění a nejčastěji se vyskytují u dětí.

Projevy se u pacientů velmi různí, mohou přetrvávat týdny až měsíce a výjimečně mohou i zcela chybět. Typickými jevy doprovázejícími onemocnění jsou horečka, únava, bledost a nechutenství. Často se vyskytují také podlitiny v důsledku poruch srážlivosti krve, zduření mízních uzlin, bolesti kloubů a kostí či jiné potíže vyvolané dalšími chorobami díky oslabenému imunitnímu systému (Pui, 2000).

Akutní leukemie se stejně jako chronické dělí podle původu ovlivněné linie krvetvorby na lymfoblastickou (ALL) a myeloidní (AML). ALL postihuje lymfoidní linii krvetvorby, ze které za normálních okolností vznikají T a B lymfocyty. AML postihuje erythroidní, granulocytární, monocytární a megakaryocytární hemopoetickou linii. Avšak i tyto subtypy jsou stále heterogenními onemocněními, jejichž jednotlivé formy se od sebe velmi liší. Všechny podskupiny jsou přesně genotypově i imunofenotypově charakterizovány. Rozdíly jsou patrné v klinických příznacích, laboratorních nálezech, odpovědi na léčbu i ve věku nástupu choroby (Mayer et al., 2002).

1.1.3 Výskyt leukemie

Nádorová onemocnění jsou typickou doménou staršího věku. Pravděpodobnost jejich výskytu s věkem narůstá, zatímco u dětí jsou velmi vzácná. Výjimkou je ovšem onemocnění leukemií, kde velké procento pacientů tvoří právě děti (Stiller, 2004).

Akutní leukemie tvoří 65 % z celkového počtu všech leukemií. Jejich výskyt je často asociován s hereditárními poruchami jako jsou Downův syndrom (Fong et al., 1987), Bloomův syndrom (Poppe et al., 2001), ataxia-telangiectasia (Yamada et al., 1998) či Fanconioho anémie (Rochowski et al., 2012). ALL je nejčastější malignitou dětského věku a tvoří 80 % všech dětských leukemií (Pui et al., 1998). Ročně jí v České republice onemocní asi 70 dětí, z čehož nejvíce pacientů je ve věku 2 – 5 let (Trka et al., 2004). AML naopak častěji propuká u dospělých pacientů, jejichž medián věku při

diagnóze je 65 let a výskyt tohoto onemocnění s věkem narůstá. U dětí tvoří AML 15 % z celkového počtu postižených leukemií (Mayer et al., 2002).

Chronické leukemie postihují dospělou populaci a jejich výskyt v dětském věku je velmi vzácný. Tvoří 35 % z celkového výskytu leukemií. Průměrný věk při diagnóze chronické lymfoblastické leukemie (CLL) je 71 let. Jen vzácně se vyskytuje u lidí mladších 40 let a extrémně vzácná je u dětí. Chronická myeloidní leukemie (CML) propuká také především u starší populace a průměrný věk při diagnóze je 64 let. Leukemie vyskytující se u starších lidí jsou často důsledkem cytostatické léčby jiných zhoubných onemocnění (Mayer et al., 2002).

1.1.4 Léčba leukemie

Během posledních let bylo při léčbě leukemie dosaženo nesmírného pokroku. Ještě počátkem druhé poloviny 20. století byla leukemie bez výjimky smrtelnou chorobou. Její léčba byla pouze udržovací a měla za cíl pacientům co nejvíce zlepšit kvalitu zbývajících života, nikoli je však vyléčit (Trka et al., 2004). v současné době je však zcela vyléčeno 60 % dospělých pacientů a až 85 % dětí. Akutní leukemie jsou při časně diagnóze léčeny snadněji a je u nich větší šance na úplné uzdravení než u leukemií chronických (Pui et al., 2006).

1.1.4.1 Základní pojmy, diagnostika a průběh léčby

Při léčbě leukemie jsou využívány chemoterapie, radioterapie a bioterapie, které jsou kombinovány podle speciálních protokolů. Významnou roli hraje správná diagnostika a zařazení do léčebné skupiny. Vyšetřovány jsou vzorky kostní dřeně a periferní krve. Je snaha o co největší individualizaci přístupu, aby došlo ke zvýšení efektivity léčby (Kersey, 1997). Terapie je pacientovi přizpůsobena na míru podle jeho prognostických vyhlídek. Pacienti jsou nejčastěji rozděleni do tří základních skupin: s vysokým rizikem, se středním rizikem a se standardním rizikem. Rozdělení pacientů do těchto skupin probíhá na základě prognosticky významných znaků, jako jsou například chromozomální aberace leukemických buněk či časná odpověď na léčbu (Pui et al., 2004) (Kaspers et al., 2007).

Důležitým okamžikem při terapii leukemie je moment dosažení remise. Remise je stav, kdy vymizí známky onemocnění a při vyšetření krve nejsou nalezeny žádné leukemické blasty (Pui et al., 2000). v některých případech

se však stane, že dojde k tzv. relapsu, tedy návratu onemocnění po tom, co již byla dosažena kompletní remise. Relaps onemocnění je hlavním problémem komplikujícím léčbu a jeho terapie je vždy náročnější než u původního onemocnění (Pui et al., 2006) (Chessells, 1998). Často se stává, že se pacient stane rezistentní vůči předchozímu postupu, dávky chemoterapeutik se musí zesílit a vysokorizikovní pacienti mohou být indikováni k transplantaci kostní dřeně od vhodného dárce (Barret et al., 1994).

Neopomenutelnou roli hraje při léčbě všech typů leukemie podpůrná terapie. Pacientům je často třeba podávat krevní deriváty, jelikož krvetvorba je leukemickými blasty potlačena (Pui, 2006). v důsledku oslabeného imunitního systému jsou časté komplikace sekundárními, většinou infekčními chorobami. Ty je třeba okamžitě řešit, aby nedošlo k ohrožení pacienta (Cortes et al., 1995).

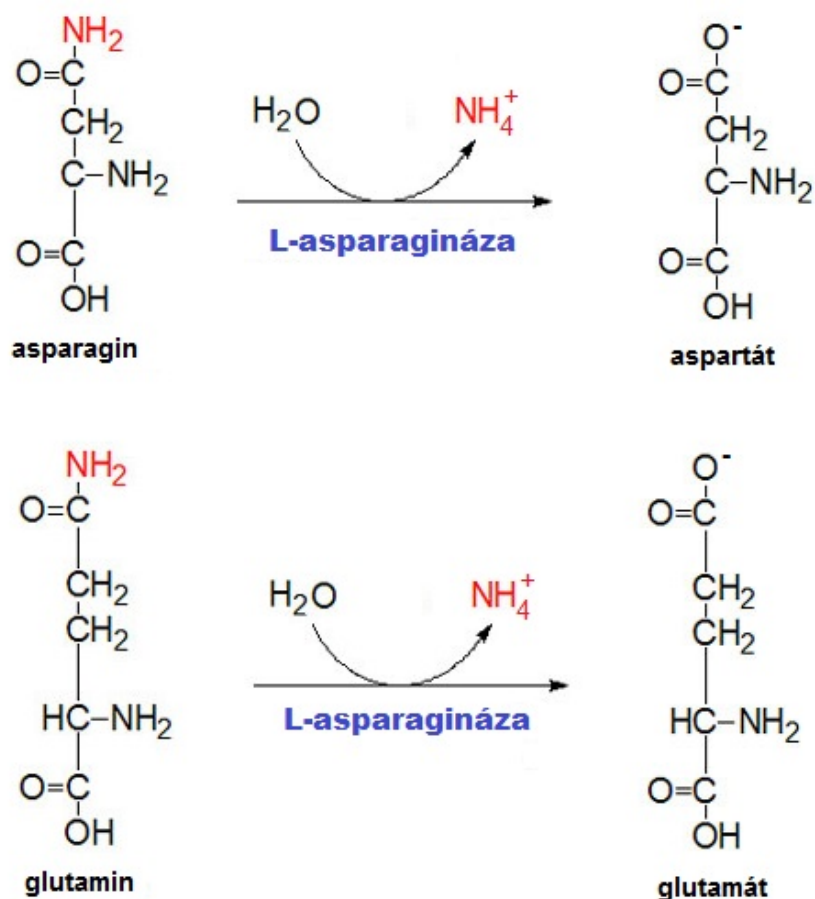
1.1.4.2 Léčba dětských pacientů

Léčba dětských leukemií slaví mnohem větší úspěchy než v případě dospělých pacientů. Nejlepší prognózu mají nemocní ve věku od 2 do 7 let. U dětí se používají větší dávky chemoterapeutik a širší spektrum jejich druhů. Mladý organismus se s nastalými změnami lépe vypořádává a hrozí u nich mnohem menší riziko vedlejších účinků než u dospělých pacientů, jejichž tělo tuto zátěž snáší mnohem hůře. Úspěchy léčby dětské akutní leukemie spočívají v použití kombinované chemoterapie (Cortes et al., 1995). Ta u ALL zahrnuje prednison, vinkristin, daunorubicin, L-asparaginázu (Amylon et al., 1999), cytosinarabinosid, merkaptopurin (Pinkel, 1993), cyklofosfamid a metotrexát podávaný ve vysokých dávkách (Wall et al., 2000). Vyléčení ALL u dětí dosahuje 75 – 80 %.

Terapie AML u dětí obsahuje antracyklin, cytarabin, fludarabin, idarubicin, mitoxantron, cytosinarabinosid a etoposid. Úspěšnost vyléčení je nižší než u ALL, a to 60 % (Cortes et al., 1995).

1.1.4.3 L-asparagináza

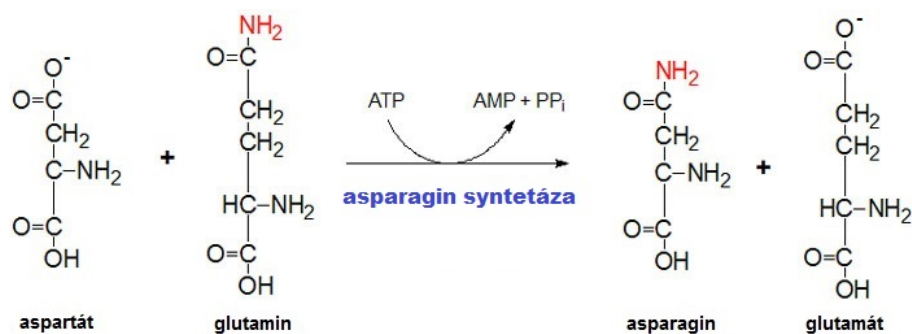
L-asparagináza (ASNase) je enzym přirozeně se vyskytující u rostlin, živočichů i mikroorganismů (Shristava et al., 2010). Patří do skupiny deamidáz. Katalyzuje hydrolytickou přeměnu asparaginu na aspartát a glutaminu na glutamát (obrázek 1.2, str. 11) za uvolnění amoniaku (Aghaiypour et al., 2001).



Obrázek 1.2: Hydrolýza asparaginu na aspartát a glutaminu na glutamát enzymem L-asparagináza

1.1.4.3.1 Asparagin syntetáza

Antagonistou L-asparaginázy je enzym asparagin syntetáza (ASNS). Patří do skupiny aminotransferáz a je zodpovědná za endogenní syntézu asparaginu. Přenáší aminoskupinu z glutaminu na aspartát za spotřeby ATP (obrázek 1.3, str. 12). v eukaryotických buňkách nevyužívá jiné substráty, je proto označována jako glutamin-dependentní (Richards, 1998).



Obrázek 1.3: Syntéza asparaginu enzymem asparagin syntetáza

1.1.4.3.2 Využití L-asparaginázy při léčbě leukemie

Výrazné léčebné účinky L-asparaginázy byly objeveny v roce 1953, když po aplikaci séra z morčete začalo u nemocných myši a krysy docházet k redukci velikosti lymfomů (Kidd, 1953). Po podrobném prozkoumání složení séra a vlastnostech jeho složek, bylo zjištěno, že tyto protinádorové účinky náleží enzymu L-asparagináza (Broome, 1963). v současné době se pro terapeutické účely získává z mikroorganismů kmene *Escherichia coli* nebo *Erwinia carotovora*. Enzymy od obou kmenů mají stejné účinky, ale při vzniku alergie pacienta na jeden druh lze použít L-asparaginázu od druhého kmene, protože protilátky vznikající proti jednomu preparátu nemají zkříženou reakci s druhým, což je v praxi velmi výhodné (Zalewska-Szewczyk et al., 2009). Tento enzym je esenciální komponentou léčebných protokolů pro akutní lymfoblastickou leukemii dětského věku. Výzkumy dokazují, že při monoterapii L-asparaginázou je dosaženo kompletní remise u 40 – 60 % všech dětských ALL (Tallal et al., 1970). U dospělých je situace značně komplikována vedlejšími účinky jako například vznikem trombotických stavů, akutní pankreatitidy či selháním jater. v těchto případech je tedy používána spíše jako doplňková složka chemoterapie nebo je z ní úplně vyřazena. Snahou tedy je ji do terapie dospělých zařazovat, ale pouze s velkou opatrností vzhledem ke stavu pacienta. Zajímavé je, že na léčbu leukemie myeloidní řady nemá takový výrazný vliv, a tak se při terapii AML nepoužívá (Couturier et al., 2015).

1.1.4.3.3 Mechanismus účinku L-asparaginázy

Růst všech buněk je závislý na příjmu látek z okolí pro zabezpečení řádného chodu metabolických procesů. Cytotoxické působení L-asparaginázy tkví v hydrolýze asparaginu a glutaminu, tedy ve snížení jejich koncentrace v krevním séru (Aghaiypour et al., 2001). Extracelulární přítomnost těchto amino-

kyselin je důležitá pro správný růst a vývoj buněk i tkání. Zdravé buňky jsou schopny vykompenzovat jejich nedostatek endogenní syntézou, a tak na ně působení L-asparaginázy nemá cytotoxický vliv jako v případě buněk leukemických. Za endogenní tvorbu asparaginu je zodpovědná ASNS. Leukemické blasty mají expresi ASNS v porovnání se zdravými buňkami sniženu a jsou tedy závislé na extracelulární přítomnosti substrátů (Haskell et al., 1989). Díky jejich nedostatku po působení L-asparaginázy dochází k poškození proteosyntézy a následně k navození buněčné smrti. Přesné mechanismy účinku a dráhy, kterými dochází k ovlivnění metabolismu buněk, však nebyly ještě popsány.

1.1.4.3.4 Rezistence vůči L-asparagináze

Velkou komplikací při léčbě dětské ALL je relaps onemocnění, který v současné době stále ještě postihuje 15 – 20 % pacientů (Pui et al., 2006). Příčin vzniku relapsu je celá řada. Jednou z nich může být neúspěch terapie v důsledku rezistence na cytostatickou léčbu včetně L-asparaginázy (Pieters et al., 1997). Mechanismus vzniku rezistence na L-asparaginázu nebyl doposud jednoznačně popsán (den Boer et al., 1998). Je to komplexní proces ovlivňující celou řadu buněčných metabolických drah. Odpověď jednotlivých pacientů na účinky L-asparaginázy je rozdílná a příčiny této odlišné citlivosti zůstávají i nadále otázkou a předmětem zkoumání.

Jako nejjednodušší vysvětlení se nabízela rozdílná hladina exprese asparagin syntetázy, antagonisty L-asparaginázy. Počáteční studie na modelových leukemických buněčných liniích tomu nasvědčovaly. Zvýšená exprese ASNS byla prokázána u ALL buněčných linií rezistentních vůči L-asparagináze (Aslain et al., 1989) a zároveň bylo i docíleno rezistentního fenotypu zvýšenou expresí ASNS. Tato teorie však byla zcela vyvrácena u patientských vzorků. Hladina exprese ASNS se sice mezi pacienty liší, ale je celkově velmi nízká a korelace s citlivostí vůči L-asparagináze zde není (Heřmanová et al., 2012). Dále byl objeven i paradox u ALL pacientů s fúzním genem TEL/AML1. Tito pacienti mají expresi ASNS zvýšenou a zároveň jsou citlivější na léčbu L-asparaginázou ve srovnání s pacienty bez výskytu tohoto fúzního genu (Krejčí et al., 2004) (Stams et al., 2003).

Nádorové mikroprostředí hraje důležitou roli onkogeneze i u nesolidních nádorů. Pro leukemické buňky jsou zásadní mezenchymální buňky kostní dřene. Vzniklo tedy podezření, že právě syntéza asparaginu mezenchymálními buňkami kostní dřene by mohla chránit leukemické blasty před jeho nedostat-

kem (Iwamoto et al., 2007). Hladina asparaginu v krvi a kostní dřeni byla měřena během indukční léčby, zvýšená koncentrace ovšem zjištěna nebyla (Tong et al., 2013).

Glutaminázová aktivita L-asparaginázy byla zprvu zcela opomíjena. Současné poznatky však odhalují její důležitost a některé výzkumy ji dokonce staví nad tu asparaginovou (Ramay et al., 2012). Nedostatek glutaminu výrazně ovlivňuje jak translační, tak i metabolické procesy v buňce (Wise et al., 2010). Důležitou roli zde hraje komplex mTORC1, který je klíčovým protei- nem translační dráhy. Díky němu je ovlivněna autofagie (Levine et al., 2004) a také oxidace a syntéza mastných kyselin u buněk.

1.2 Metabolismus nádorových buněk

Nadměrně proliferující nádorové buňky vykazují odlišné metabolické nároky ve srovnání se zdravými, diferencovanými buňkami. Velké množství energie a biomasy je spotřebováno právě na nadměrnou proliferaci, a tak k jejímu zajištění nestačí pouze klasické energetické cesty (Barger et al., 2010). Transformace buněčného metabolismu jsou uskutečňovány k zajištění přísunu intermediárních metabolitů pro syntetické pochody a k tvorbě dostatečného množství energie ve formě ATP a redukčních ekvivalentů. K syntéze energeticky výhodných molekul je využíváno široké spektrum zdrojů jako například glukóza, aminokyseliny a lipidy. v závislosti na jejich aktuální dostupnosti může buňka měnit metabolické cesty, které zrovna k získávání energie používá (De Berardinis et al., 2008). Nejdůležitějším zdrojem energie je pro nádorové buňky glykolýza, ve které je zpracovávána glukóza. Druhou nejčastější cestou je odbourávání glutaminu, tzv. glutaminolýza a u některých nádorů byla dokonce zjištěna primární závislost právě na glutaminu (Gao et al., 2009). Tato závislost na některých zdrojích energie a její nadměrná spotřeba se v současnosti jeví jako dobrý terapeutický cíl (Wise et al., 2010) a podléhá mnoha výzkumům.

1.2.1 Warburgův efekt

Stále neobjasněným paradoxem zůstává, proč nádorové buňky využívají k zisku energie glykolýzu na úkor energeticky výhodnější mitochondriální respirace. Tato typická metabolická změna, tzv. Warburgův efekt, byla popsána v roce 1924 německým biologem a lékařem Ottou Heinrichem Warburgem.

Předkládá nadměrně vysoký příjem glukózy u nádorových buněk (Warburg, 1956). Toto velké množství je zpracováno v procesu aerobní glykolýzy a slouží k získání energie ve formě ATP pro buňku. Výsledným produktem je laktát, který okyseluje nádorové mikroprostředí. Původně byla tato metabolická změna považována za příčinu maligní transformace (Warburg, 1956), nyní je však považována spíše za výsledek mutací onkogenů a tumor supresorových genů a charakteristickým průvodním znakem onkogeneze. Přechod od glykolýzy k energeticky výhodnější oxidativní fosforylaci byl pozorován u zdravých buněk v případě buněčného stresu (Suganuma et al., 2010). Jako možná strategie pro léčbu malignit tedy vyvstává působení cytostatik na indukci změny získání energie ve prospěch oxidativní fosforylace (Kaelin et al., 2010).

1.2.2 Glykolýza a leukemie

Vliv metabolismu nádorových buněk na léčbu leukemie byl popsán již v mnoha případech a zvláště proces glykolýzy zde hraje zásadní roli. U pacientů trpících AML byla prokázána spojitost mezi glykolytickou aktivitou leukemických buněk při diagnóze a celkovou prognózou. Čím více glykolytické metabolické nastavení buňky vykazují, tím slabší je odezva na podaná léčiva (Herst et al., 2011).

Dále byla nalezena spojitost mezi glykolýzou a rezistencí na glukokortikoidy u B-ALL buněčných linií. Geny spojené s metabolismem glukózy jsou u různých linií exprimovány různě a tyto rozdíly korelují s citlivostí na glukokortikoid prednison, který se běžně při léčbě leukemií používá. Zvýšený příjem glukózy vede k rezistenci na toto chemoterapeutikum a při inhibici glykolýzy pomocí 2-deoxy-D-glukózy (2-DG) dochází ke zvýšení citlivosti u rezistentních buněk (Hulleman et al, 2009).

U B-ALL i T-ALL buněčných linií byla objevena souvislost mezi expresí genu pro antiapoptotický protein MCL1 a citlivostí buněk na prednison. Snížení exprese MCL1 u buněk rezistentních vůči prednisonu vedla ke snížení proliferace a zvýšení citlivosti. U těchto buněk došlo také k výraznému snížení příjmu glukózy (Ariès et al., 2013).

Rezistence vůči glukokortikoidům spojená se zvýšenou glykolytickou aktivitou byla prokázána i u T-ALL buněčných linií. Inhibice glykolýzy zde také vedla k lepší odpovědi na chemoterapeutika a navíc byla popsána i synergie s inhibicí mitochondriální respirace (Samuels et al., 2013).

Důležitou roli hrají také membránové přenašeče glukózy. Po delecii glukó-

zového transporteru 1 (GLUT1) dochází u B-ALL buněčných linií ke snížení příjmu glukózy, zároveň také ke snížení proliferační aktivity a zvýšení apoptózy. *In vivo* byla pozorována ztráta schopnosti hromadění těchto buněk a zpomalení progresu leukemie (Liu et al., 2014).

2. Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda bazální metabolické nastavení leukemických buněk ovlivňuje jejich citlivost k L-asparagináze. Studováno bylo také, jestli se metabolická aktivita buněk bude odrážet ve fenotypu buněk jako je velikost buněk a počet mitochondrií. Dalším cílem bylo navrhnout potenciální marker na expresní úrovni, který by mohl být použitý pro určení glykolytické aktivity u patientských vzorků.

Za tímto účelem bylo třeba:

- Všechny experimenty provést na souboru genotypově i fenotypově rozdílných modelových leukemických buněčných linií (celkem 19 buněčných linií: 5x AML, 3x CML 2x T-ALL, 9x B-ALL).
- Určit citlivost buněk na L-asparaginázu.
- Stanovit glykolytickou aktivitu u buněčných linií.
- Stanovit mitochondriální respiraci u buněčných linií.
- Změřit expresi vybraných glykolytických genů.
- Zjistit množství mitochondriálního retikula v buňkách.
- Změřit expresi genu pro enzym asparagin syntetáza.
- Detekovat velikost buněk.
- Provést statistické vyhodnocení výsledků a najít vzájemné korelace.

3. Metody

3.1 Práce s buněčnými liniemi

Buňky používané při experimentech byly uchovávány v kultivačních lahvích (TPP, Techno Plastic Products) v inkubátoru při 37°C a 5 % CO₂. Veškerá práce s nimi při dlouhodobé kultivaci probíhala ve sterilním prostředí mikrobiologického boxu. Zabránilo se tak kontaminaci mikroorganismy z vnějšího prostředí.

3.1.1 Buněčné linie používané při experimentech

Buněčné linie používané v experimentech byly zakoupeny od firmy DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. Všechny jsou suspenzními liniemi, představujícími genotypicky i fenotypicky různé druhy leukemie:

- Akutní myeloidní leukemie (AML):
KASUMI-1, MOLM-13, MV4-11, NB4, THP1
- Chronická myeloidní leukemie (CML) v blastické krizi:
BV-173, K-562, LAMA-84
- Akutní lymfoblastická leukemie řady T (T-ALL):
CEM, JURKAT
- Akutní lymfoblastická leukemie řady B (B-ALL):
AT-2, HB11;19, Nalm-6, REH, RS4;11, SEM, SUP-B15, TOM-1, UOC-B6

3.1.2 Příprava média pro kultivaci buněk

Kultivační médium, ve kterém byly všechny buňky po celou dobu pěstovány bylo složeno z:

- živného roztoku Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640, Life technologies)
- 10% (v/v) inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS, Life technologies)

- 1% (v/v) směsi antibiotik a antimykotik (Antibiotic-Antimycotic, Life technologies).

Inaktivované FBS bylo připraveno jeho rozmražením ve vodní lázni při 37°C a teplotní inaktivací při 56°C po dobu 30 minut.

3.1.3 Rozmražení buněk

Vzorky buněčných linií byly uchovávány v tekutém dusíku. Při rozmražování byly na ledu přeneseny do vodní lázně, kde byly zahřívány po dobu 2 minut při 37°C. Poté k nim bylo opatrně připipetováno 10 ml předem vytemperovaného kultivačního média a buňky byly centrifugovány (Universal 32R, rotor 1619, Hettich) při 169 g, 25°C po dobu 5 minut. Získaná buněčná peleta byla resuspendována a přenesena do 5 ml kultivačního média v kultivační lahvi. Dále byly buňky pasážovány (viz. 3.1.4. Pasážování buněk, str. 18) a po dostatečné regeneraci buněk od rozmražení byla část zpět zamrazena do tekutého dusíku (viz. 3.1.6 Zamražení buněk, str. 19)

3.1.4 Pasážování buněk

Pěstovaným buňkám je třeba pravidelně měnit médium, aby docházelo k doplnění živin. K tomu slouží proces pasážování, kdy je staré médium nahrazeno novým a zároveň jsou odstraněny i odumřelé buňky. Tento proces byl u buněk prováděn dvakrát týdně.

Obsah kultivační lahve je centrifugován (Universal 32R, rotor 1619, Hettich) po dobu 5 minut, při 169 g a teplotě 25°C. Získaná peleta je resuspendována, buňky spočítány (viz. 3.1.5 Počítání buněk, str. 18) a požadované množství opět kultivováno v lahvi s novým médiem.

3.1.5 Počítání buněk

Počítání buněk bylo prováděno dvěma způsoby. Ten první byl pomocí automatické počítáčky buněk (Automated Cell Counter, Life Technologies). Buněčná suspenze byla smíchána s trypanovou modří (Trypan Blue, Lonza) 1:1 a 10 μ l této směsi bylo aplikováno do počítacího sklíčka (Cell Counting Chamber Slide, Life technologies). To bylo vloženo do počítáčky získanou hodnotou byl celkový počet, počet živých a mrtvých buněk v 1 ml, viabilita a velikost buněk. Druhým přístrojem využívaným k počítání buněk byl ScepterTM 2.0 (Millipore). K používání tohoto přístroje jsou nutné speciální

senzory (Scepter Cell counter sensor, Millipore). Senzor se spojí s přístrojem a pomocí něj se dovnitř nasává vzorek. Buňky jsou při průchodu senzorem spočítány. Výsledkem je diagram ukazující zastoupení jednotlivých velikostí buněk, ve kterém si lze označit sledovanou populaci a z té je potom vypočítána koncentrace buněk v ml.

3.1.6 Zamražení buněk

K zamražení buněk může dojít nejdříve za týden po jejich rozmražení, aby buňky měly dostatek času k regeneraci. Buněčná suspenze z kultivační lahve je centrifugována (Universal 32R, rotor 1619, Hettich) po dobu 5 minut, při 169 g a teplotě 25°C. Poté jsou buňky spočítány, $10 \cdot 10^6$ buněk je přeneseno do zamrazovací zkumavky, doplněno médiem, dimethylsulfoxidem (10 % (v/v))(DMSO, Sigma-Aldrich) a inaktivovaným FBS (30 % (v/v)) (viz. 3.1.2 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 17). Zamrazovací zkumavka je umístěna v mrazící nádobě (Mr. Frosty, Thermo Scientific) do -80°C po dobu 24 hodin a poté přemístěna do tekutého dusíku k dlouhodobému uskladnění.

3.2 Velikost buněk

Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta. Pro tuto analýzu nebylo třeba buňky značit fluorescenčně, pouze byla naměřena hodnota EV (electronic volume). Při průchodu buňky přístrojem je vytlačen objem elektrolytu, který přesně odpovídá objemu buňky. Tato změna vyvolá napěťový puls, jehož intenzita odpovídá objemu vytlačené kapaliny, tedy i objemu buňky.

Buňky pro analýzu velikosti byly nasazeny v kultivačním médiu (viz. 3.1.2 Příprava média pro kultivaci buněk, str. 17) do 24 jamkové destičky v koncentraci $0,5 \cdot 10^6$ /ml o konečném počtu $1 \cdot 10^6$ a inkubovány přes noc. Další den byl obsah jamek centrifugován (5 min, 243 g), získané pelety resuspendovány v 500 μ l čerstvého kultivačního média a 200 μ l buněčné suspenze bylo přepipetováno do 96 jamkové destičky s kónickým dnem (TPP, Techno Plastic Products). Průtokovým cytometrem Cell Lab Quanta byl změřen EV, který přímo odpovídá objemu, tedy velikosti, buňky. Měření bylo provedeno v biologickém duplikátu.

3.3 Cytotoxický test s použitím MTS

Ke stanovení citlivosti buněk na L-asparaginázu byl použit cytotoxický test s využitím MTS reagentie. 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. Test byl proveden se všemi 19 buněčnými liniemi v biologickém duplikátu.

Do 96-jamkové destičky byla pipetována suspenze z jedné buněčné linie tak, aby výsledná koncentrace byla 12000 buněk v 80 μl , tedy v jedné jamce a byla inkubována přes noc. Další den bylo k buňkám přidáno 20 μl roztoku L-asparaginázy (Asparaginase, Medac). Pokus byl prováděn v hexaplikátech nad sebou. Bylo připraveno 8 různých koncentrací L-asparaginázy ředěním 1:4. Výsledná koncentrace L-asparaginázy v jamce byla $5,12 \cdot 10^{-5} - 4 \text{ IU/ml}$. Přichystané buňky byly 72 hodin uschovány v inkubátoru. Poté byly vyjmuty ven, bylo k nim přidáno 14 μl MTS a byly opět inkubovány. Po třech hodinách byl spektrofotometricky (VersaMAX, Molecular Devices) změřen rozdíl mezi jamkami ošetřenými L-asparaginázou a kontrolními jamkami. Absorbance produktů byla měřena při 490 nm.

3.4 Energetický profil buněk

Ke sledování aktivity glykolýzy a mitochondriální respirace u buněk byl použit přístroj Seahorse Bioanalyzer XFe24. V obou případech byl dodržován protokol výrobce s malými obměnami. Buňky byly na dno 24-jamkové měřicí desky (Seahorse Bioscience) imobilizovány pomocí adhezivního přípravku Cell Tak (Corning) dle návodu výrobce a při každé pokusu byly vždy nasaženo v počtu 300 000 buněk.

Při měření glukózy bylo použito čisté „Base medium“ (Seahorse Bioscience) a postupné přídavky v průběhu měření byly 10mM glukóza, 1 μM oligomycin a 100 mM 2-deoxy-D-glukóza (XF Glycolysis Stress Test Kit Seahorse Bioscience).

Při měření mitochondriální respirace bylo použito „Assay medium“ (Seahorse Bioscience) doplněné o 10mM pyruvát, 2mM glutamin, 10 mM glukózu, 0,2% BSA a 1mM HEPES. Přídavky byly 2 μM oligomycin, 2x FCCP a 1 μM rotenon s 1 $\mu\text{g/ml}$ antimycinem A (XF Mito Stress Test Kit Seahorse Bioscience). Koncentrace FCCP byla u každé linie jiná. Postupně se vytitrovala

taková koncentrace, kdy buňky dosáhla svého respiračního maxima.

Veškerá měření byla provedena v technickém tetraplikátu a biologickém triplikátu.

3.5 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase byla využita ke stanovení exprese vybraných glykolytických genů a asparagin syntetasy na mRNA úrovni (viz. 3.5.4 qRT-PCR, str. 22). Kvantitativní PCR v reálném čase se stanovila exprese vybraných mitochondriálních genů na DNA úrovni (viz. 3.5.6 qPCR, str. 24). Tato analýza byla provedena u všech 19 buněčných linií.

Sledované geny a jejich produkty:

- glykolytické geny
 - GLUT1 – glukózový transporter 1
 - GLUT3 – glukózový transporter 3
 - GLUT5 – glukózový transporter 5
 - HK2 – hexokináza 2
 - LDHA – laktátdehydrogenáza A
 - LDHB – laktátdehydrogenáza B
 - MCT1 – monokarboxylový transporter 1
 - MCT4 – monokarboxylový transporter 4
 - PFKM – 6-fosfofruktokináza M
 - PGM1 – fosfoglukomutáza 1
 - PKM2 – pyruvát kináza M2
- mitochondriální geny
 - D-loop – konzervovaná oblast mtDNA
 - 16S – podjednotka prokaryotního ribozomu
- asparagin syntetáza – enzym ASNS
- kontrolní geny
 - ABL – abelson murine leukemia

- β 2m – beta-2-microglobulin
- GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenáza
- GUSB – glukuronidáza B
- HPRT1 – hypoxantin fosforibosyl transferáza
- RN18S1 – podjednotka eukaryotního ribozomu

3.5.1 Příprava buněk

Kvantitativní analýza pomocí RT-PCR i PCR byla provedena v biologických triplicátech. Buňky pro analýzu byly nasazeny v kultivačním médiu do 24 jamkové destičky v koncentraci $0,5 \cdot 10^6$ /ml o konečném počtu $2 \cdot 10^6$ a inkubovány přes noc. Další den byl obsah jamek centrifugován (5 min, 243 g), získané pelety byly resuspendovány v PBS a opět centrifugovány (4°C, 5 min, 243 g). Supernatant byl opatrně odsán a získané pelety použity pro izolaci RNA a DNA.

3.5.2 Izolace RNA

Izolace RNA z buněčných pelet byla provedena pomocí kitu RNeasy® Mini Kit (Quiagen) přesně dle návodu výrobce a bylo využito volitelného kroku přečištění pomocí DNasy. Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla určena pomocí spektrofotometru NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC) v programu ND-1000 V3.7.1. Tento přístroj měří absorbanci vzorku ve světle o vlnové délce 230, 260 a 280 nm.

3.5.3 Reverzní transkripce

Pomocí kitu iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio Rad) byla přepsána vyizolovaná mRNA (messenger RNA) do cDNA (kódující DNA). Postupováno bylo přesně dle návodu výrobce a byl použit 1 μ g templátové RNA.

3.5.4 qRT-PCR

Získaná cDNA byla použita k polymerázové řetězové reakci. Amplifikace glykolytických genů (GLUT1, GLUT3, GLUT5, HK2, LDHA, LDHB, MCT1, MCT4, PFKM, PGM1, PKM2) a některých kontrolních genů (GUSB, HPRT1, RN18S1) proběhla v přístroji 7500 Fast Real-Time PCR System (Life technologies). Byly využity komerčně dodávané směsi sond a primerů pro každý

gen tzv. TaqMan Assays (Life technologies). Výsledná reakční směs byla namíchána v duplikátu pro každý vzorek a pro každý gen o složení :

- TaqMan Assay, 20x - 1 μ l
- TaqMan Universal Master Mix II, no UNG, 2x - 10 μ l
- H₂O - 8 μ l
- cDNA - 1 μ l

a celkovém objemu 20 μ l.

Reakce v přístroji byla uskutečněna ve speciální 96 jamkové destičce (MicroAmp Fast, Life technologies) zalepené ochrannou fólií podle protokolu: 1x 10 min 95°C, 40x 15 s 95°C + 60 s 60°C.

Amplifikace asparagin syntetázy a kontrolního genu ABL byla provedena v přístroji LightCycler480 II (Roche). Byly použity komerčně dodávané primery (Sigma-Aldrich) pro daný gen a nespecifická sonda Sybr Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Výsledná reakční směs byla namíchána v duplikátu pro každý vzorek a pro každý gen o složení:

- Sybr Green Mix - 5 μ l
- fwd primer (10 μ M) - 0,5 μ l
- rev primer (10 μ M) - 0,5 μ l
- H₂O - 3 μ l
- cDNA - 1 μ l

a celkovém objemu 10 μ l.

Reakce v přístroji byla uskutečněna ve speciální 96 jamkové destičce (LC Plate, Roche) zalepené ochrannou fólií podle protokolu 1x 10 min 95°C, 40x 15 s 95°C + 60 s 60°C.

Amplifikace kontrolního genu β 2M byla provedena v přístroji LightCycler480 II (Roche). Byly použity specifické primery i sondy pro daný gen, komerčně dodávané (Sigma-Aldrich). Výsledná reakční směs byla namíchána v duplikátu pro každý vzorek o složení :

- Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) - 0,2 μ l
- 10x PCR – reaction buffer mix (Invitrogen) - 2 μ l

- BSA (Invitrogen) - 0,5 μ l
- 50mM MgCl₂ (Invitrogen) - 1,2 μ l
- dNTP Mix (AB) - 1,6 μ l
- fwd primer (10 μ M) - 1 μ l
- rev primer (10 μ M) - 1 μ l
- 5-probe (4 μ M) - 1 μ l
- 3-probe (4 μ M) - 1 μ l
- cDNA 1 μ l. - 1 μ l

Reakce v přístroji byla uskutečněna ve speciální 96 jamkové destičce (LC Plate, Roche) zalepené ochrannou fólií podle protokolu 1x 10 min 95°C, 40x 15 s 95°C + 60 s 60°C.

3.5.5 Izolace DNA

Izolace DNA z buněčných pelet byla provedena pomocí kitu QIAampDNA Micro Kit přesně dle návodu výrobce. Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla určena pomocí spektrofotometru NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC) v programu ND-1000 V3.7.1. Tento přístroj měří absorbanzi vzorku ve světle o vlnové délce 230, 260 a 280 nm.

3.5.6 qPCR

Získaná DNA byla použita k polymerázové řetězové reakci. Amplifikace mitochondriálních genů (D-loop, 16S) a kontrolního genů GAPDH proběhla v přístroji 7500 Fast Real-Time PCR System (Life technologies). Byly využity komerčně dodávané směsi sond a primerů pro každý gen tzv. TaqMan Assays (Life technologies). Výsledná reakční směs byla namíchána v duplikátu pro každý vzorek a pro každý gen o složení :

- TaqMan Assay, 20x - 1 μ l
- TaqMan Universal Master Mix II, no UNG, 2x - 10 μ l
- H₂O - 8 μ l
- cDNA - 1 μ l

a celkovém objemu 20 μ l.

Reakce v přístroji byla uskutečněna ve speciální 96 jamkové destičce zalepené ochrannou fólií podle protokolu 1x 10 min 95°C, 40x 15 s 95°C + 60 s 60°C.

3.5.7 Výpočet relativní normalizované hladiny mRNA či DNA

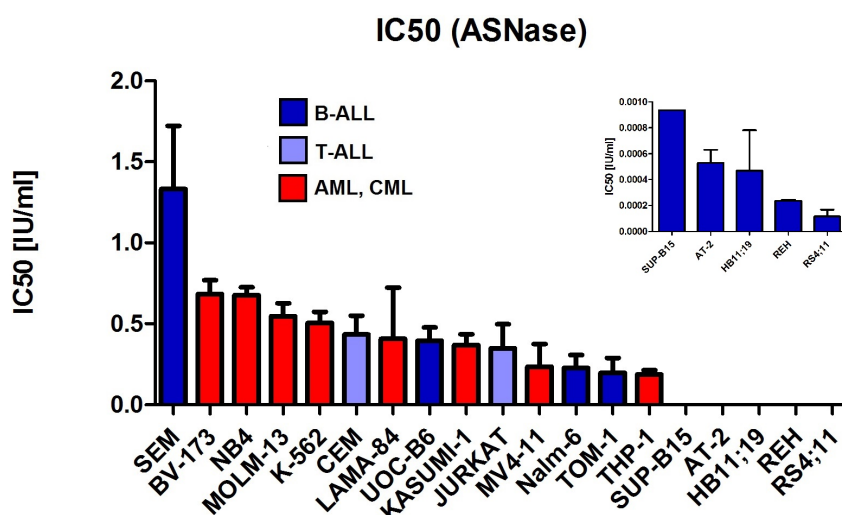
Expres jednotlivých genů byla při výpočtech vztažena k hladině kontrolních (housekeeping) genů. Došlo tak k normalizaci rozdílného množství cDNA vložené do reakce: C_t (sledovaný gen) – C_t (kontrolní gen) $\sim \Delta C_t$. Z průměru daných hodnot byla získána v procentech relativní exprese sledovaného genu jako $(1/2^{\Delta ct}) \times 100$.

4. Výsledky

4.1 Cytotoxický test s použitím MTS

Ke stanovení citlivosti buněk na L-asparaginázu byl použit cytotoxický test s využitím MTS reagentie (viz. 3.2 Cytotoxický test s použitím MTS , str. 20). Tento test je založen na redukcí 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.

Buněčné linie byly 72 hodin inkubovány s různými koncentracemi L-asparaginázy ($5,12 \cdot 10^{-5} - 4$ IU/ml) a jako kontrola byly použity buňky dané linie bez přídatku L-asparaginázy. Naměřené hodnoty byly normalizovány na kontrolní buňky, a tak bylo získáno procentuální zastoupení přežívajících buněk. Měření bylo provedeno v nezávislém biologickém duplikátu a výsledné hodnoty jsou jeho průměrem. Dále byly naměřené hodnoty využity k výpočtu relativní IC50 (obrázek 4.1, str. 27). Tento parametr odpovídá koncentraci L-asparaginázy, jež má 50% inhibiční efekt. Dochází tedy k poklesu živých buněk o 50 %. Získané údaje byly dále použity při korelačních testech (viz. 4.5 Korelační testy, str. 49).



Obrázek 4.1: Hodnota IC50 (ASNase) pro všechny buněčné linie. Buňky byly inkubovány 72 hodin s různými koncentracemi L-asparaginázy ($5,12 \cdot 10^{-5} - 4$ IU/ml). Získané hodnoty byly normalizovány vůči kontrole a bylo z nich vypočítáno relativní IC50.

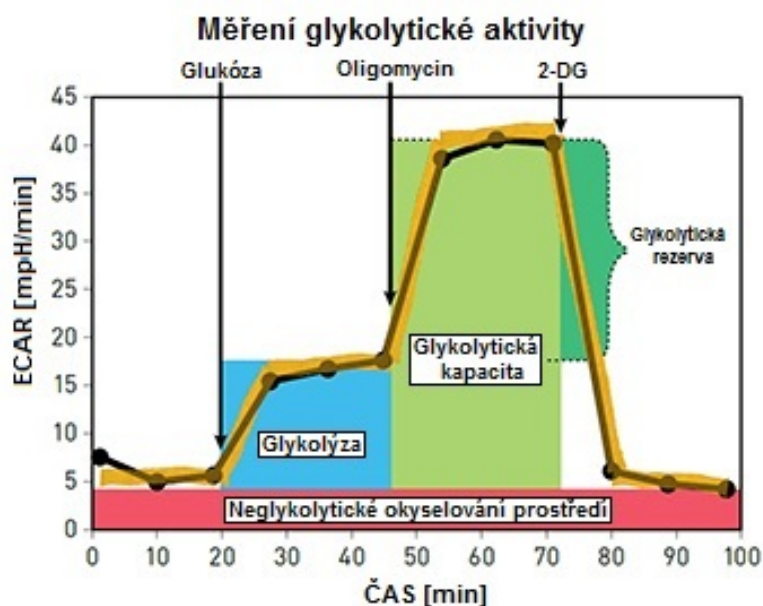
Z vyhodnocených dat je jasně vidět, že jednotlivé linie se v citlivosti na L-asparaginázu liší. Je tady znatelný trend, že buňky buněčných linií myeloidní

řady vykazují nižší citlivost vůči účinkům L-asparaginázy, zatímco buněčné linie lymfoidní řady jsou na přidání L-asparaginázy mnohem senzitivnější.

4.2 Energetický profil buněk

4.2.1 Glykolytická aktivita buněk

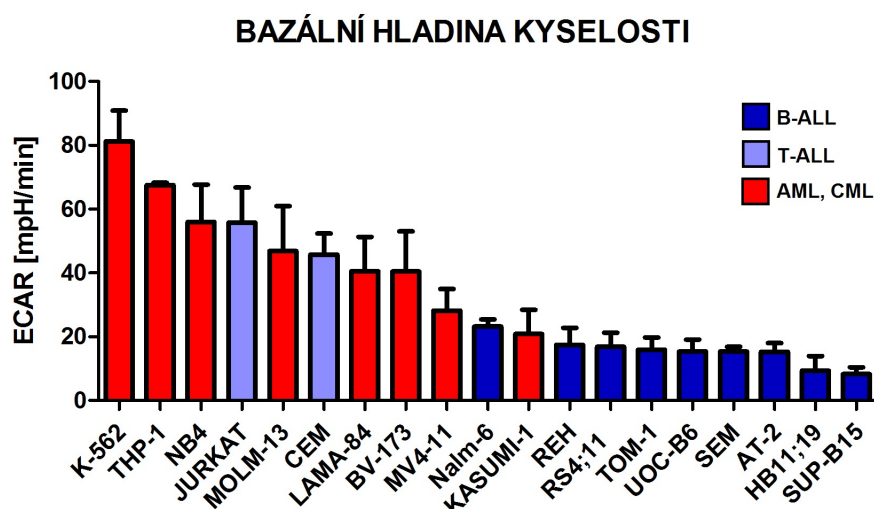
Glykolýza je jedním z možných zdrojů energie v buňce. K monitorování glykolytické aktivity v buňkách byl využit přístroj Seahorse Bioanalyzer (viz. 3.3 Energetický profil buněk, str. 20). Tento stroj měří změnu pH v reálném čase (ECAR – extracellular acidification rate) pomocí fluorescenčních sond v mikroprostředí nad monovrstvou buněk (obrázek 4.2, str. 28). Tato změna pH vzniká díky produkci laktátu, který je konečným produktem Warburgova efektu, a tak přímo odpovídá aktivitě glykolýzy v buňce. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v programu Wave.



Obrázek 4.2: Měření glykolytické aktivity pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer

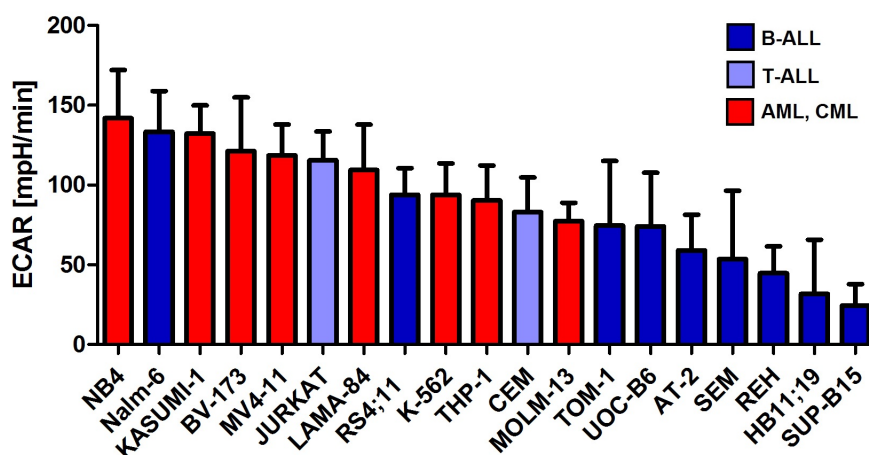
Nejprve byla změřena bazální kyselost buněk v médiu bez jakýchkoli substrátů (obrázek 4.3, str. 29). Dále byla do média přidána glukóza o výsledné koncentraci 10 mM. Tím byla změřena aktivita glykolýzy při dostatku substrátů v médiu (obrázek 4.4, str. 30). Následujícím přídatkem byl 1 μ M oligomycin, který inhibuje mitochondriální respiraci, a tak buňka využívá výlučně glykolýzu při tvorbě energie. Naměřená hodnota ECAR tedy odpo-

vídala maximální možné aktivitě glykolýzy v buňce (obrázek 4.5, str. 30). Na závěr byla do média přidána 100mM 2-deoxy-D-glukóza (2-DG), která způsobila kompletní inhibici glykolýzy. Hodnota ECAR získaná po tomto přídatku byla odečtena od všech naměřených dat jako nespecifický zdroj protonů, tedy změny pH. Posledním získaným parametrem je glykolytická rezerva, jenž tvoří rozdíl mezi maximální kapacitou a aktivitou glykolýzy při dostatku substrátu v médiu (obrázek 4.6, str. 31). Při experimentu bylo vždy použito 300 000 buněk v jednom vzorku. Pro každé stádium glykolytické aktivity byly naměřeny tři hodnoty postupně v čase za sebou. Měření bylo provedeno v nezávislém biologickém triplikátu a vždy v technickém tetraplikátu. Výsledné hodnoty pro daná stádia byla zprůměrována a vynesena do grafu.



Obrázek 4.3: Bazální hladina kyselosti v médiu bez substrátů
 U jednotlivých buněčných linií byla změřena bazální hladina kyselosti v médiu bez jakýchkoli substrátů pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota ECAR, která je změnou pH v reálném čase. v tomto případě tato změna odpovídá nespecifickému okyselení prostředí buňkami. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

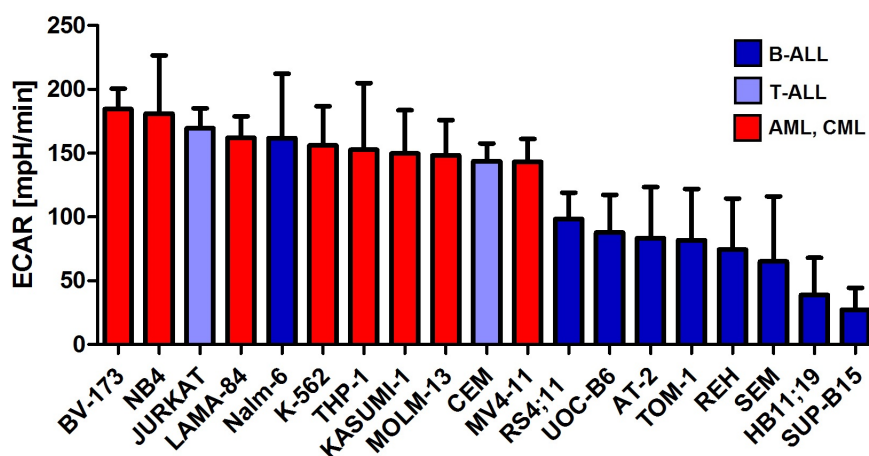
GLYKOLÝZA



Obrázek 4.4: Hladina glykolytické aktivity buněk v médiu s dostatkem substrátů

U jednotlivých buněčných linií byla změřena hladina glykolytické aktivity v médiu s dostatkem substrátů (10mM glukóza) pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota ECAR, která je změnou pH v reálném čase. v tomto případě tato změna odpovídá glykolytické aktivitě buněk. Hodnoty grafu byly získány tak, že od naměřených hodnot byla odečtena hodnota ECAR po přidání 2-DG, čímž bylo vyloučeno nespecifické okyselení prostředí. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

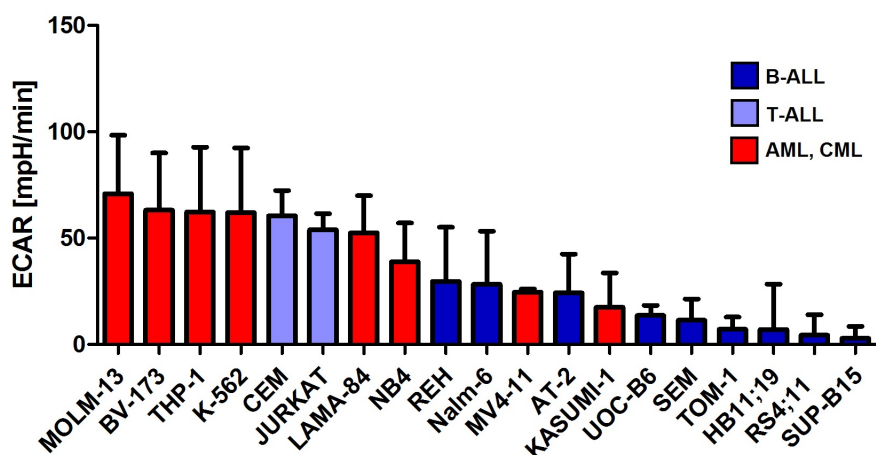
GLYKOLYTICKÁ KAPACITA



Obrázek 4.5: Maximální glykolytická aktivita buněk po inhibici mitochondriální respirace

U jednotlivých buněčných linií byla změřena hladina glykolytické aktivity po inhibici mitochondriální respirace (1 μ M oligomycin) pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota ECAR, která je změnou pH v reálném čase. v tomto případě tato změna odpovídá maximální glykolytické aktivitě buněk. Hodnoty grafu byly získány tak, že od naměřených hodnot byla odečtena hodnota ECAR po přidání 2-DG, čímž bylo vyloučeno nespecifické okyselení prostředí. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

GLYKOLYTICKÁ REZERVA

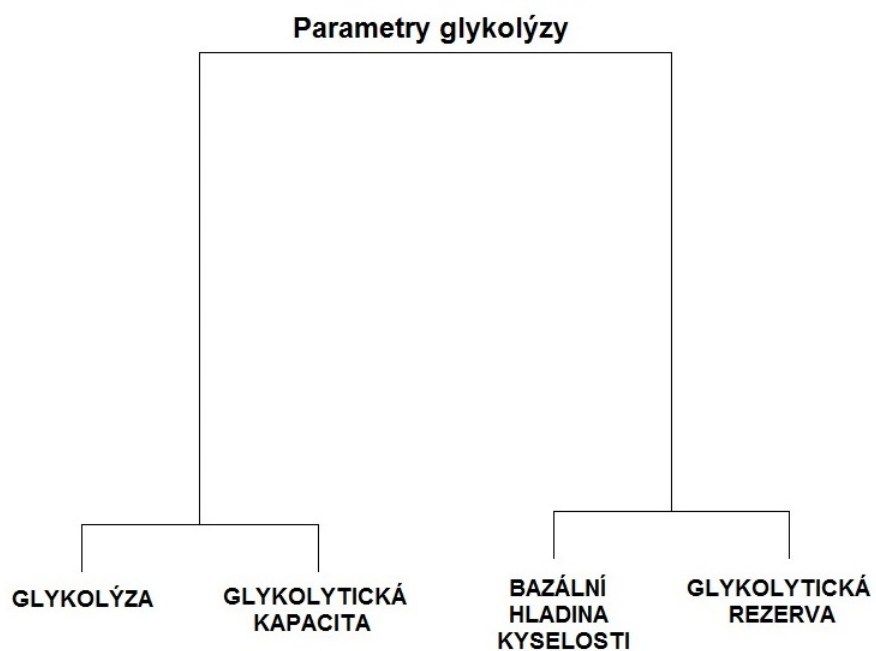


Obrázek 4.6: Glykolytická rezerva buněk

U jednotlivých buněčných linií byla změněna hladina glykolytické aktivity po inhibici mitochondriální respirace ($1\mu\text{M}$ oligomycin) a po přidání 10mM glukózy pomocí přístroje Seahorse Bioanalyser a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota ECAR, která je změnou pH v reálném čase. v tomto případě tato změna odpovídá glykolytické rezervě buněk. Hodnoty grafu byly získány jako rozdíl hodnot maximální glykolytické kapacity a hodnot glykolýzy v médiu s dostatkem substrátu. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

4.2.1.1 Klastrování u glykolytických procesů

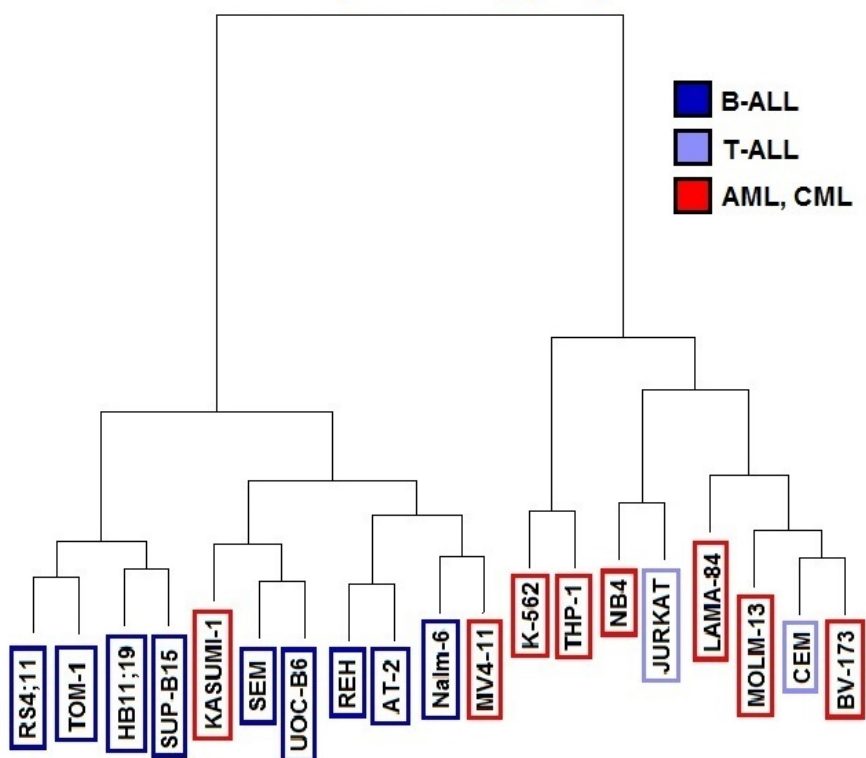
Analýza klastrování, která k sobě seskupuje procesy nebo vzorky na základě podobnosti, byla provedena ve statistickém programu R. Předmětem zájmu byly vztahy mezi jednotlivými stádii glykolytické aktivity, určené pomocí Pearsonovy vzdálenosti/Complete linkage. Pomocí metody Euklidovské vzdálenosti/Complete linkage jsme dále určovali, které buněčné linie k sobě budou klastrovat na základě jednotlivých glykolytických stádií a také na základě celkové glykolytické aktivity.



Obrázek 4.7: Klastrování glykolytických procesů mezi sebou

Tato analýza k sobě přiřadila bazální hladinu kyselosti s glykolytickou rezervou buněk a ve druhé skupině byla seskupena glykolýza a glykolytická kapacita buněk (obrázek 4.7, str. 32). Na základě tohoto rozdělení byly dále klastrovány buněčné linie.

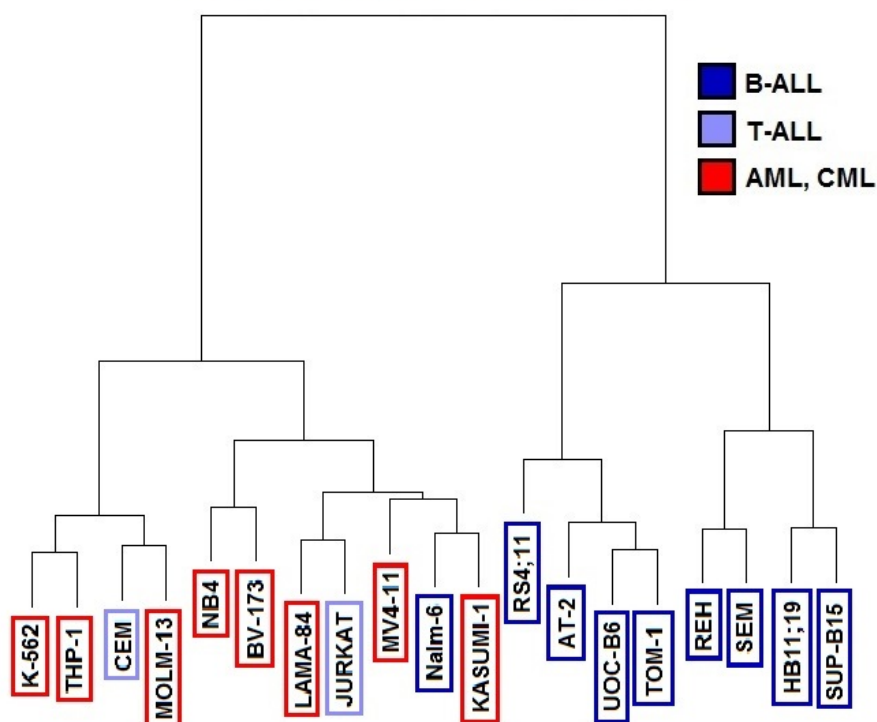
Bazální hladina kyselosti a glykolytická rezerva



Obrázek 4.8: Klastrování buněčných linií podle bazální hladiny kyselosti a glykolytické rezervy

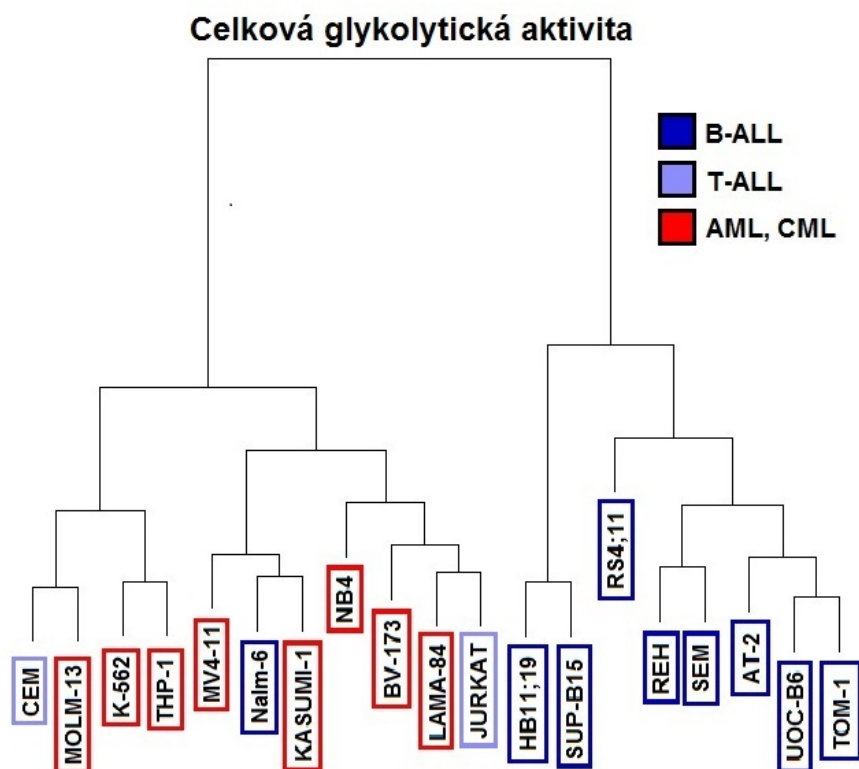
Na základě bazální hladiny kyselosti a glykolytické rezervy se linie rozdělily do dvou hlavních skupin (obrázek 4.8, str. 33). Jedna se skládala z B-lymfoidních leukemických linií a v druhé skupině byly myeloidní leukemické linie a T-ALL linie. Výjimkou byly myeloidní linie KASUMI-1 a MV4-11, které se nacházely ve skupině s B-ALL buněčnými liniemi.

Glykolýza a glykolytická kapacita



Obrázek 4.9: Klastrování buněčných linií podle glykolýzy a maximální glykolytické aktivity

Na základě glykolýzy a maximální glykolytické aktivity se linie rozdělily také do dvou hlavních skupin (obrázek 4.9, str. 34. Jedna se skládala pouze z B-lymfoidních leukemických linií a v druhé skupině byly myeloidní leukemické linie a T-ALL linie. Výjimku tvořila B-ALL linie Nalm-6, která klastrovala s liniemi myeloidní řady.

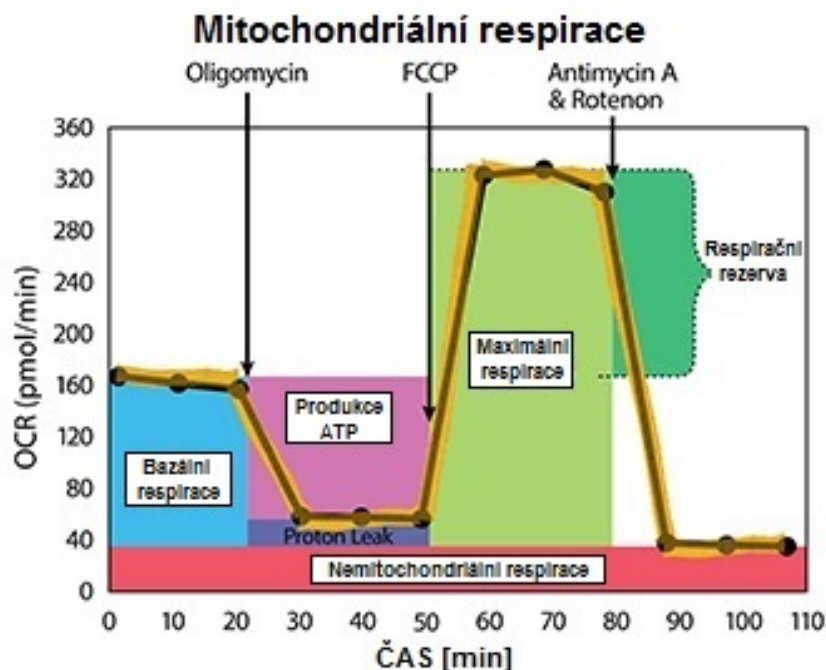


Obrázek 4.10: Klastrování buněčných linií podle všech glykolytických parametrů

Na základě celkové glykolytické aktivity se linie rozdělily do dvou hlavních skupin (obrázek 4.10, str. 35). Jedna se skládala pouze z B-lymfoidních leukemických linií a v druhé skupině byli myeloidní leukemické linie a T-ALL linie. Výjimku tvořila B-ALL linie Nalm-6, která klastrovala s liniemi myeloidní řady.

4.2.2 Mitochondriální respirace

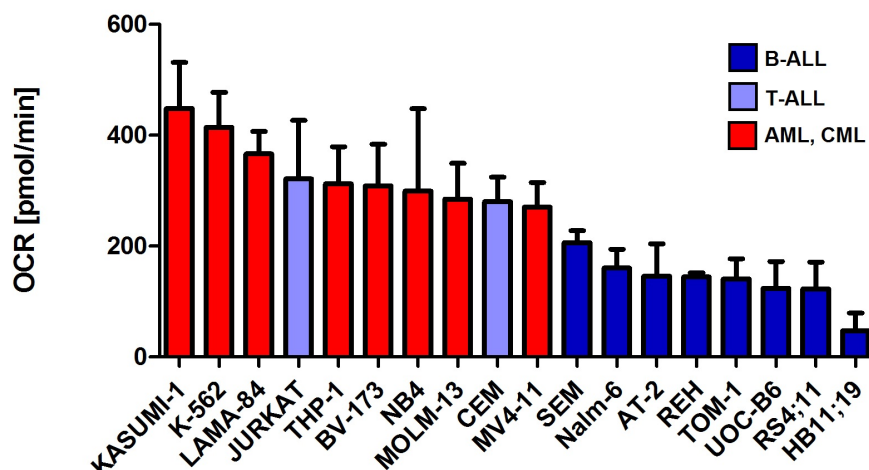
Mitochondriální respirace je dalším z možných zdrojů energie v buňce. K získání informací o aktivitě oxidativní fosforylace (OXPHOS) v buňkách byl využit přístroj Seahorse Bioanalyzer (viz. 3.3 Energetický profil buněk, str. 20). Tento přístroj měří změnu koncentrace kyslíku v reálném čase (OCR – oxygen rate consumption) pomocí fluorescenčních sond v mikroprostředí nad monovrstvou buněk (obrázek 4.11, str. 36). Tato změna přímo odpovídá aktivitě OXPHOS v buňce. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v programu Wave.



Obrázek 4.11: Měření mitochondriální respirace pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzér

Nejprve byla změřena hladina bazální respirace buněk v médiu s dostatkem substrátů (2mM glutamin, 5 mM glukóza, 10mM pyruvát) (obrázek 4.12, str. 37). Dále byl do média přidán 2 μ M oligomycin a tím inhibována mitochondriální ATPáza. Po tomto přidavku se určila spotřeba na produkci ATP (obrázek 4.13, str. 37). Následujícím přidavkem byla rozpráhující reagentie karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon (FCCP), rušící membránový potenciál mitochondrií. Titrací FCCP bylo dosaženo maximální respirace u buněk (obrázek 4.14, str. 38). Na závěr byl do média přidán 1 μ M rotenon a antimycin a o koncentraci 1 μ g/ml. Došlo tak ke kompletní inhibici mitochondriální respirace a hodnota OCR získaná po tomto přidavku byla odečtena od všech naměřených hodnot jako nespecifická spotřeba kyslíku. Posledním získaným parametrem je mitochondriální rezerva, jež tvoří rozdíl mezi maximální a basální respirací (obrázek 4.15, str. 38). Při experimentu bylo vždy použito 300 000 buněk v jednom vzorku. Pro každé stádium mitochondriální respirace byly naměřeny tři hodnoty postupně v čase za sebou. Měření bylo provedeno v nezávislém biologickém triplikátu a vždy v technickém tetraplikátu. Výsledné hodnoty pro daná stádía byly zprůměrovány a vyneseny do grafu.

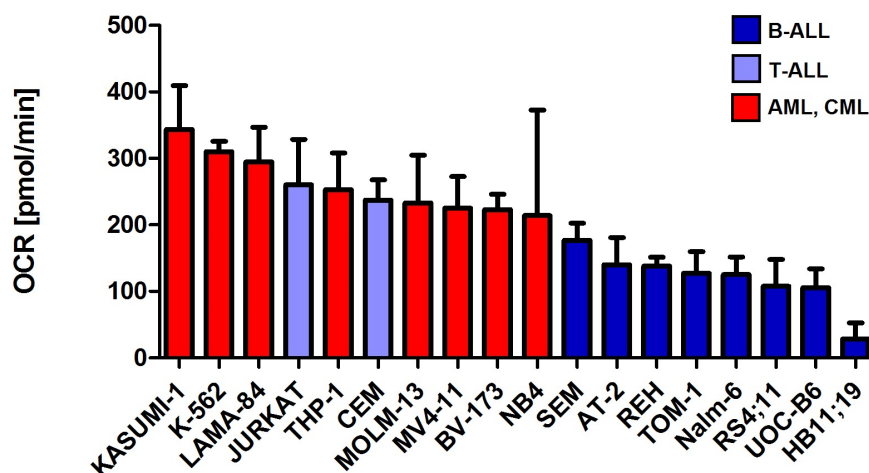
BAZÁLNÍ RESPIRACE



Obrázek 4.12: Bazální respirace buněk

U jednotlivých buněčných linií byla změřena hladina bazální respirace v médiu s dostatkem substrátů (2mM glutamin, 5 mM glukóza, 10mM pyruvát) pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota OCR, která značí spotřebu kyslíku. Hodnoty grafu byly získány tak, že od naměřených údajů byly odečteny hodnoty nespecifické spotřeby kyslíku, tedy po přidavku rotenonu (1- μ M) a antimycinu a (1 μ g/ml). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

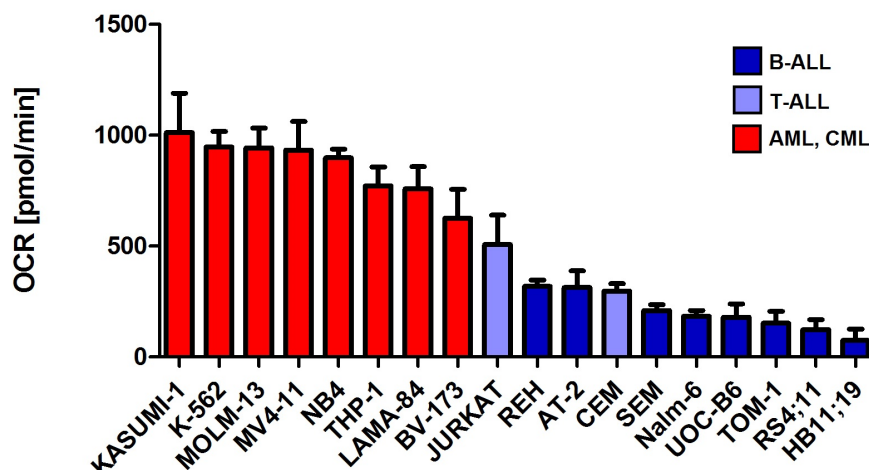
PRODUKCE ATP



Obrázek 4.13: Produkce ATP u buněk

U jednotlivých buněčných linií byla změřena spotřeba kyslíku odpovídající potřebě pro produkci ATP pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota OCR, která značí spotřebu kyslíku. Hodnoty grafu byly získány tak, že od údajů naměřených při bazální respiraci byly odečteny hodnoty získané po přidavku oligomycinu (2 μ M), který je inhibítozem mitochondriální ATPázy. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

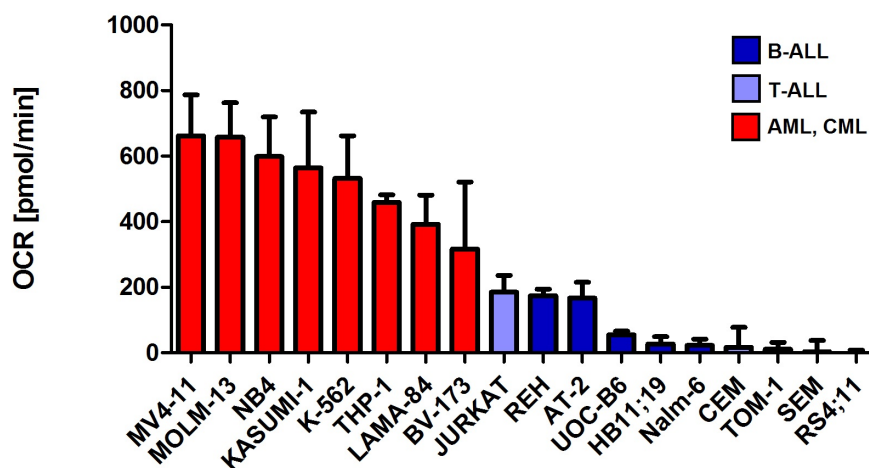
MAXIMÁLNÍ RESPIRACE



Obrázek 4.14: Maximální respirace buněk

U jednotlivých buněčných linií byla změřena maximální respirace buněk pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota OCR, která značí spotřebu kyslíku. OCR bylo měřeno po přidavku FCCP, které je rozpřahovačem membránového potenciálu mitochondrií. Pro každou buněčnou linii byla vytitrována koncentrace FCCP, při níž respirace dosáhla maxima. Hodnoty grafu byly získány tak, že od naměřených údajů byly odečteny hodnoty nespecifické spotřeby kyslíku, tedy po přidavku rotenonu ($1\text{-}\mu\text{M}$) a antimycinu a ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$). Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

RESPIRAČNÍ REZERVA



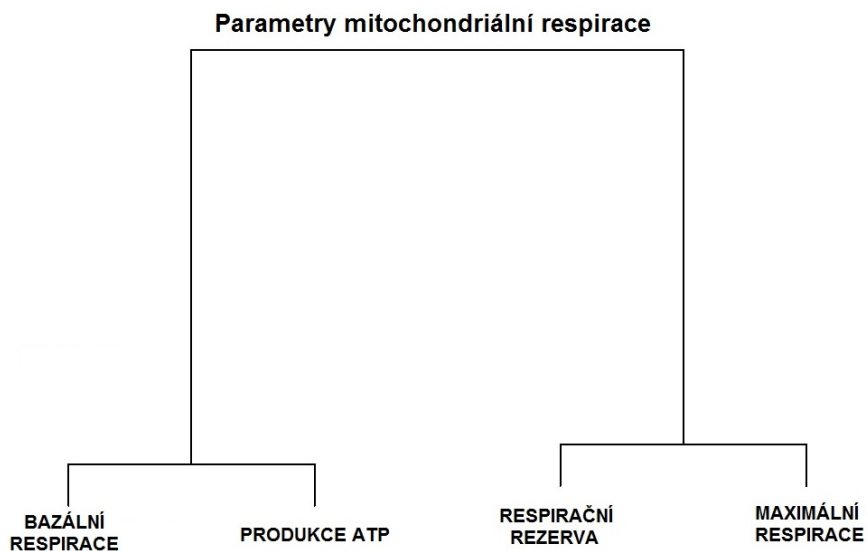
Obrázek 4.15: Respirační rezerva buněk

U jednotlivých buněčných linií byla změřena respirační rezerva pomocí přístroje Seahorse Bioanalyzer a vyhodnocena v programu Wave. Na ose y je vynesena hodnota OCR, která značí spotřebu kyslíku. Hodnoty grafu byly získány tak, že od údajů naměřených při maximální respiraci byly odečteny hodnoty bazální respirace. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

4.2.2.1 Klastrování u mitochondriální respirace

Analýza klastrování, která k sobě seskupuje procesy nebo vzorky na základě podobnosti, byla provedena ve statistickém programu R. Předmětem zájmu byly vztahy mezi jednotlivými stádii mitochondriální respirace, určené po-

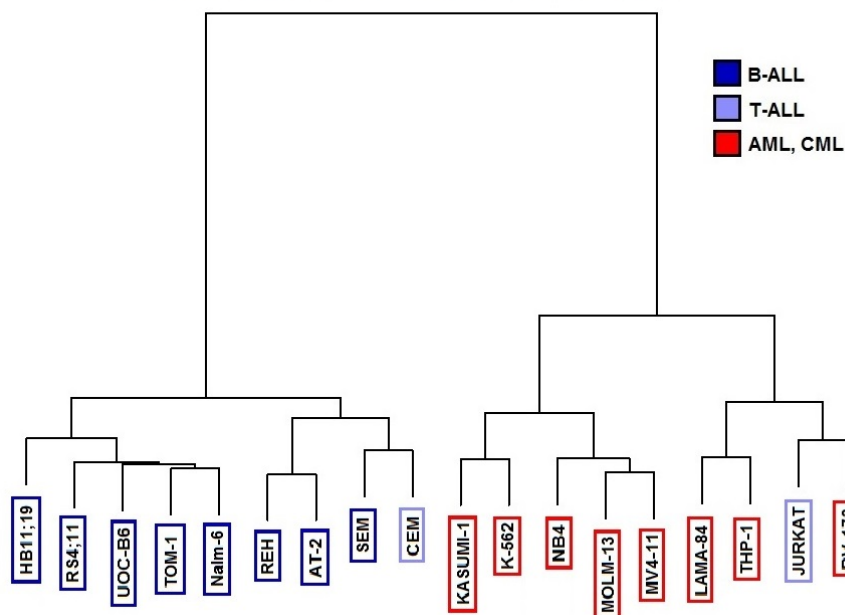
mocí Pearsonovy vzdálenosti/Complete linkage. Pomocí metody Euklidovské vzdálenosti/Complete linkage byla dále snaha určit, které buněčné linie k sobě budou klastrovat na základě celkové aktivity mitochondriální respirace.



Obrázek 4.16: Klastrování jednotlivých parametrů mitochondriální respirace

Tato analýza k sobě přiřadila bazální respiraci s produkcí ATP a ve druhé skupině byla seskupena maximální respirace a respirační rezerva buněk (obrázek 4.16, str. 39).

Celková aktivita mitochondriální respirace



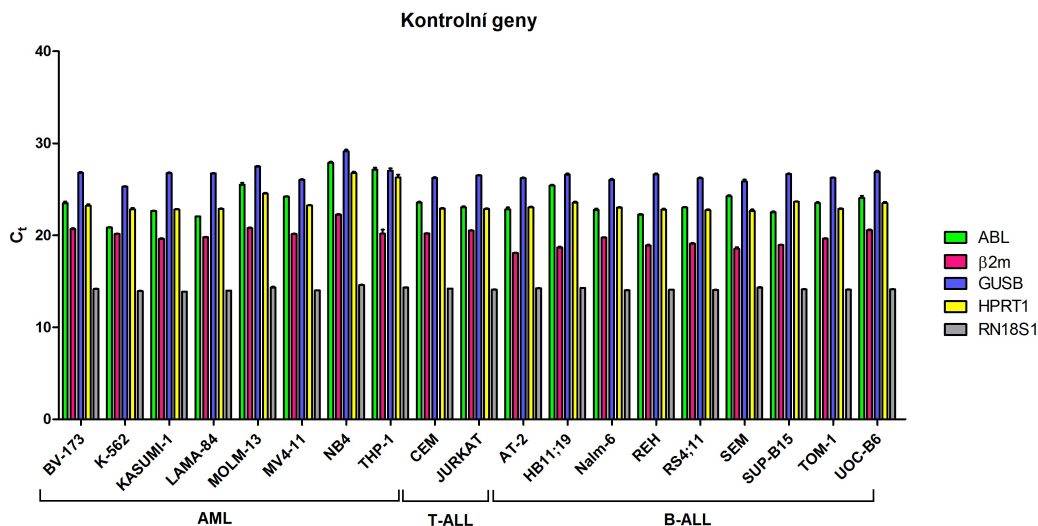
Obrázek 4.17: Klastrování buněčných linií na základě všech naměřených mitochondriálních parametrů

Na základě celkové aktivity mitochondriální respirace se linie rozdělily do dvou hlavních skupin (obrázek 4.17, str. 40). Jedna se skládala z B-lymfocitních leukemických linií a v druhé skupině byli myeloidní leukemické linie, přičemž T-ALL buněčné linie se nacházejí každá v jiném klastru.

4.3 Exprese genů

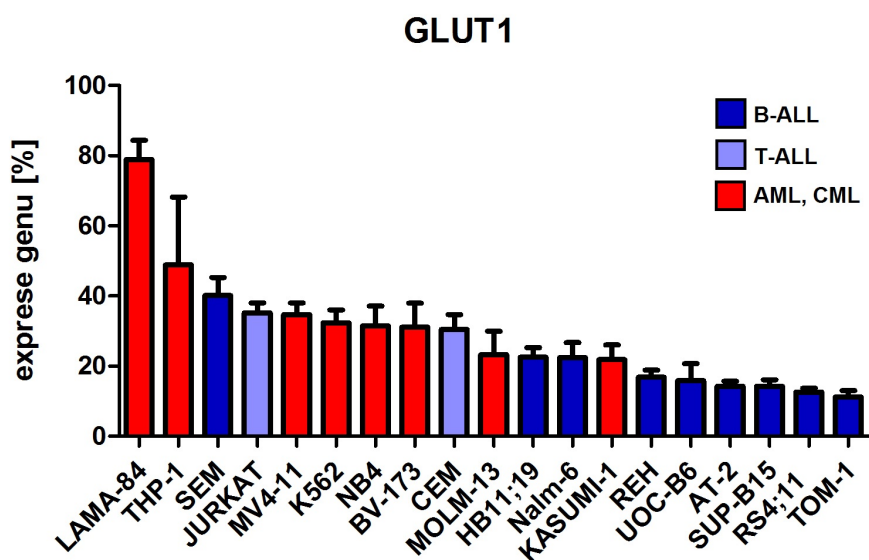
4.3.1 Exprese genů glykolytické dráhy

U všech 19 zkoumaných buněčných linií byla zjišťována hladina exprese vybraných glykolytických genů na mRNA úrovni. K této analýze byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) (viz. 3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), str. 21). Exprese jednotlivých genů byla při výpočtech vztažena k hladině kontrolních genů, kterými byly vybrané provozní (housekeeping) geny (obrázek 4.18, str. 41). Došlo tak k normalizaci rozdílného množství cDNA vložené do reakce: C_t (sledovaný gen) - C_t (kontrolní gen) $\sim \Delta C_t$. Z průměru daných hodnot byla získána v procentech relativní exprese sledovaného genu jako $(1/2^{\Delta C_t}) \times 100$.



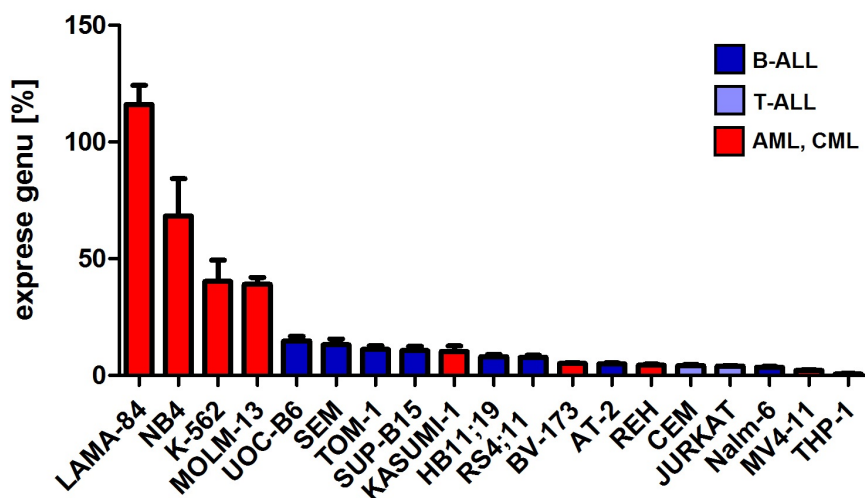
Obrázek 4.18: Expres kontrolních genů u všech buněčných linií
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y jsou vyneseny hodnoty C_t a na ose x jsou jednotlivé buněčné linie. Při normalizaci sledovaných genů byl použit průměr všech těchto naměřených hodnot. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

První sledovanou skupinou glykolytických genů byly geny pro membránové přenašeče jednoduchých sacharidů. Glukózový transporter 1 (GLUT1) (obrázek 4.19, str. 41) a glukózový transporter 3 (GLUT3) (obrázek 4.20, str. 42) zprostředkovávají přenos glukózy do buňky, zatímco glukózový transporter 5 (GLUT5) (obrázek 4.21, str. 42) je fruktózovým přenašečem.



Obrázek 4.19: Expres glykolytického genu GLUT1
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

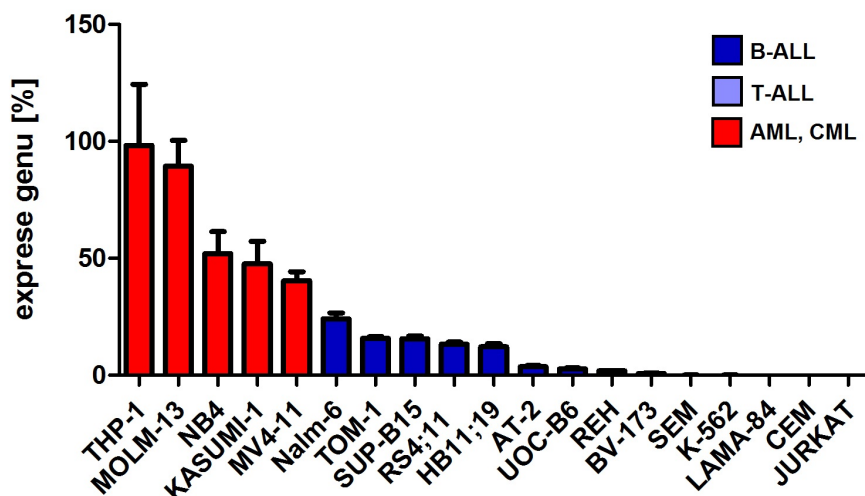
GLUT3



Obrázek 4.20: Expresse glykolytického genu GLUT3

Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

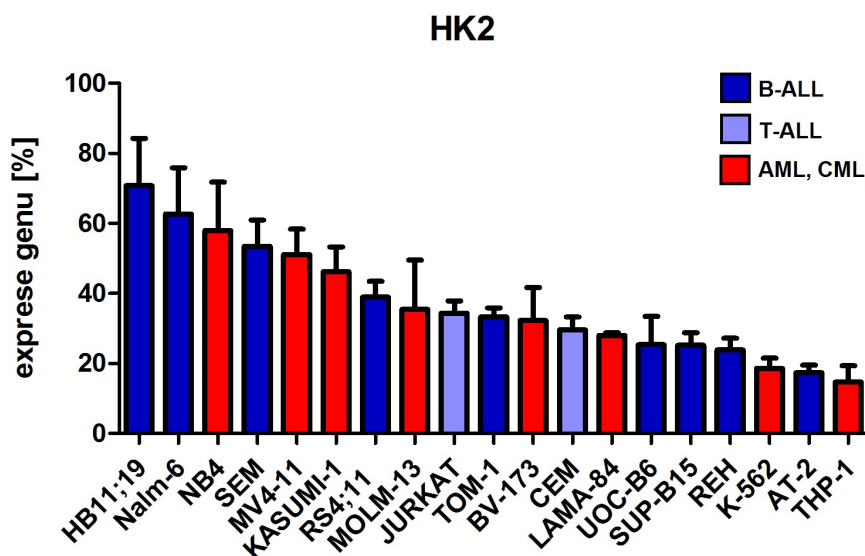
GLUT5



Obrázek 4.21: Expresse glykolytického genu GLUT5

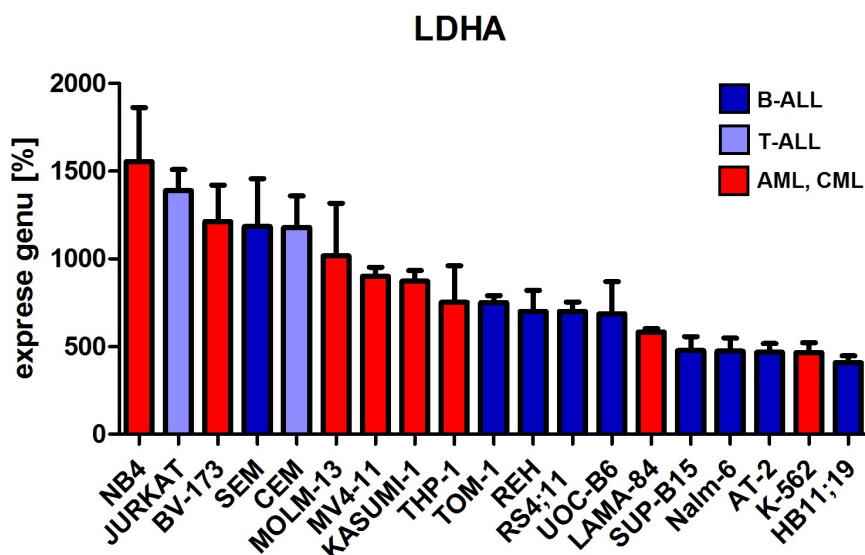
Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

Dalším zkoumaným glykolytickým genem byl gen pro hexokinázu 2 (HK2), která je zodpovědná za fosforylaci glukózy na glukózu-6-fosfát (obrázek 4.22, str. 43).

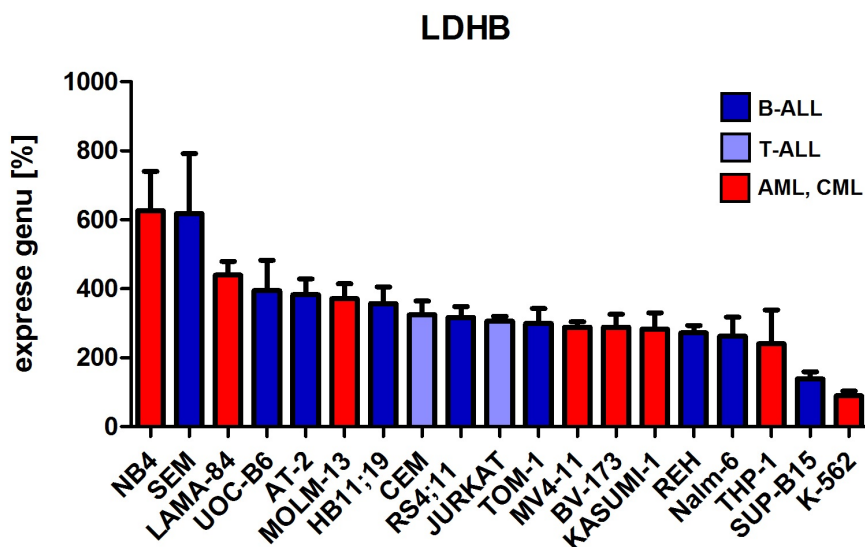


Obrázek 4.22: Expresa glykolytického genu HK2
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

Sledovány byly také geny pro laktát dehydrogenázu a (LDHA) (obrázek 4.23, str. 43) a laktát dehydrogenázu B (LDHB) (obrázek 4.24, str. 44). Produkty těchto genů jsou zodpovědné za přeměnu pyruvátu na laktát.

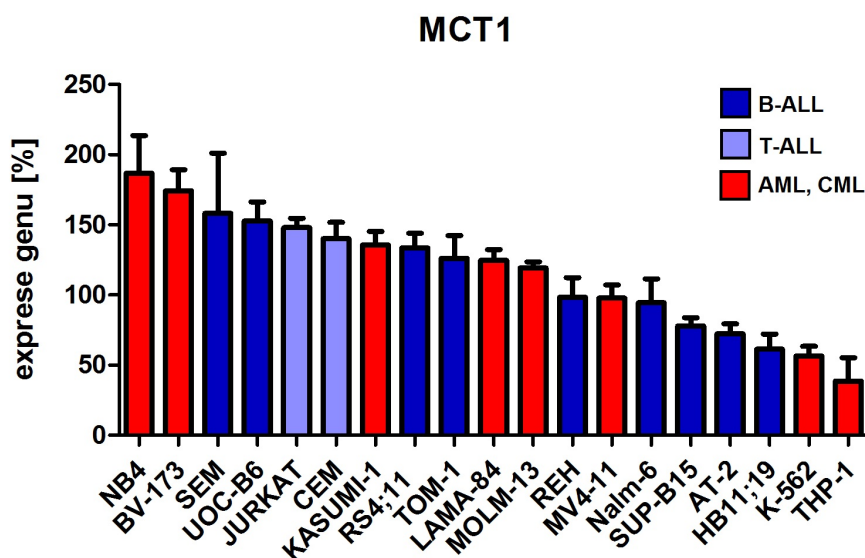


Obrázek 4.23: Expresa glykolytického genu LDHA
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

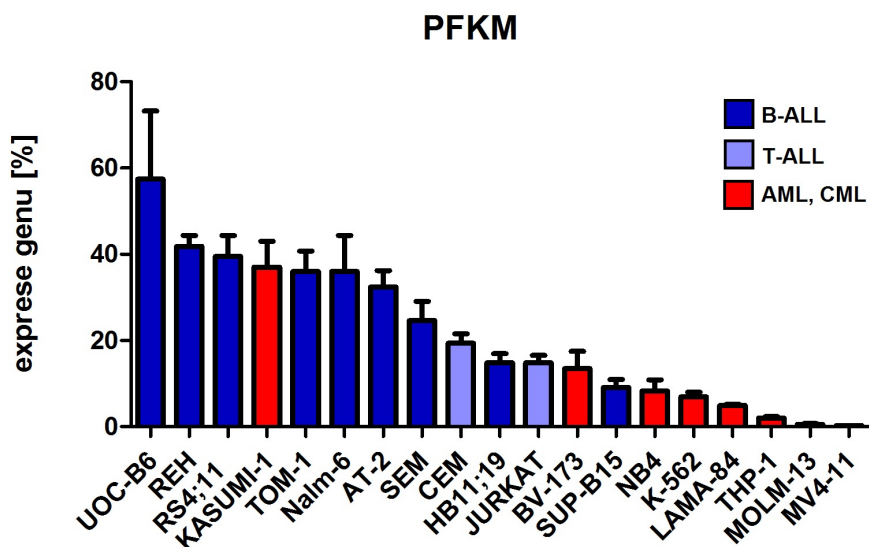


Obrázek 4.24: Expresse glykolytického genu LDHB
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

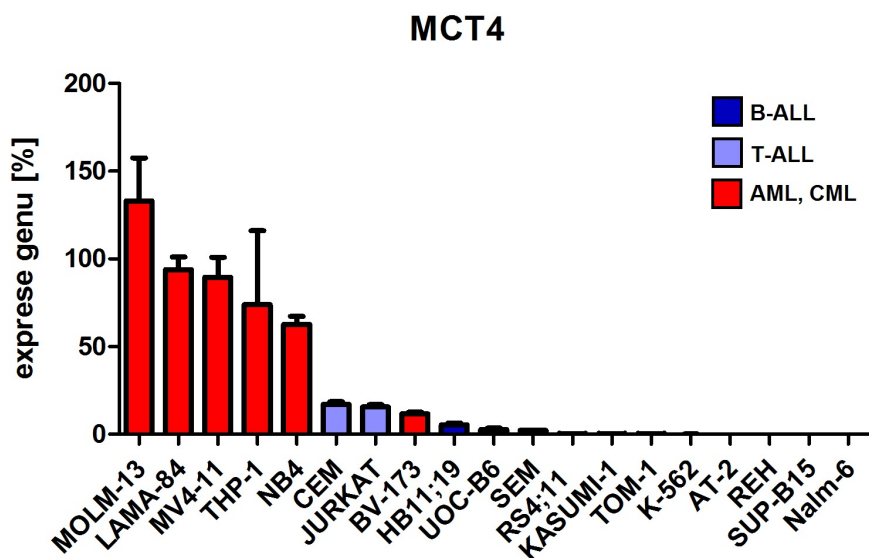
Dále byly podrobeny analýze i geny pro monokarboxylový transporter 1 (MCT1) (obrázek 4.25, str. 44) a monokarboxylový transporter 4 (MCT4) (obrázek 4.26, str. 45). Tyto transportery zajišťují membránový přenos molekul s jednou karboxylovou skupinou, např. laktát a pyruvát.



Obrázek 4.25: Expresse glykolytického genu MCT1
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.



Obrázek 4.27: Expresse glykolytického genu PFKM
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

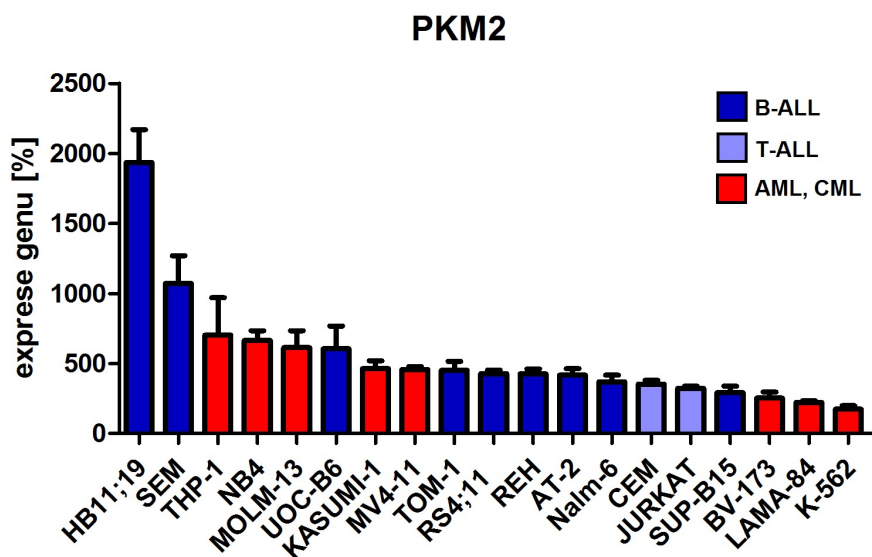


Obrázek 4.26: Expresse glykolytického genu MCT4
 Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

Zkoumán byl také gen pro 6-fosfofruktokinázu M (PFKM) (obrázek 4.27, str. 45). Tento enzym zajišťuje přenos druhé fosfátové skupiny na fruktózu-6-fosfát za vzniku fruktózy-1,6-bisfosfát.

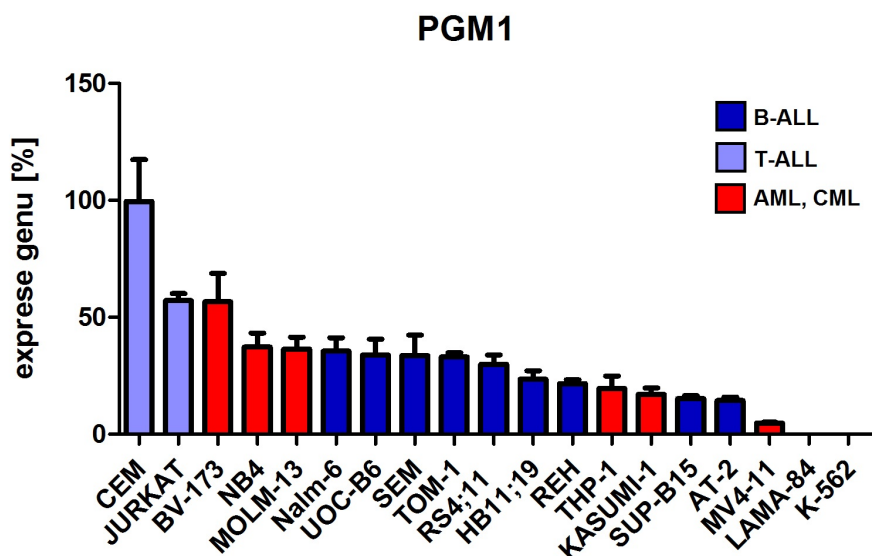
Dalším sledovaným genem, jehož produkt se účastní procesu glykolýzy byl PKM2 (obrázek 4.28, str. 46). Tento gen kóduje pyruvát kinázu typu M2, která zabezpečuje poslední krok glykolýzy, tedy defosforylaci fosfoenol-

pyruvátu na pyruvát.



Obrázek 4.28: Expresse glykolytického genu PKM2
Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

Posledním zkoumaným byl gen pro fosfoglukomutázu 1 (PGM1) (obrázek 4.29, str. 46). Tento enzym umožňuje obousměrnou konverzi mezi glukózou-1-fosfát a glukózou-6-fosfát.

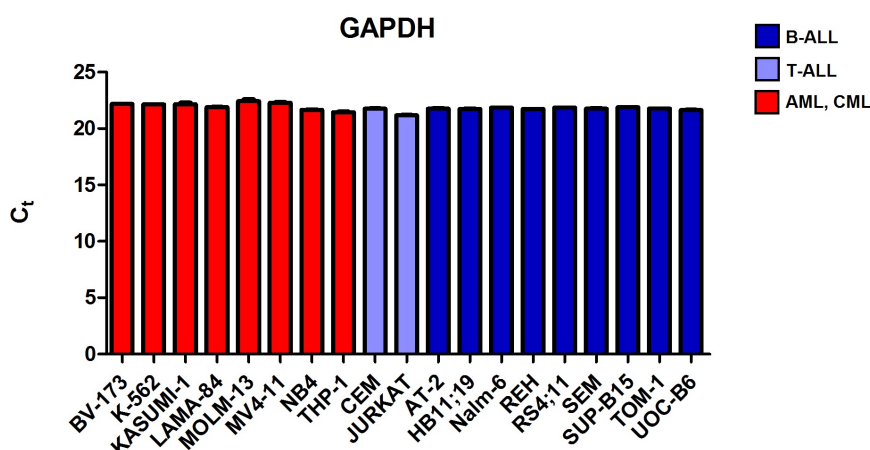


Obrázek 4.29: Expresse glykolytického genu PGM1
Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

4.3.2 Mitochondriální geny

Metabolické nastavení buněk, především oxidativní fosforylace, by mohlo souviset s množstvím mitochondriálního retikula v buňkách. Jako ukazatele množství mitochondrií v buňkách byly zvoleny geny nacházející se pouze v mitochondriích. U všech 19 zkoumaných buněčných linií byla zjišťována hladina exprese těchto mitochondriálně kódovaných genů na DNA úrovni. K této analýze byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) (viz. 3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), str. 21.)

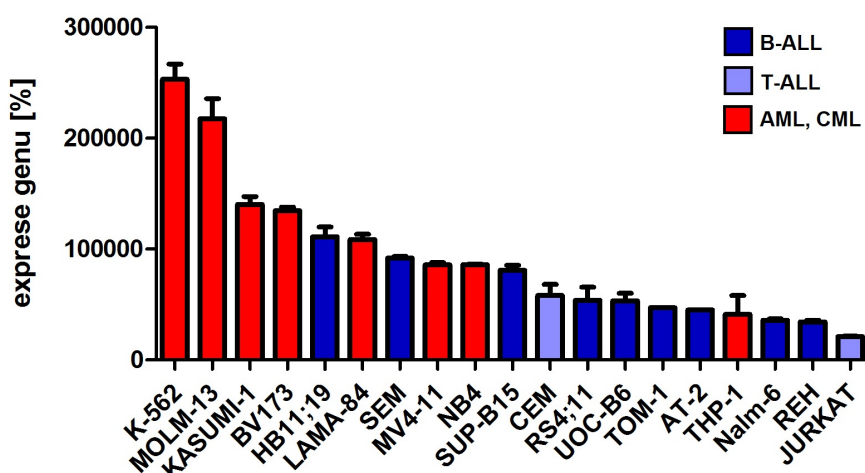
Expresе jednotlivých genů byla při výpočtech vztažena k hladině kontrolního genu, kterým byl provozní (housekeeping) gen pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) (obrázek 4.30, str. 47). Došlo tak k normalizaci rozdílného množství cDNA vložené do reakce: C_t (sledovaný gen) - C_t (kontrolní gen) $\sim \Delta C_t$. Z průměru daných hodnot byla získána v procentech relativní exprese sledovaného genu jako $(1/2^{\Delta C_t}) \times 100$.



Obrázek 4.30: Expresе kontrolního genu GAPDH u všech buněčných linií. Pro detekci exprese genu byla využita metoda qPCR. Na ose y jsou vyneseny hodnoty C_t a na ose x jsou jednotlivé buněčné linie. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

Studovanými geny byly 16S a D-loop. Gen 16S kóduje podjednotku prokaryotického ribozomu, je však konzervován i u eukaryot a nachází se právě v mitochondriálním genomu (obrázek 4.31, str. 48). D-loop je oblast typická pro mitochondriální genom, obsahující několik konzervovaných sekvencí a variabilních částí (obrázek 4.32, str. 48). Její funkce není zcela známá, ale zřejmě se účastní organizace mitochondriální DNA.

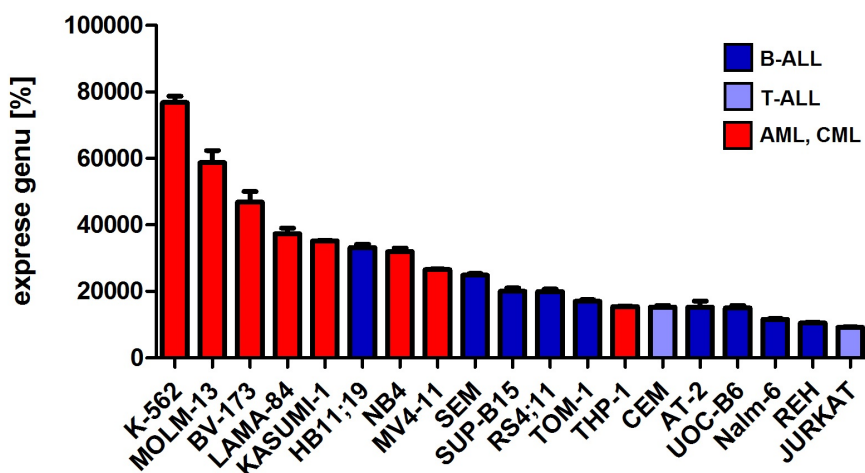
16S



Obrázek 4.31: Expresa mitochondriálně kódovaného genu 16S

Pro detekci exprese genu byla využita metoda qPCR. Na ose y je normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit kontrolní gen GAPDH. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

D-loop



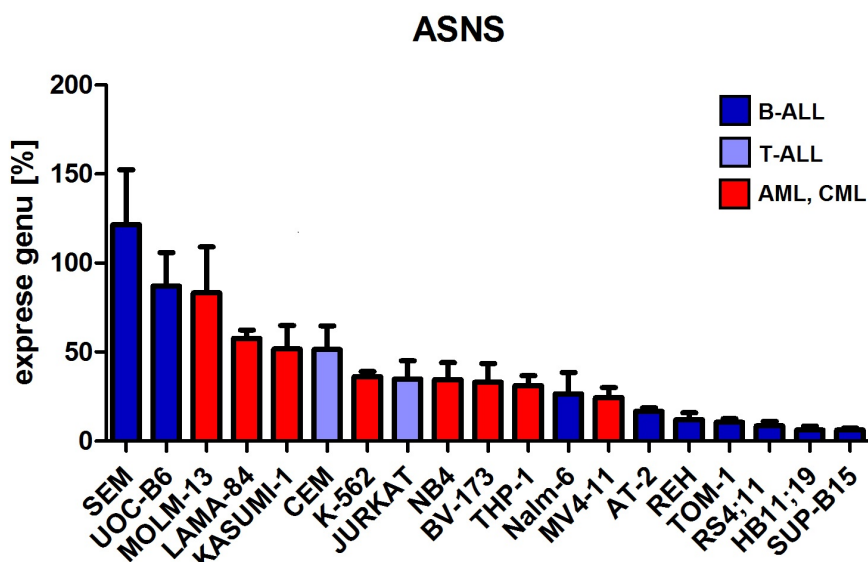
Obrázek 4.32: Expresa mitochondriálně kódované oblasti D-loop

Pro detekci exprese genu byla využita metoda qPCR. Na ose y je normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit kontrolní gen GAPDH. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

4.3.3 Asparagin syntetáza

U všech 19 zkoumaných buněčných linií byla zjišťována také hladina exprese asparagin syntetázy na mRNA úrovni (obrázek 4.33, str. 49). Tento enzym je zodpovědný za endogenní syntézu asparaginu. K této analýze byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR) (viz. 3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), str. 21.)

Expresa jednotlivých genů byla při výpočtech vztažena k hladině kontrolních genů, kterými byly vybrané provozní (housekeeping) geny (obrázek 4.18, str. 41). Došlo tak k normalizaci rozdílného množství cDNA vložené do reakce: C_t (sledovaný gen) - C_t (kontrolní gen) $\sim \Delta C_t$. Z průměru daných hodnot byla získána v procentech relativní exprese sledovaného genu jako $(1/2^{\Delta ct}) \times 100$.



Obrázek 4.33: Expresa asparagin syntetázy
Pro detekci exprese genu byla využita metoda qRT-PCR. Na ose y je zobrazena normalizovaná exprese genu v procentech, na ose x jednotlivé buněčné linie. K normalizaci byl použit průměr kontrolních genů. Výsledek je průměrem ze tří nezávislých biologických měření.

4.4 Velikost buněk

Předpokladem bylo, že velikost buněk by mohla souviset s jejich vnitřním metabolickým nastavením.

Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru (viz. 3.2 Velikost buněk, str.19). Pro tuto analýzu nebylo třeba buňky značit fluorescenčně, pouze byla naměřena hodnota EV (electronic volume). Při průchodu buňky přístrojem je vytlačen objem elektrolytu, který přesně odpovídá objemu buňky. Tato změna vyvolá napěťový puls, jehož intenzita odpovídá objemu vytlačené kapaliny, tedy i objemu buňky. Tato analýza ukazuje, že všechny AML buněčné linie jsou větší než ALL buněčné linie (tabulka 4.1, str. 50). Hodnoty byly vypočteny jako průměrná hodnota EV po ohraničení živé populace na základě EV a side-scatter light (SSC). SSC je světlo zachycené bočními čočkami cytometru. Vzniká rozptýlením na povrchu buňky díky jejím nerovnostem

a granularitě. Jeho vysoká hladina je charakteristická pro buňky v apoptóze. Získané hodnoty byly dále využity při korelačních testech (viz. 4.5 Korelační testy , str. 49).

Tabulka 4.1: Hodnota EV, odpovídající velikosti buňky, změřená pomocí průtokové cytometrie

Název buněčné linie	Druh	EV
THP-1	AML	344
BV-173	CML	315
K-562	CML	320
JURKAT	T-ALL	302
KASUMI-1	AML	296
NB4	AML	295
LAMA-84	CML	263
CEM	T-ALL	240
MOLM-13	AML	221
MV4-11	AML	217
Nalm-6	B-ALL	173
HB11;19	B-ALL	168
UOC-B6	B-ALL	157
SEM	B-ALL	139
SUP-B15	B-ALL	136
RS4;11	B-ALL	131
TOM-1	B-ALL	127
REH	B-ALL	121
AT-2	B-ALL	119

4.5 Korelační testy

Všechna získaná data byla mezi sebou vzájemně korelována v programu Statview pomocí Pearsonova korelačního koeficientu momentu součinu.

Korelace byla nalezena u těchto dat:

1) Metabolické procesy vs. IC50 (ASNase)

- IC50 (ASNase) vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,614$, $p = 0,003$
- IC50 (ASNase) vs. glykolýza: $r = 0,645$, $p = 0,003$

- IC50 (ASNase) vs. glykolytická kapacita: $r = 0,680$, $p = 0,001$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická rezerva: $r = 0,790$, $p < 0,001$

2) Metabolické procesy vs. EV

- EV vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,621$, $p = 0,0201$
- EV vs. glykolytická kapacita: $r = 0,832$, $p = 0,0018$
- EV vs. bazální respirace: $r = 0,763$, $p = 0,0002$
- EV vs. produkce ATP: $r = 0,693$, $p = 0,0014$
- EV vs. maximální respirace: $r = 0,645$, $p = 0,0041$
- EV vs. respirační rezerva: $r = 0,531$, $p = 0,0267$

3) Glykolýza vs. mitochondriální respirace

- Bazální hladina kyselosti vs. bazální respirace: $r = 0,716$, $p = 0,0008$
- Glykolýza vs. produkce ATP: $r = 0,578$, $p = 0,0136$
- Glykolytická kapacita vs. maximální respirace: $r = 0,683$, $p = 0,0018$

4) Glykolýza vs. glykolytické geny

- Bazální hladina glykolýzy vs. GLUT1: $r = 0,634$, $p = 0,0072$
- Bazální hladina glykolýzy vs. MCT-4: $r = 0,532$, $p = 0,0239$
- Bazální hladina glykolýzy vs. PFKM: $r = -0,568$, $p = 0,016$
- Glykolytická kapacita vs. GLUT1: $r = 0,532$, $p = 0,0241$
- Glykolytická rezerva vs. GLUT1: $r = 0,605$, $p = 0,0102$
- Glykolytická rezerva vs. MCT-4: $r = 0,507$, $p = 0,0316$
- Glykolytická rezerva vs. PFKM: $r = -0,540$, $p = 0,0219$

5) Mitochondriální respirace vs. mitochondriální geny

- Bazální respirace vs. D-loop: $r = 0,502$, $p = 0,0392$
- Maximální respirace vs. D-loop: $r = 0,595$, $p = 0,0104$

- Respirační rezerva vs. D-loop: $r = 0,58$, $p = 0,0132$
- Bazální respirace vs. 16S: $r = 0,490$, $p = 0,045$
- Maximální respirace vs. 16S: $r = 0,581$, $p = 0,0131$
- Respirační rezerva vs. 16S: $r = 0,566$, $p = 0,0164$

Předcházející data byla korelována v rámci celého souboru buněčných linií. Když byla data korelována odděleně, podle typu buněk, objevila se zajímavá skutečnost. Korelace mezi glykolytickou aktivitou a citlivostí na L-asparaginázu (IC50) byla objevena u ALL buněčných linií:

- IC50 (ASNase) vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,704$, $p = 0,02$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická kapacita: $r = 0,693$, $p = 0,024$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická rezerva: $r = 0,648$, $p = 0,04$.

Zatímco u AML buněčných linií se korelace nacházela pouze mezi IC50 (ASNase) a glykolytickou rezervou: $r = 0,775$, $p = 0,0211$.

5. Diskuze

Terapie akutní lymfoblastické leukemie u dětí v současnosti dosahuje velmi dobrých výsledků. Avšak relaps onemocnění stále ještě postihuje 15 – 20 % pacientů (Pui et al., 2006). Jedním z možných důvodů relapsu je nedostatečný účinek použitých chemoterapeutik nebo vznik rezistence na tato cytostatika. Co za tímto neúspěchem stojí, proč leukemické buňky dokáží odolávat účinkům léčiv, není stále objasněno. Důležitou složkou chemoterapie u dětské ALL je L-asparagináza a právě rezistence vůči ní často komplikuje průběh léčby (Pieters et al., 1997). Příčiny vzniku rezistence zatím nebyly dostatečně popsány. Rozdílné metabolické nároky u nádorových buněk byly popsány již v roce 1924, kdy O. H. Warburg postuloval teorii tzv. Warburgova efektu (Warburg, 1956). Pracovní skupina laboratoře molekulární genetiky, Kliniky dětské hematologie a onkologie 2.LF UK prokázala, že L-asparagináza v leukemických buňkách způsobuje rozsáhlé metabolické změny. Leukemické buňky v přítomnosti L-asparaginázy zapínají apoptotické dráhy jako je inhibice proteinové translace, inhibice de novo DNA syntézy a také dráhy přežívání jako je zvýšená oxidace mastných kyselin a zvýšená maximální kapacita respirace a respirační rezerva (Heřmanová et al., 2015). Záměrem této práce bylo ověřit zda bazální metabolické nastavení leukemických buněk může ovlivňovat účinnost L-asparaginázy a tím pádem předurčit jejich citlivost k terapii. Předkládaná práce se zabývá studiem metabolického nastavení leukemických buněk. Konkrétně procesy mitochondriální respirace a glykolýzy, u níž byla sledována také exprese vybraných genů jako potenciálních markerů glykolytické aktivity. Dále byla pozornost zaměřena na detekci obsahu mitochondriálního retikula v buňkách, genovou expresi asparagin syntetázy a velikost buněk. Všechna získaná data byla vzájemně porovnávána a hledala se souvislost jak mezi nimi, tak jejich vztah s citlivostí buněk vůči L-asparagináze.

Experimenty byly prováděny na 19 modelových leukemických buněčných liniích, které reprezentovaly genotypicky i fenotypicky různé druhy leukemie. 11 buněčných linií představovalo akutní lymfoblastickou leukemii, z toho 9 zástupců bylo z B-prekurzorové řady (B-ALL) a 2 byli z T-prekurzorové řady (T-ALL). Zbýlých 8 buněčných linií reprezentovalo myeloidní leukemii v akutní (AML) nebo chronické (CML) fázi.

5.1 Cytotoxický test s použitím MTS

Prvním krokem bylo stanovení citlivosti buněk vůči L-asparagináze. K tomu byl využit cytotoxický test s použitím MTS reagentie. Ze získaných dat byla vypočtena hodnota relativní IC₅₀ (obrázek 4.1, str. 27). Jednotlivé buněčné linie se v odpovědi na L-asparaginázu značně liší. Myeloidní buněčné linie vykazují menší citlivost, zatímco lymfoidní buňky jsou spíše citlivější. Tento závěr však neplatí doslovně pro všechny modelové linie, projevuje se spíše jako trend v tomto směru s drobnými odchylkami. IC₅₀ jako ukazatel citlivosti buněk vůči L-asparagináze byl využit při korelačních testech k porovnání se všemi získanými hodnotami.

5.2 Energetický profil buněk

Ke studiu glykolýzy a mitochondriální respirace u leukemických buněk byl použit přístroj Seahorse Bioanalyzer. Získaná data byla podrobena klastrovačí analýze a korelačním testům.

5.2.1 Glykolytická aktivita buněk

Při studiu glykolýzy v buňkách je první získanou hodnotou bazální hladina kyselosti v médiu bez substrátů (obrázek 4.3, str. 29). Ta vypovídá o nescifickém okyselování prostředí buňkou. Již tento první parametr jasně ukazuje rozdílné metabolické nastavení myeloidních a B-ALL buněk. Zajímavým faktem je, že T-ALL se projevují stejně jako myeloidní linie vyšší kyselostí.

Dalším získaným parametrem je aktivita glykolýzy při dostatku substrátu v médiu (10 mM glukóza) (obrázek 4.4, str. 30). Tento údaj říká, do jaké míry buňky využívají glykolýzu, pokud se nachází v ideálním prostředí. Zde zůstává podobné rozdělení jako při prvním měření, ovšem objevují se zde 2 B-ALL buněčné linie, které jsou velmi glykolytické. Jsou jimi Nalm-6 a RS4;11. Maximální glykolytické kapacity je dosaženo po přidání oligomycinu (1 μ M). Dochází tak k inhibici mitochondriální respirace a zdrojem energie pro buňky se stává právě glykolýza, jejíž hladina díky tomu vystoupá na maximum. i u tohoto výsledku (obrázek 4.5, str. 30) dochází k rozdělení buněk na B-ALL a myeloidní s T-ALL buňkami. Jedinou výjimku tvoří linie Nalm-6, která se oproti ostatním B-ALL buňkám vyznačuje velmi vysokou glykolytickou kapacitou.

Glykolytická rezerva označuje rozdíl mezi maximální glykolytickou aktivitou buňky po inhibici mitochondriální respirace a glykolytickou aktivitou v médiu s dostatečným množstvím substrátu (10mM glukóza). Vyjadřuje tedy, do jaké míry buňka využívá glykolýzu jako zdroj energie za normálních (ideálních) podmínek. Čím menší hodnota je, tím více se využití glykolýzy blíží k jejímu maximu. Ze získaných výsledků (obrázek 4.6, str. 31) je vidět, že glykolytická kapacita B-ALL buněk je mnohem nižší než u myeloidních a T-ALL buněčných linií. Výjimku tvoří buněčné linie MV4-11 a KASUMI-1, které se velikostí své glykolytické rezervy řadí spíše mezi B-ALL buňky. Linie MV4-11 se vyznačuje bifenotypickými znaky a tato charakteristika by mohla sloužit jako jedno z vysvětlení podobnosti metabolického nastavení buněk s lymfoidními liniemi. v případě KASUMI-1 linie by mohla hrát roli přítomnost fúzního genu AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1). Nepublikovaná data naznačují, že tento fúzní gen bude specificky ovlivňovat expresi genů glykolytické dráhy.

Klastrovací analýza byla provedena nejprve mezi jednotlivými procesy glykolýzy (obrázek 4.7, str. 32). Procesy, které byly spolu seskupeny jsou bazální hladina kyselosti a glykolytická rezerva, dále pak glykolýza a glykolytická kapacita. Na základě těchto výsledků byla provedena klastrovací analýza buněčných linií pomocí dat bazální hladiny kyselosti a glykolytické rezervy (obrázek 4.8, str. 33). B-ALL buňky se vyskytují v jedné skupině, zatímco buňky myeloidní a T-ALL ve skupině druhé. Výjimku tvoří AML modelové linie MV4-11 a KASUMI-1, které se nacházejí v B-ALL klastru. U druhého klastrovacího diagramu byla použita data glykolýzy a glykolytické kapacity (obrázek 4.9, str. 34). Opět jsou buňky rozděleny ve dvou základních skupinách. Tou první jsou myeloidní a T-ALL buňky a v té druhé jsou B-ALL buněčné linie. Jedinou výjimku tvoří buněčná linie Nalm-6, která díky své vysoké hladině glykolýzy i glykolytické kapacity byla zařazena do myeloidní a T-ALL skupiny. Poslední klastrovací analýza proběhla na základě všech glykolytických dat. (obrázek 4.10, str. 35) i v tomto případě jsou buňky ve dvou hlavních skupinách podle progenitorů, ze kterých pochází, přičemž T-ALL buňky jsou opět ve skupině s myeloidními buňkami. Jedinou výjimkou je buněčná linie Nalm-6, která je v jiném klastru než zbývající B-ALL buněčné linie. Z klastrovací analýzy vyplývá, že glykolytická aktivita je liniově specifická a všeobecně buňky myeloidní řady mají vyšší hladinu glykolýzy než buňky lymfoidní.

Otázkou bylo, zda bude glykolytická aktivita asociována s citlivostí buněk

na L-asparaginázu. Detekována byla pozitivní korelace mezi glykolytickou aktivitou a citlivostí na L-asparaginázu. Čím je vyšší glykolýza, tím je vyšší rezistence na L-asparaginázu, která je reprezentována vyšší hodnotou IC50 a platí to i naopak. Hodnoty glykolytických procesů v rámci celého souboru buněk korelují s citlivostí na L-asparaginázu:

- IC50 (ASNase) vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,614$, $p = 0,003$
- IC50 (ASNase) vs. glykolýza: $r = 0,645$, $p = 0,003$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická kapacita: $r = 0,680$, $p = 0,001$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická rezerva: $r = 0,790$, $p < 0,001$

Když byla data korelována odděleně, podle typu buněk (myeloidní x lymfoidní), byla korelace mezi glykolytickou aktivitou a citlivostí na L-asparaginázu (IC50) detekována významněji u ALL buněčných linií:

- IC50 (ASNase) vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,704$, $p = 0,02$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická kapacita: $r = 0,693$, $p = 0,024$
- IC50 (ASNase) vs. glykolytická rezerva: $r = 0,648$, $p = 0,04$.

Zatímco u myeloidních buněčných linií byla korelace potvrzena pouze mezi IC50 (ASNase) a glykolytickou rezervou: $r = 0,775$, $p = 0,0211$.

V rámci celého souboru buněk byla objevena také korelace s EV (viz. 5.3 Velikost buněk, str.) a některými geny glykolytické dráhy (viz. 5.2.1.1 Exprese genů glykolytické dráhy, str.)

5.2.1.1 Exprese genů glykolytické dráhy

Expresse vybraných genů byla sledována na mRNA úrovni pomocí qRT-PCR. Získaná data byla korelována s citlivostí na L-asparaginázu (IC50) a glykolytickými procesy. Zjištěná korelace se nácházela pouze u těchto hodnot:

- GLUT1 vs. bazální hladina glykolýzy: $r = 0,634$, $p = 0,0072$
vs. glykolytická kapacita: $r = 0,532$ $p = 0,0241$
vs. glykolytická rezerva: $r = 0,605$, $p = 0,0102$
- MCT-4 vs. bazální hladina glykolýzy: $r = 0,532$, $p = 0,0239$
vs. glykolytická rezerva: $r = 0,507$ $p = 0,0316$

- PFKM vs. bazální hladina glykolýzy: $r = -0,568$, $p = 0,016$
vs. glykolytická rezerva: $r = -0,540$, $p = 0,0219$

Z testovaných genů nejvíce korelovala citlivost na L-asparaginázu s expresí genu pro LDHA.

5.2.2 Mitochondriální respirace buněk

Měření mitochondriální respirace bylo prováděno v médiu s dostatkem substrátů (2mM glutamin, 5 mM glukóza, 10mM pyruvát). Nejprve byla zjištěna bazální respirace buněk (obrázek 4.12, str. 37). Poté došlo k inhibici mitochondriální ATPázy přidáním oligomycinu (2- μ M). U buněk došlo ke zjištění spotřeby kyslíku potřebné k produkci ATP, rozdílem OCR před a po přidání (obrázek 4.13, str. 37). Dále byla změřena maximální respirace (obrázek 4.14, str. 38). Té bylo dosaženo po titraci FCCP, přičemž konečná koncentrace se u každé buněčné linie lišila. Na závěr byla ještě vypočítána respirační rezerva jako rozdíl mezi maximální a bazální respirací (obrázek 4.15, str. 38).

U všech těchto procesů byly buněčné linie seřazeny za sebou ve dvou skupinách. První skupinu, s vyšší aktivitou, tvořily myeloidní modelové linie. Druhou skupinu, s nižšími hodnotami, vytvořily B-ALL buňky. T-ALL buněčné linie byly v případě bazální respirace a produkce ATP mezi myeloidními buňkami, zatímco jejich výsledky maximální respirace a respirační rezervy korespondovaly spíše s druhou skupinou, tedy B-ALL buněčnými liniemi.

Výsledky klastrovací analýzy respiračních parametrů ukazují, že společně klastruje bazální respirace s produkcí ATP a dále maximální respirace s respirační rezervou. Klastrování buněčných linií na základě všech respiračních procesů dělí buňky na 2 základní skupiny – myeloidní a lymfoidní, přičemž T-ALL buněčné linie se nacházejí každá v jiném klastru. Leukemická linie CEM je přiřazena k B-ALL buňkám, zatímco buňky JURKAT jsou zařazeny do myeloidní skupiny.

Korelace byla objevena mezi mitochondriální respirací a glykolytickými procesy:

- Bazální hladina kyselosti vs. bazální respirace: $r = 0,716$, $p = 0,0008$
- Glykolýza vs. produkce ATP: $r = 0,578$ $p = 0,0136$
- Glykolytická kapacita vs. maximální respirace: $r = 0,683$ $p = 0,0018$

Data mitochondriální respirace nekorelují s IC50.

5.2.2.1 Mitochondriální geny

Další zkoumanou vlastností buněk bylo množství mitochondriálního retikula. K tomu byla využita exprese mitochondriálně kódovaných genů pomocí qPCR na DNA úrovni.

Výsledné hodnoty ukazují trend vyšších hodnot u AML buněčných linií. Bylo objeveno několik korelací mezi expresí mitochondriálních genů a procesy mitochondriální respirace:

- Bazální respirace vs. D-loop $r = 0,502$, $p = 0,0392$
- Maximální respirace vs. D-loop: $r = 0,595$, $p = 0,0104$
- Respirační rezerva vs. D-loop: $r = 0,58$, $p = 0,0132$
- Bazální respirace vs. 16S: $r = 0,490$, $p = 0,045$
- Maximální respirace vs. 16S: $r = 0,581$, $p = 0,0131$
- Respirační rezerva vs. 16S: $r = 0,566$, $p = 0,0164$

5.3 Velikost buněk

Jednou ze zkoumaných vlastností byla také velikost buněk. Hodnoty získané průtokovou cytometrií ukazují, že AML buněčné linie jsou větší než B-ALL buněčné linie. Zatímco T-ALL modelové linie se svou velikostí řadí mezi AML linie. Tato odlišná velikost by mohla souviset s rozdílnými metabolickými nároky a nastavením buněk.

Výsledky statistické analýzy to potvrzují, protože signifikantní korelace byly vypočteny u:

- EV vs. bazální hladina kyselosti: $r = 0,621$, $p = 0,0201$
- EV vs. glykolytická kapacita: $r = 0,832$, $p = 0,0018$
- EV vs. bazální respirace: $r = 0,763$, $p = 0,0002$
- EV vs. produkce ATP: $r = 0,693$, $p = 0,0014$
- EV vs. maximální respirace: $r = 0,645$, $p = 0,0041$
- EV vs. respirační rezerva: $r = 0,531$, $p = 0,0267$

Velikost buněk nekoreluje s IC50 (ASNase).

5.4 Asparagin syntetáza

Poslední oblastí zájmu byla exprese genu pro asparagin syntetázu. Tento enzym je antagonistou k L-asparagináze a je zodpovědný za endogenní syntézu asparaginu. Jeho exprese však s citlivostí na L-asparaginázu (IC50) nekoreluje.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala studiem bazálního metabolického nastavení leukemických buněk a jeho vazbou na citlivost vůči L-asparagináze.

Tato závislost byla studována na 19 modelových leukemických buněčných liniích, které reprezentovaly genotypicky i fenotypicky různé druhy leukemie. 11 buněčných linií představovalo akutní lymfoblastickou leukemii, z toho 9 zástupců bylo z B-prekurzorové řady (B-ALL) a 2 byli z T-prekurzorové řady (T-ALL). Zbýlých 8 buněčných linií reprezentovalo myeloidní leukemii v akutní (AML) nebo chronické (CML) fázi.

Pozornost byla zaměřena na mitochondriální respiraci a glykolýzu. Aktivity obou těchto procesů v buňkách byla podrobně sledována. Byla změřena i exprese vybraných glykolytických genů jako markerů glykolytické aktivity. Dále byl studován obsah mitochondriálního retikula v buňkách, exprese asparagin syntetázy a velikost buněk. Získané údaje byly mezi sebou vzájemně porovnávány a byla hledána vzájemná korelace dat a souvislost s rozdílnou citlivostí buněk na L-asparaginázu.

Bylo poukázáno na to, že metabolické nastavení leukemických buněk souvisí s jejich původem. Buňky myeloidní řady jsou mnohem více glykolytické i respiračně aktivní, což může souviset i s jejich větší velikostí oproti buňkám lymfoidní řady. Glykolýza a mitochondriální respirace spolu korelují. Dále byly odhaleny korelační vztahy mezi velikostí buněk a metabolickou aktivitou a také korelovala oxidativní fosforylace s počtem mitochondrií. Tím nejdůležitějším faktem bylo objevení signifikantní korelace mezi citlivostí buněk na L-asparaginázu a jejich glykolytickou aktivitou. Byly popsány také potenciální markery glykolytické aktivity, exprese genu GLUT1, MCT-4 a PFKM, které by mohli sloužit k detekci metabolického nastavení u patientských vzorků a obejít tak problém měření metabolických procesů spojený s nedostatkem materiálu.

Seznam použité literatury

- [1] 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.
- [2] AMYLON 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.
- [3] ARIËS I. M., HANSEN B. R., KOCH T., VAN DEN DUNGEN R., EVANS W. E., PIETERS R., DEN BOER M. L. : *The synergism of MCL1 and glycolysis on pediatric acute lymphoblastic leukemia cell survival and prednisolone resistance*. Haematologica 2013; 98(12): 1905-1911.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] BARGER J.F., PLAS D.R. : *Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis*. Endocrine-Related Cancer 2010; 17(4): 287-304.
- [7] 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.

- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] CORTES J.E., KANTARJIAN H.M. : *Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy.* Cancer 1995; 76(12): 2393-2417.
- [11] COUTURIER M. A, HUGUET F., CHEVALLIER P., SUAREZ F., THOMAS X., ESCOFFRE-BARBE M., VICTORIA CACHEUX V., PIGNON J. M., CAROLINE BONMATI C., SANHES L., BORIES P., DAGUINDAU E., DORVAUX V., REMAN O., FRAYFER J., ORVAIN C., LHÉRITIER V., IFRAH N., DOMBRET H., HUNAULT-BERGER¹⁸ M., TANGUY-SCHMIDT A. : *Cerebral venous thrombosis in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma during induction chemotherapy with L-asparaginase: The GRAALL experience.* American Journal of Hematology 2015; accepted manuscript DOI:10.1002/ajh.24130
- [12] DAVIDKASPERS GJL, ZWAAN CN. : *Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients.* Haematologica-the Hematology Journal 2007; 92: 1519-1532.
- [13] 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.
- [14] DE BERARDINIS 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.
- [15] ENVER T., GREAVES M. : *Loops, lineage and leukemia.* Cell 1998; 94(1): 9-12.

- [16] FONG CT, BRODEUR GM. : *Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis*. Cancer Genet Cytogenet 1987; 28: 55-76.
- [17] 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.
- [18] GREAVES M. : *Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia*. European Journal of Cancer 1999; 35(2): 173-185
- [19] HASKELL C.M., CANELLOS G.P. : *L-asparaginase resistance in human leukemia - asparagine synthetase*. Biochemical Pharmacology 1969; 18(10): 2578-2580.
- [20] HERST P. M., HOWMAN R. A., NEESON P. J., BERRIDGE M. V., RITCHIE D. S. : *The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome*. Journal of Leukocyte Biology 2011; 89(1): 51-55.
- [21] HEŘMANOVÁ I., ARRUBARRENA-ARISTORENA A., VALIŠ K., NŮSKOVÁ H., JORDA M. A., FIŠER K., FERNÁNDEZ-RUIZ S., KAVAN D., PECINOVÁ A., NISO-SANTANO M., ŽALIOVÁ M., NOVÁK P., HOUŠTĚK J., MRÁČEK T., KROEMER G., CARRACEDO A., TRKA J., STARKOVÁ J. : *Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells*. Leukemia 2015; accepted manuscript, DOI:10.1038/leu.2015.213
- [22] 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.
- [23] HOŘEJŠÍ V., BARTŮŇKOVÁ J., BRDIČKA T., ŠPÍŠEK R. : *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013, 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [24] HULLEMAN E., KAZEMIER K. M., HOLLEMAN A., VANDERWEELE D. J., RUDIN C. M., BROEKHUIS M. J. C., EVANS W. E., PIETERS R., DEN BOER M. L. : *Inhibition of glycolysis modulates prednisolone*

- resistance in acute lymphoblastic leukemia cells.* Blood 2009; 113(9): 2014-2021.
- [25] CHANG J.S. : *Parental smoking and childhood leukemia.* Methods In Molecular Biology 2009; 472: 103-137.
- [26] CHANG J.S., WIEMELS J.L., BUFFLER P.A. : *Allergies and childhood leukemia.* Blood Cells, Molecules and Diseases 2009; 42(2): 99-104.
- [27] CHESSELLS J.M. : *Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge.* British Journal of Haematology 1998; 102(2): 423-438.
- [28] 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.
- [29] KAELIN W.G., THOMPSON C.B. : *Cancer: clues from cell metabolism.* Nature 2010; 465(7298): 562-564
- [30] KERSEY J.H. : *Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia.* Blood 1997; 90(11): 4243-4251.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] LEVINE B., KLIONSKY D.J. : *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.* Developmental Cell. 2004; 6(4): 463- 477.
- [34] LIU T., KISHTON R. J., MACINTYRE A. N., GERRIETS V. A., XIANG H., LIU X., ABEL E. D., RIZZIERI D., LOCASALE J. W., RATHMELL J. C. : *Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis.* Cell Death an Disease 2014; 5(10): e1470.

- [35] MAYER, JIŘÍ A JAN STARÝ. : *Leukemie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 357 s., ISBN 80-7169-991-8.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] PINKEL D. : *Intravenous mercaptopurine: life begins at 40*. Journal of Clinical Oncology 1993; 11(9): 1826-1831
- [39] POPPE B, VAN LIMBERGEN H, VAN ROY N, VANDECRUYS E, DE PAEPE A, BENOIT Y. : *Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies*. Cancer Genetics and Cytogenetics 2001; 128: 39-42.
- [40] PUI C.H. : *Acute lymphoblastic leukemia in children*. Current Opinion In Oncology 2000; 12(1): 3-12.
- [41] PUI C.H., CAMPANA D. : *New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia 2000; 14(5): 783-785.
- [42] PUI C.H., EVANS W.E. : *Acute lymphoblastic leukemia*. The New England Journal of Medicine 1998; 339(9): 605-615.
- [43] PUI C.H., EVANS W.E. : *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. The New England Journal of Medicine 2006; 354: 166-178.
- [44] PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. : *Acute lymphoblastic leukemia*. New English Journal of Medicine: United States. 2004; pp 1535-1548.
- [45] PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. : *Acute lymphoblastic leukemia.(2004)*. New English Journal of Medicine:United States 2004; pp 1535-1548.
- [46] RACKER E. : *Bioenergetics and the problem of tumor growth*. American Scientist 1972; 60(1): 56-63.

- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] ROCHOWSKI A, OLSON SB, ALONZO TA, GERBING RB, LANGE BJ, ALTER BP (2012). : *Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML*. Pediatric Blood Cancer 2012; 59: 922-924.
- [50] RUBNITZ J.E., PUI C.H. : *Molecular diagnostics in the treatment of leukemia*. Current Opinion in Hematology 1999; 6(4): 229-235.
- [51] SAMUELS A. L., HENG J. Y., BEESLEY A. H., KEES U. R. : *Bioenergetic modulation overcomes glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia*. British Journal of Haematology 2014; 165(1): 57-66.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] STILLER CA (2004). : *Epidemiology and genetics of childhood cancer*. Oncogene 2004; 23: 6429-6444.
- [55] 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.

- [56] 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.
- [57] 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.
- [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] TRKA J., ŠRÁMKOVÁ L. : *Akutní lymfoblastická leukemie v dětském věku.* Postgraduální medicína 2004; 6(5): 496-500.
- [60] WALL A.M., GAJJAR A., LINK A., MAHMOUD H., PUI C.H., REL-LING M.V. : *Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia 2000; 14(2): 221-225.
- [61] WARBURG O. : *On respiratory impairment in cancer cells.* Science 1956; 124(3215): 269-270.
- [62] WARBURG O. : *On the origin of cancer cells.* Science 1956; 123(3191): 309-314.
- [63] 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.
- [64] WIEMELS J. : *Perspectives on the causes of childhood leukemia.* Chemico- Biological Interactions 2012; 196(3): 59-67.
- [65] WISE D.R., THOMPSON C.B. : *Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer.* Trends in Biochemical Sciences 2010; 35(8): 427-433.

- [66] YAMADA Y, INOUE R, FUKAO T, KANEKO H, ISOGAI K, FUKUDA S. : *Ataxia telangiectasia associated with B-cell lymphoma: The effect of a half-dose of the drugs administered according to the acute lymphoblastic leukemia standard risk protocol*. Pediatric Hematology and Oncology 1998 15: 425-429.
- [67] ZALEWSKA-SZEWCZYK B., GACH A., WYKA K., BODALSKI J., MLYNARSKI W. : *The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different Lasparaginase preparations*. Clinical and Experimental Medicine 2009; 9(2): 113-116.

