

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Zuzana Matoušková

**Sledování vlivu quambalarinu B na aminokyselinový metabolismus
leukemických buněčných linií**

Monitoring of leukemic cell line amino acid metabolism changes
after Quambalarine B treatment

Diplomová práce

Školitel: *RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.*

Konzultant: *Mgr. Karel Vališ, Ph.D.*

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Daniela Kavana, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebylo předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Zuzana Matoušková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, laskavost a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala mému konzultantovi Mgr. Karlu Vališovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení. Další poděkování patří Ing. Janě Novákové za ochotu a pomoc s přípravou buněk. A v neposlední řadě velké poděkování patří celé mé rodině a blízkým za trpělivost a podporu během celého studia.

Abstrakt

Leukémie je nejčastější onkologické onemocnění u pacientů dětského věku, avšak ani u starších pacientů není toto onemocnění vzácné. To je hlavní důvod, že se v posledních letech výzkum zaměřil na vývoj specifických antileukemických léčiv. Klíčové se zdají být abnormality metabolismu nádorových buněk na které se dá cílit při léčbě.

Přírodní 1,4-naftochinony, mezi něž patří i quambalarin B produkovaný jako sekundární metabolit basidiomycetami *Quambalaria cyanescens*, jsou známé pro své léčebné účinky. Není tak překvapením, že i u quambalarinu B bylo prokázáno, že u některých leukemických buněčných linií inhibuje buněčnou proliferaci a následně způsobuje buněčnou smrt.

V předkládané práci jsem se pomocí aminokyselinové analýzy s fluorescenční detekcí snažila pozorovat změny metabolismu aminokyselin, a to sledováním aminokyselinových hladin v intracelulárním a extracelulárním prostředí leukemických buněk po ošetření quambalarinem B. Pozorování bylo prováděno u buněčné linie Jurkat, Ramos a THP-1, přičemž každá z těchto linií představuje jiný typ leukemického onemocnění.

Klíčová slova

Aminokyselinová analýza, metabolismus aminokyselin, quambalarin B, leukémie

Abstract

Leukemia is the most common cancer of children, moreover it is also not uncommon of elderly patients. Research has focused on the development of specific antileukemic drugs in recent years. Abnormalities in tumor cell metabolism that can be targeted during treatment appear to be the key.

Natural 1,4-naphthoquinones, including quambalarin B produced as a secondary metabolite by the basidiomycetes of *Quambalaria cyanescens*, are known for their therapeutic effects. Not surprisingly, Quambalarine B has also been shown to inhibit cell proliferation in some leukemic cell lines and subsequently caused cell death.

In the present thesis, I tried to observe changes in amino acid metabolism by monitoring amino acid levels in the intracellular and extracellular environment of leukemic cells after treatment with Quambalarine B using amino acid analysis with fluorescence detection. The observation was performed in Jurkat, Ramos and THP-1 cell lines, each of these lines represents another type of leukemic disease.

[IN CZECH]

Key words

Amino acid analysis, amino acid metabolism, Quambalarine B, leukemia

Obsah

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| Seznam použitých zkratek | 8 |
| 1 Úvod..... | 10 |
| 1.1 Hematopoesa..... | 11 |
| 1.1.1 Lymfopoesa | 12 |
| 1.1.2 Myelopoesa | 13 |
| 1.1.2.1 Granulomonocytární vývojová větev..... | 14 |
| 1.2 Leukémie | 15 |
| 1.2.1 Akutní lymfoblastická leukémie..... | 17 |
| 1.2.1.1 Léčba akutní lymfoblastické leukémie | 19 |
| 1.2.2 Akutní myeloidní leukémie | 21 |
| 1.2.2.1 Léčba akutní myeloidní leukémie..... | 23 |
| 1.3 Metabolismus nádorových buněk..... | 24 |
| 1.3.1 Metabolismus glutaminu..... | 26 |
| 1.3.2 Metabolismus asparaginu | 28 |
| 1.3.3 Metabolismus argininu | 30 |
| 1.4 Quambalarin B..... | 31 |
| 2 Cíle práce | 34 |
| 3 Použitý materiál a přístroje | 35 |
| 3.1 Buněčné linie | 35 |
| 3.2 Přístroje a vybavení | 35 |
| 3.3 Chemikálie | 36 |
| 3.4 Roztoky..... | 36 |
| 3.5 Software..... | 37 |
| 4 Metody..... | 38 |
| 4.1 Kultivace buněk | 38 |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|----|
| 4.2 | Pasážování buněk..... | 38 |
| 4.3 | Ošetření buněk quambalarinem B..... | 38 |
| 4.4 | Sklizení buněčných kultur | 39 |
| 4.5 | Příprava vzorků pro aminokyselinovou analýzu | 40 |
| 4.6 | Aminokyselinová analýza..... | 40 |
| 5 | Výsledky | 42 |
| 5.1 | Zpracování výsledků..... | 42 |
| 5.2 | Optimalizace přípravy vzorků | 42 |
| 5.3 | Buněčná linie Jurkat..... | 47 |
| 5.4 | Buněčná linie Ramos | 51 |
| 5.5 | Buněčná linie THP-1 | 54 |
| 5.6 | Buněčná média..... | 58 |
| 6 | Diskuze | 60 |
| 7 | Závěr | 64 |
| | Seznam použité literatury | 65 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AA | Aminokyselina (z angl. amino acid) |
| ADC | arginindekarboxylasa |
| ADI | arginindeiminasa |
| ALL | akutní lymfoblastická leukémie |
| AML | akutní myelodní leukémie |
| AQC | 6-aminochinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát |
| AS | argininosukcinátsynthasa |
| ASL | argininosukcinátlyasa |
| ASNasa | L-asparginasa |
| ASNS | asparaginsynthetasa |
| ATP | adenosintrifosfát |
| B-ALL | akutní B-lymfoblastická leukémie |
| BPTES | bis-2-(5-fenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethylsulfid |
| CSF | kolonie stimulující faktor (z angl. colony-stimulating factor) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| FBS | Fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum) |
| GDH | glutamátdehydrogenasa |
| GLS | glutaminasa |
| GM-CSF | kolonie granulocytů a makrofágů stimulující růstový faktor (z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) |
| Hgb | hemoglobin |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography) |
| IL | interleukiny |
| INF-g | gamma interferon |
| LDHA | laktátdehydrogenasa A |
| M-CSF | růstový faktor stimulující kolonie makrofágů (z angl. macrophage colony-stimulating factor) |
| MRD | minimální reziduální nemoc |
| OGDH | α -ketoglutarátdehydrogenasy |
| PKM2 | pyruvátkinasa M2 |

| | |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|
| PML | promyelocytární leukemický protein |
| QB | quambalarin B |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| T-ALL | akutní T-lymfoblastická leukémie |
| T _C lymfocyty | T cytotoxické lymfocyty (z angl. Cytotoxic T-lymphocyte) |
| T _H lymfocyty | T pomocné lymfocyty (z angl. Helper T-lymphocyte) |

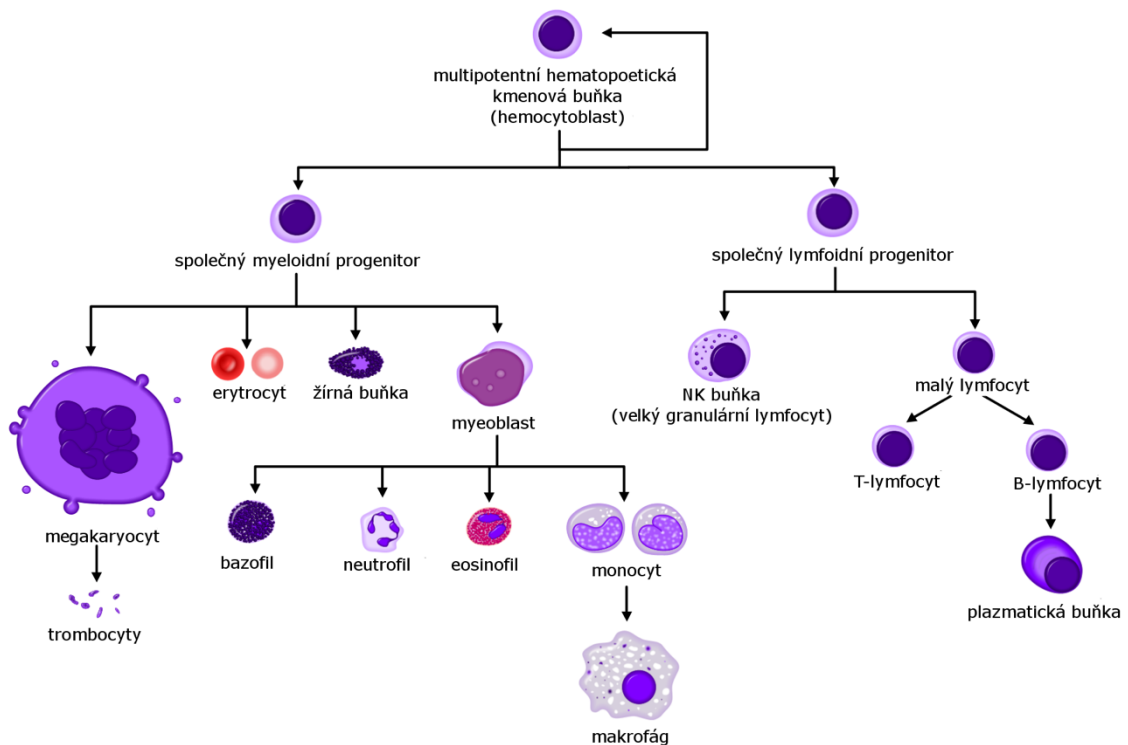
1 Úvod

Onkologická onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí. V České republice je ročně průměrně diagnostikováno 87 000 pacientů, přičemž kolem 27 000 pacientů na tato onemocnění umírá. Mezi nejpočetněji diagnostikovaná onkologická onemocnění patří karcinom střeva a konečníku, karcinom prostaty či prsu a nádorová onemocnění plic. V dětském věku je však nejčastějším nádorovým onemocněním právě leukémie. [1]

Leukémie zahrnuje skupinu maligních nádorových onemocnění postihující především krev, kostní dřeň a lymfatický systém. Z tohoto důvodu se v první části této práce věnuji procesům krvetvorby, kterých se leukemické onemocnění týká. V další části této práce shrnuji všeobecné informace o nemoci jako takové a to především o akutní formě tohoto onemocnění. Jelikož v posledních letech vzniklo mnoho výzkumných prací zaměřených na vývoj nových specifických léčiv pro léčbu onkologických onemocnění, tak se dále zabývám metabolickými změnami nádorových buněk jakožto možnými terapeutickými cíli při léčbě. Zaměřuji se přitom nejvíce na změny aminokyselinového metabolismu. A v neposlední řadě shrnuji dosavadní poznatky o quambalarinu B a jeho vlivu na některé leukemické buněčné linie.

1.1 Hematopoesa

Krvetvorba neboli hematopoesa je proces, při kterém vznikají krevní buněčné komponenty z pluripotentních kmenových buněk. Hematopoetické kmenové buňky mají schopnost sebeobnovy a tedy při dělení část zůstává kmenovými buňkami a část se diferencuje. V prenatálním období probíhá hematopoesa v různých místech těla, v postnatálním období pak v kostní dřeni. [2] Celé schéma hematopoesy je vyobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1 – Zjednodušené schéma hematopoesy. Všechny krevní elementy vycházejí z jednoho prekursoru, kterým je multipotentní hematopoetická kmenová buňka. Dále se vývoj krevních elementů rozděluje na dvě hlavní větve jmenovitě myeloidní větev a lymfoidní větev. Z myeloidní větve dále vznikají trombocyty, erythrocyty, žírné buňky a myeloblasty, mezi které patří bazofily, neutrofil, eozinofily a monocyty. Z lymfoidní větve se vyvíjejí NK buňky a B a T lymfocyty. Převzato a upraveno. [3]

Pluripotentní hematopoetické buňky jsou kmenové buňky, ze kterých vznikají všechny krevní elementy. Jsou to nediferencované buňky, které mají schopnost se obnovovat. Mitotická aktivita takovýchto buněk je velmi nízká [4]. Z pluripotentních hematopoetických buněk vznikají buňky multipotentní, které ztrácejí schopnost obnovy. Multipotentní hematopoetické buňky se dělí na dvě větve, a to na myeloidní progenitory,

ze kterých vznikají erytrocyty, megakaryocyty, granulocyty a monocyty, a dále lymfoidní progenitory, ze kterých se vyvíjejí lymfocyty. Progenitorové buňky jsou již částečně diferencované a mohou z nich vznikat jen dané buněčné linie. [5]

Hematopoetická dráha je přísně regulovaná pomocí celé řady růstových faktorů, nervových a humorálních působků. Nejdůležitější jsou však hematopoetické růstové faktory, mezi které se řadí jak některé hormony jako např. erythropoetin, tak cytokiny jako jsou např. interleukiny či interferon. Interleukiny (IL) pochází z různých zdrojů a zastávají velmi rozličné funkce – od zahájení zánětlivé odpovědi, aktivace T lymfocytů, B lymfocytů, makrofágů a neutrofilů, přes proliferaci a diferenciaci lymfoidních buněk v brzlíku až po inhibici produkce cytokinů [6]. Dalším důležitým růstovým faktorem je kolonie stimulující faktor (CSF), který působí na progenitorové buňky a stimuluje jejich proliferaci. Hormon erythropoetin představuje hlavní regulátor v erythropoese, tedy v tvorbě červených krvinek. Trombopoetin je růstový faktor, který stimuluje tvorbu krevních destiček. [7]

Hematopoesa může být dále řízena pomocí regulace genové exprese, přesněji pomocí transkripčních faktorů. Transkripční faktory jsou proteiny, které obsahují DNA vazebné domény a mohou tak interagovat s DNA. Některé transkripční faktory jsou potřebné pro iniciaci transkripce, jiné zvyšují genovou expresi nebo se např. vážou v blízkosti genu a potlačí tím jeho přepis. Také hrají velmi důležitou roli při diferenciaci jednotlivých linií krevních buněk. Poruchy způsobené mutacemi genů kódujících jednotlivé transkripční faktory vedou k závažným chorobám jako je např. leukémie. Hlavními transkripčními faktory jsou SCL/TAL-1, LMO-2, PU.1, GATA-1, GATA-2 a další. [8]

1.1.1 Lymfopoesa

Lymfopoetickou drahou vznikají lymfocyty a další elementy, které jsou součástí podpůrných tkání ze společného lymfoidního progenitoru. Progenitorová buňka se může diferencovat na B lymfocyt, NK buňku anebo se transportovat krví do brzlíku a přeměnit se na T lymfocyt. Vývoj lymfocytů zahrnuje fáze zrání z pro-buněk, pre-buněk, fáze nezralého až do fáze zralého lymfocytu. [9]

B lymfocyty tvoří asi 15 % cirkulujících lymfocytů a jejich název je odvozen podle místa tvorby a zrání, tedy kostní dřeně (bone marrow). Tvorbu regulují IL1, IL2, IL4, IL5 a IL7. Dále se mohou transformovat na plazmatické buňky, což je finální stupeň

diferenciace. B lymfocyty stejně jako T lymfocyty a NK buňky jsou součástí imunitního systému. B lymfocyty obsahují na svém povrchu imunoglobuliny, které jsou specifické vůči určitým antigenům. Po setkání se s antigenem se transformují na plazmatické buňky, což jsou buňky, které mají velký význam pro humorální imunitu. Plazmatické buňky dále produkují velké množství specifických protilátek. [3]

Progenitorové buňky putují krevním řečištěm do brzlíku, kde jsou buď usmrceny anebo dozrávají v T lymfocyty. Hlavními regulátory jsou IL1, IL2, IL4, IL6 a IL9. Zralé T lymfocyty představují cca 75 % cirkulujících lymfocytů a jejich název je odvozen od místa vzniku tedy brzlíku (thymu). T lymfocyty jsou efektorovými buňkami imunity a dle funkce se dělí na dvě skupiny, a to na pomocné lymfocyty (T_H) a cytotoxické lymfocyty (T_C). T_H buňky mají povrchový antigen CD4, po jejich aktivaci kontaktem s antigenem začnou tyto buňky produkovat interleukiny, které koordinují a regulují specifickou i nespecifickou imunitní odpověď, přičemž nespecifická imunitní odpověď je vrozená a bez imunitní paměti, zatímco imunita specifická je získaná, specificky rozpoznává cizorodé látky a vyznačuje se imunitní pamětí. T_C buňky mají na svém povrchu CD8 antigen. Po aktivaci tyto buňky aktivují činnost makrofágů a způsobují buněčnou smrt cílových buněk. [9]

NK buňky (z anglického **natural killers**) představují přibližně 10 % celkových lymfocytů. Prekurzory NK buněk vznikají v kostní dřeni, kde také zrají a poté putují krevním řečištěm do sleziny. Tyto buňky cytotoxicky působí na nádorové buňky, buňky napadené virem či na buňky, které na svém povrchu mají xenoantigeny. Další schopností těchto buněk je produkce cytokinů a to hlavně interferonu gamma (IFN- γ), který aktivuje makrofágy, T lymfocyty a dendritické buňky. [10]

1.1.2 Myelopoese

Z myelopoetické vývojové větve vznikají krevní elementy jako erytrocyty, granulocyty, trombocyty a žírné buňky. Všechny tyto elementy vznikají ze společné progenitorové myeloidní buňky. Při diferenciaci dochází ke změnám plazmy a změnám jádra. Co se změn plazmy týče, tak se u některých buněk uvnitř začínají vytvářet granula, a to jak neutrofilní, eozinofilní tak bazofilní. Změny jádra se pak týkají především erytrocytů, ze kterých je jádro vypuzeno.

1.1.2.1 Granulomonocytární vývojová větev

V granulomonocytární řadě se tvoří granulocyty a monocyty. Všechny tyto krevní elementy vznikají z jedné společné progenitorové mateřské buňky, ale oddělují se z ní čtyři vývojové větve, a to neutrofilní, eozinofilní, bazofilní a monocytová.

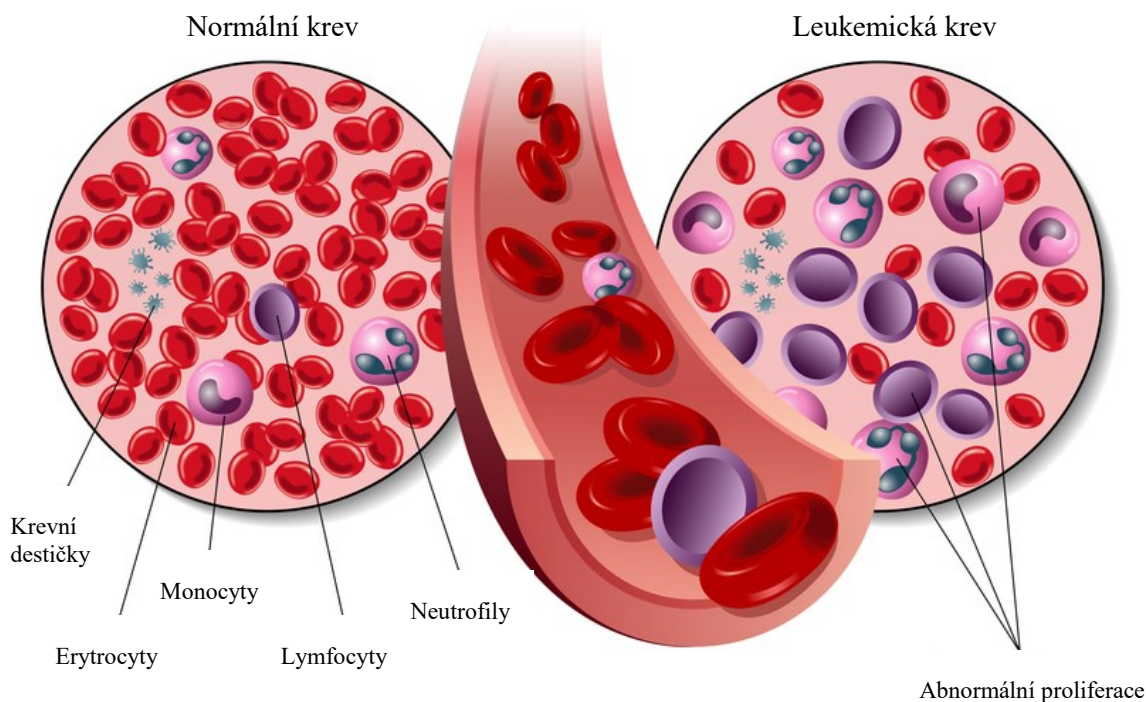
Granulocyty jsou buňky obsahující uvnitř cytoplasmy granula. Dle Wrightova barvení se rozdělují do tří skupin na neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty. Jádro granulocytů je rozděleno do tří segmentů. Pro granulocyty je typická schopnost fagocytózy a díky tomu se podílí na nespecifické imunitě. Neutrofilní granulocyty představují nejvíce početnou skupinu a jejich hlavní funkcí je fagocytóza, produkce cytokinů a degranulace. Eosinofilní granulocyty jsou důležité především při obraně před mnohobuněčnými parazity. Před parazity chrání především bazickými proteiny, které jsou pro parazity toxické. Bazofilní granulocyty jsou nejméně početnou skupinou a o jejich funkci toho není tolik známo. Obsahují však histamin a heparin a sekretují eikosanoidy a cytokiny. [9]

Granulocyty vznikají ze společného prekurzoru, kterým je myeloblast. Dalším vývojovým stádiem je promyelocyt. Poté vzniká myelocyt, ve kterém lze již pozorovat granula. Z myelocytu se vytvoří metamyelocyt, který později dozrává v granulocyt. Tento proces reguluje především růstový faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů a některý z IL, který se u jednotlivých skupin granulocytů liší. [9]

Monocyty tvoří kolem 5 % z celkového počtu leukocytů v periferní krvi. Jsou to velké buňky obsahující jedno jádro. Monocyty se mohou z krevního řečiště rychle přesunout do místa infekce, diferencovat na makrofágy či dendritické buňky a vyvolat tak imunitní reakci. Monocyty jsou tedy prekurzory makrofágů a v periferní krvi tak tvoří jejich neúčinnou zásobárnu. Prekurzorem pro vývoj monocytu je monoblast, který později diferencuje na promonocyt, který se následně dělí a diferencuje na zralý monocyt. Mezi růstové faktory regulující tento proces patří růstový faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF) a kolonie granulocytů a makrofágů stimulující růstový faktor (GM-CSF). [10]

1.2 Leukémie

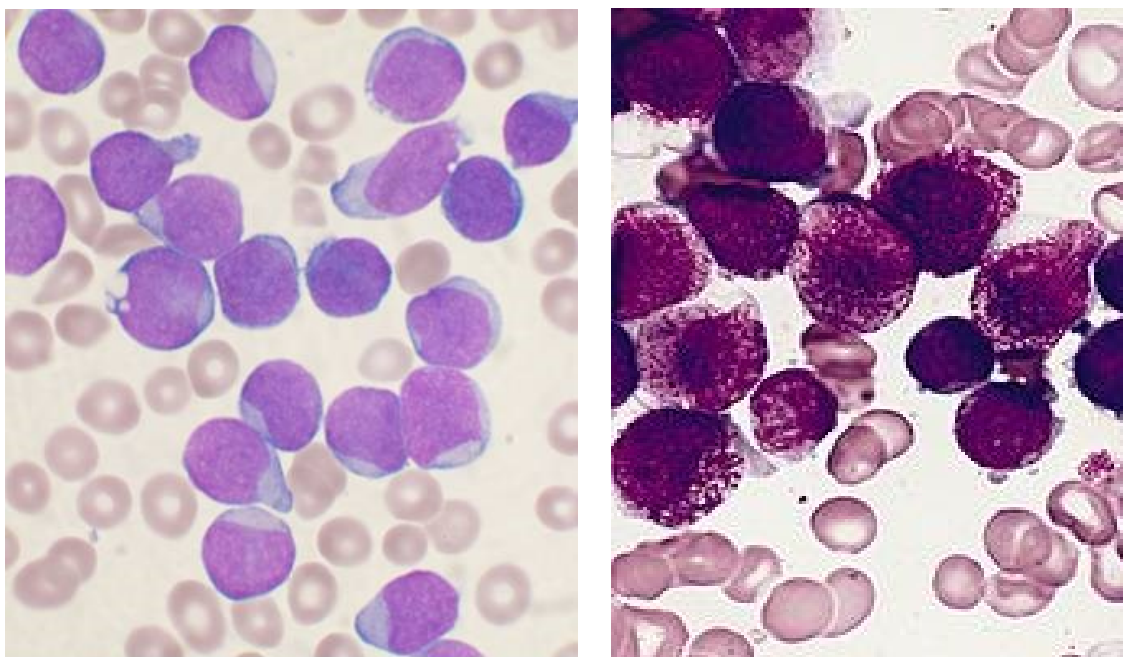
Leukémie je heterogenní skupina maligních nádorových onemocnění postihující hematopoézu. Toto onemocnění tvoří 30 % všech maligních onemocnění dětského věku a řadí se tak mezi nejčastější nádorová onemocnění ve věku od 1 do 15 let. Při leukémii dochází k vysoké proliferaci leukemických buněk, které ztrácejí schopnost diferenciaci, což je společným znakem všech nádorových onemocnění. Díky tomu má postižený jedinec 2 populace buněk, a to buňky zdravé a maligně transformované. Velké množství leukemických buněk utlačuje ostatní buňky kostní dřeně, což způsobuje jejich nedostatek (viz obrázek 2). Nedostatek erytrocytů, tedy anémie způsobuje u pacientů slabost, dušnost a bledost. Krvácivost a tvorba modřin je naopak způsobena nedostatkem trombocytů. Ačkoliv má pacient velké množství leukocytů, tak pouze malou část z nich tvoří zdravé buňky schopné bojovat s infekcí, a proto leukopenie způsobuje horečky a opakované infekce. Maligně transformované buňky se dále mohou šířit krevním řečištěm a dostat se tak do jater, sleziny či lymfatických uzlin. [1]



Obrázek 2 – Schéma krevních buněk u zdravého jedince a leukemického pacienta. Na obrázku je vlevo znázorněn morfologický obraz periferní krve zdravého jedince. Vpravo je vyobrazen morfologický obraz periferní krve pacienta trpící leukémií. V periferní krvi nemocného jedince je vidět abnormální proliferace některých krevních elementů a tím způsobený nedostatek ostatních krevních elementů. Upraveno a převzato. [11]

Etiopatogeneze této choroby není doposud zcela známa. U maligních buněk se vyskytují mutace DNA, které nejspíše zapříčiňují vznik této choroby. Příčina takovéto mutace může být např. expozice ionizujícímu záření, léčba cytostatiky, genetické choroby, vzácně také virové infekty a některé chemické látky jako jsou např. aromatické uhlovodíky.[12][13]

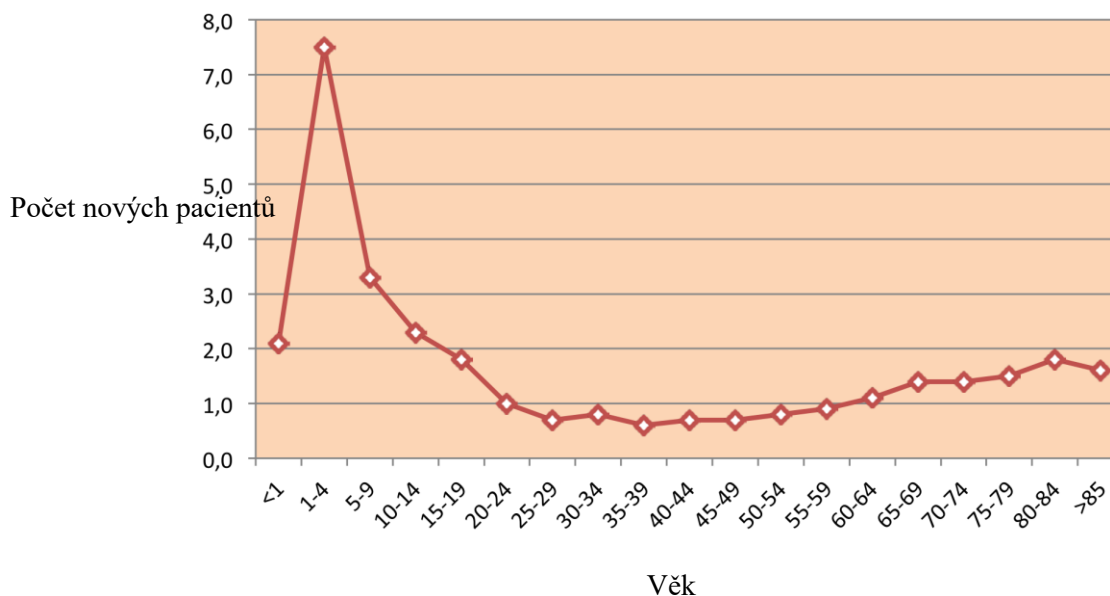
Leukémie se běžně dělí na akutní, jejíž vývoj je rychlý a bez předchozí hematologické anamnézy a je pro ni typická zástava diferenciací na úrovni blastů, a chronickou, při které je vývoj pomalejší a symptomy se nemusí projevovat až několik let. Chronická leukémie se vyskytuje spíše u dospělých jedinců. Ve své práci sleduji pouze akutní typ této nemoci. Dále se rozděluje dle typu poškozených buněk. Pokud maligní transformace postihne buňky kostní dřeně, které tvoří lymfocyty hovoříme tak o lymfoblastické leukémii. Pokud však dojde k narušení buněk kostní dřeně, které produkují červené krvinky, ostatní typy bílých krvinek a krevní destičky hovoříme tak o leukémii myeloidní. Rozdíl aspirátů kostní dřeně u lymfoblastické a myeloidní leukémie je znázorněn na obrázku 3. [12]



Obrázek 3 – Aspirát kostní dřeně u pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií a akutní myeloidní leukémií. Na obrázku vlevo je znázorněn aspirát kostní dřeně u pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií, ve kterém lze vidět zmnožení B lymfoblastů. Vpravo je znázorněn aspirát kostní dřeně pacienta trpícího akutní myeloidní leukémií, přesněji promyelocytární leukémií. Lze v nátěru pozorovat typická azurofilní granula. Převzato a upraveno [14][15]

1.2.1 Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) tvoří 80 % všech dětských leukemií a její incidence je 3-4 nové případy na 100 000 dětí za rok. Nejčastěji se ALL vyskytuje mezi 1. – 4. rokem života dítěte (viz obrázek 4). ALL se častěji objevuje u chlapců než u děvčat, a to v poměru 1,3:1. [1][16]



Obrázek 4 – Incidence ALL. Počet nových případů ALL ročně na 100 000 obyvatel. [17]

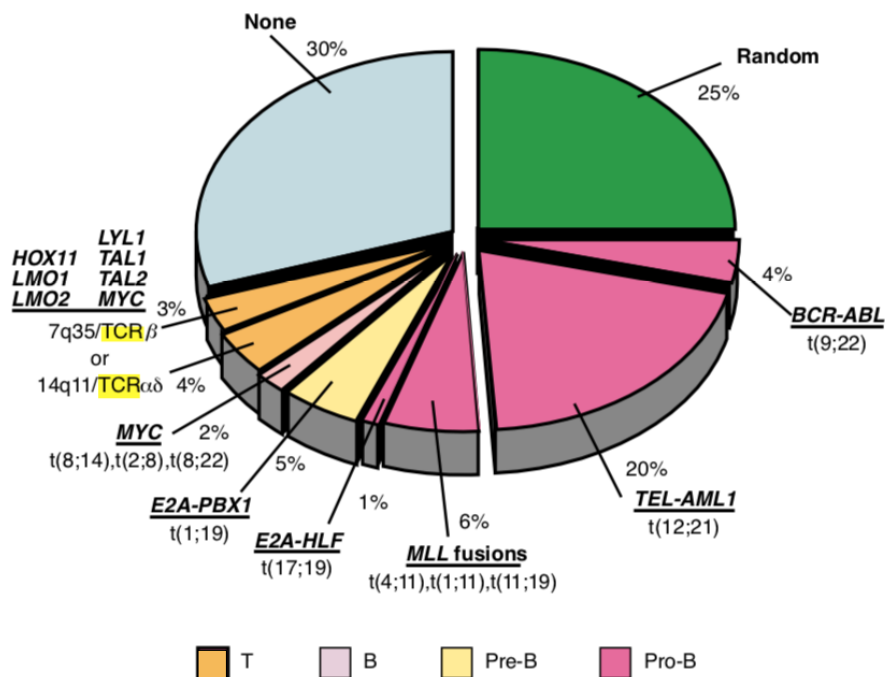
ALL vzniká díky mutaci lymfoidní progenitorové buňky a je charakteristická velkým zmnožením nezralých lymfocytů, nejčastěji ve formě blastů. Může dojít k mutaci prekurzorů B lymfocytů – až 85 % ALL - a pak hovoříme o akutní B-lymfoblastické leukémii (B-ALL), nebo může dojít k mutaci prekurzorů T lymfocytů a takovýto druh nazýváme akutní T-lymfoblastickou leukémií (T-ALL) [18]. Mezi obecné mechanismy, které indukují vznik ALL, řadíme aberantní expresi protoonkogenů, chromozomální translokace, které vytvářejí fúzní geny kódující aktivní kinázy a změněné transkripční faktory, a hyperdiploidie zahrnující více než 50 chromozomů. Díky těmto mutacím buňky přichází o schopnost diferenciaci a řízené proliferace a také dochází k defektům apoptických drah, díky čemuž je život buněk prodloužen. [19]

Ačkoliv u většiny případů ALL nelze identifikovat genetickou ani environmentální příčinu, některé genetické aberace se nenáhodně vyskytují až u 45 % leukemických buněk [20]. Distribuce onkogenů u ALL dětského věku vzniklých translokací je zobrazena na obrázku 5, str. 19. Fúzní gen *BCR-ABR* neboli Philadelphský chromozom vzniklý translokací $t(9;22)$ je nejčastější abnormalitou u ALL v dospělém

věku. Přítomnost tohoto genu je přibližně 5 % v dětském věku a 20 % v dospělém věku, přičemž jeho přítomnost se s věkem zvyšuje. Tento gen se také často vyskytuje u chronické myeloidní leukémie. U pacientů, u kterých se vyskytuje fúzní gen *BCR-ABL*, se často vyskytuje agresivní typ leukémie s vysokou mírou recidivity. Tento gen kóduje cytoplazmatický protein obsahující aktivovanou doménu ABL tyrosinkinasy.[21]

Nejčastěji se vyskytujícím fúzním genem vzniklým translokací t(12;21) u ALL dětského věku je *TEL-AML1*. Tento fúzní gen je nejvíce přítomný u pro-B-lymfocytů s incidencí kolem 25 % [20]. U *TEL-AML1* pozitivní ALL bývá dobrá prognóza s časnou odpovědí na léčbu [22]. Dalším fúzním genem, který se vyskytuje u ALL je takový gen, který vzniká translokací *MLL* genu s dalším chromozomem a to přesně t(4;11), t(1;11) či t(11;19). Bylo pozorováno více než 80 různých fúzních genů s *MLL*. Takto vzniklé fúzní geny jsou přítomny u více než 50 % ALL v kojeneckém věku do 6 měsíců. [20]

Přibližně u 1 % ALL dětského věku se objevuje fúzní gen *E2A-HLF*, který vzniká translokací t(17;19) u pro-B-lymfocytů [20]. Tato aberace je spojována s nepříznivou prognózou. Dalším onkogenem je chimérický gen *E2A-PBX1* vzniklý translokací t(1;19). Postihuje přibližně 5 % buněk ALL, a to převážně pre-B-lymfocyty. Tento gen značí agresivnější průběh nemoci. U zralých B-lymfocytů ALL a u Burkittova lymfomu se objevuje dysregulace *c-MYC* pomocí translokace t(8;14), t(2;8), t(8;22) [20]. Tato dysregulace se vyskytuje přibližně u 2 % ALL dětského věku [18]. U T-lymfoidních progenitorů probíhá translokace *LMO1*, *LMO2*, *LYL1*, *TAL1*, *TAL2* a *MYC* s genem, který kóduje β nebo $\alpha\delta$ řetězec T-buněčných receptorů. [20]



Obrázek 5 – Míra zastoupení jednotlivých onkogenů vzniklých translokací u ALL. V grafu jsou zeleně zobrazeny náhodné genetické aberace, které se vyskytují až u 25 % nemocných. Purpurově zbarvená pole vyznačují onkogeny vyskytující se u pro-B-lymfocytů a jedná se chimérické onkogeny BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-HLF a fúzní gen vzniklý translokací MLL s dalším chromozomem. Žlutě znázorněný je chimérický onkogen nalezený u pre-B-lymfocytů a jedná se gen vzniklý translokací E2A s PBX1. Růžově vyobrazené pole znázorňuje dysregulaci c-MYC ve zralých B-lymfocytech. Pole s oranžovou barvou pak značí translokace u T-lymfocytů. Převzato a upraveno [20]

1.2.1.1 Léčba akutní lymfoblastické leukémie

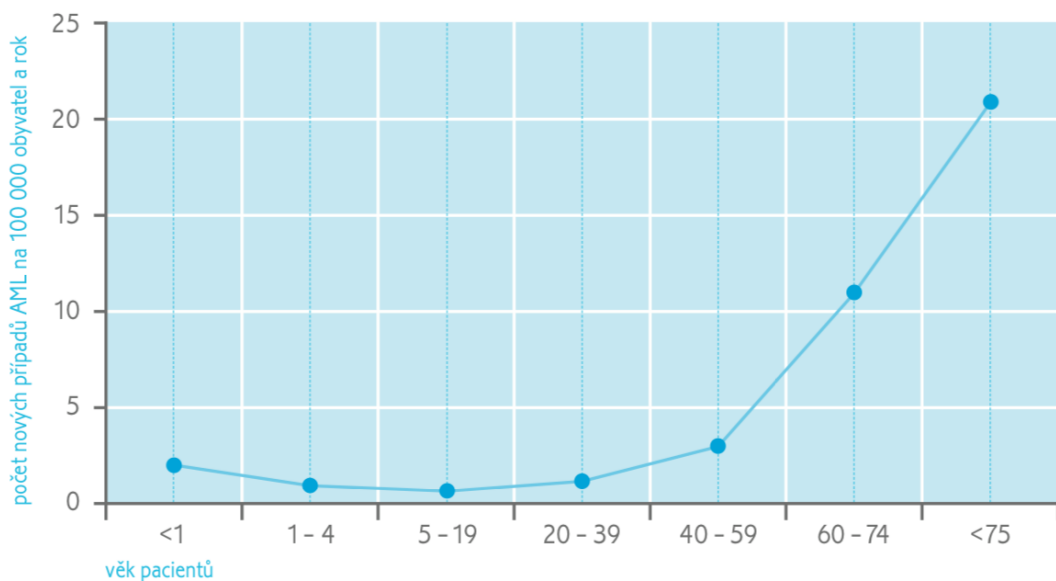
Léčba i prognóza ALL se liší u dětí a dospělých. U dětských pacientů dochází u 95 % dětí k remisi a celkové přežití je 85 % [16]. U dospělých pacientů závisí hodně na věku pacienta. U mladých lidí do 30 let je celkové přežití až 60 %. Mezi 30. – 60. rokem života celkové přežití klesá na 30 % a u pacientů starších než 60 let je celkové přežití pouze 15 % [23]. Při léčbě se snažíme zničit nádorové buňky a zároveň zmírnit či zcela odstranit vedlejší účinky nemoci a léků. Typ léčebné strategie je vybrán podle rizikovosti daného pacienta. Nejčastěji se pacienti rozdělují do tří základních skupin a to pacienti s vysokým rizikem, se středním rizikem a se standardním rizikem [24]. Do těchto skupin

jsou rozděleny podle prognostických faktorů, jakým je např. věk pacienta, míra odpovědi na léčbu či genetické aberace [25].

Dětská ALL je silně chemosenzitivní onemocnění, a proto se nejčastěji léčí kombinovanou chemoterapií, která způsobí apoptózu leukemických blastů. Léčba je rozdělena do čtyř fází, a to indukce remise, poté konsolidace, reindukce a poslední fází je udržovací léčba. Hlavním cílem indukce remise je co nejrychleji se zbavit co největšího množství leukemických blastů a vyvolat tím remisi. Počet leukemických buněk sledujeme pomocí parametru minimální reziduální nemoci (MRD), který je dán množstvím specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory. Konsolidace léčby má za cíl utvrdit remisi, zneškodnit zbytek leukemických buněk a dosáhnout tak negativity MRD [10]. Konsolidace probíhá v několika cyklech, přičemž alespoň jeden kopíruje léčebný postup indukce remise a nazývá se reindukčním cyklem. Posledním krokem je udržovací léčba, jejímž cílem je udržet remisi a vyhnout se relapsu, který představuje největší problém léčby, protože pacient se stane rezistentní vůči předešlé léčbě a musí se tak buď zvýšit dávky cytostatik, nebo vytvořit nový léčebný často agresivnější postup léčby [26]. Během celé léčby souběžně probíhá podpurná léčba, která minimalizuje vedlejší účinky choroby a léčby hlavní. Hlavní léky, které se využívají pro léčbu ALL jsou kortikosteroidy, jako je prednison či dexametason, vinkristin, metotrexát, merkaptopurin [17]. Specifickým lékem u ALL je asparginasa, která způsobí nedostatek esenciální aminokyseliny asparaginu, které si leukemické buňky, kvůli nízké hladině asparaginsyntetasy nejsou schopny vytvořit [27]. Pacienti s vysokým rizikem jsou často indikováni k transplantaci kostní dřeně [28].

1.2.2 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie zasahuje kmenové hemopoetické buňky, které se dále diferencují převážně na myeloidní a myelomonocytární blasty. Jedná se tedy o onemocnění, při kterém je zvýšený počet myeloblastů, které tvoří více než 20 % jaderných buněk v kostní dřeni. Ze všech akutních leukémií je myeloidní typ zastoupen z 80 % a incidence v Evropě je 2 - 4 noví pacienti na 100 000 obyvatel za rok, přičemž se incidence zvyšuje s narůstajícím věkem. Zatímco incidence AML u dětí je pouze 1 nově nemocné dítě na 100 000 dětí za rok. Počet nových případů za rok je znázorněn na obrázku 6. Příznaky jsou často dost nespecifické a velmi rychle se zhoršující. [29]

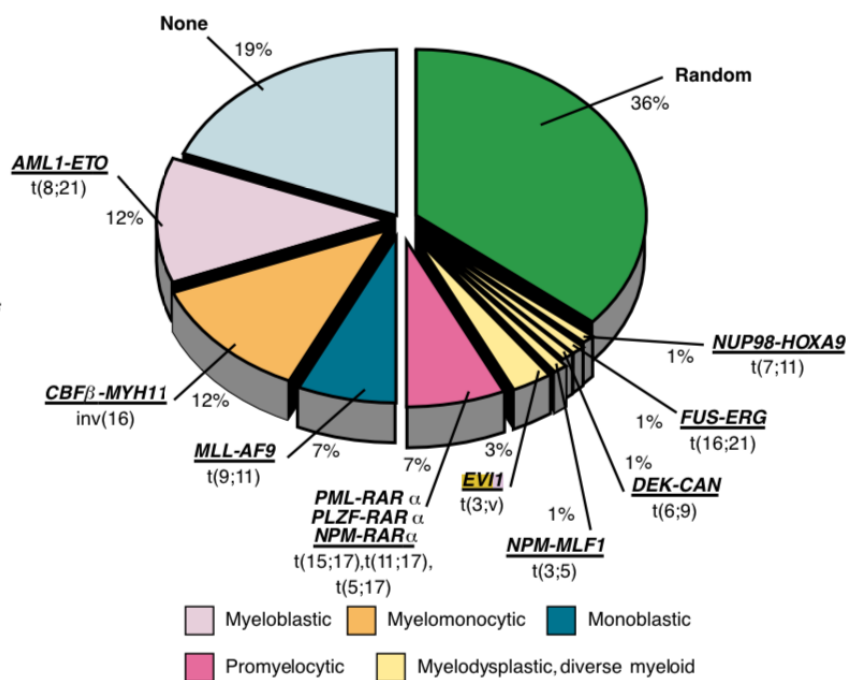


Obrázek 6 - Počet nových případů AML ročně na 100 000 obyvatel. V grafu je znázorněn roční nárůst nových pacientů trpících AML dle věku. Lze pozorovat mírný pokles od novorozeneckého věku až do období od 5 – 19 let. Poté přichází mírný nárůst a to až do přibližně 40. věku. Poté se incidence s věkem rapidně zvyšuje. [30]

U AML stejně jako u ALL je mechanismus vzniku nejasný, přesto byly objeveny nenáhodné genetické aberace, které se vyskytují až u 55 % pacientů dětského věku AML. Translokace, které aktivují geny transkripčních faktorů a AML jsou úzce specifické pro hematopoetické buňky blokováné v určitém stádiu diferenciaci. Na obrázku 7, str. 24 je znázorněna distribuce translokací vzniklých onkogenů u dětských pacientů a mladých dospělých s AML [20]. Fúzní gen *AML1-ETO*, který vznikl důsledkem translokace t(8;21) se vyskytuje v myeloblastech a značí příznivější prognózu než u

většiny ostatních typů. Při výskytu této aberace je často zvýšená granulopoesa a inhibovaná erytropoesa [31]. Další fúzní gen *CBFβ-MYH11* vzniká nejčastěji inverzí inv(16), ale také translokací t(16;14) a delecí del(16). Tato aberace se vyskytuje v myelomonocytech a nemocí, u kterých byla objevena, se řadí mezi pacienty s nízkým rizikem. Translokací t(9;11) vzniká fúzní gen *MLL-AF9*, který je spojován s agresivním typem kojenecké AML. Dospělí jedinci s tímto genem jsou řazeni do skupiny se standardním rizikem [32]. Tato aberace je přítomná zejména u monoblastů. Skupina aberací genu *RARα*, který kóduje jaderný receptor pro kyselinu retinovou, se vyskytuje u 7 % dětských pacientů s AML [32]. Nejčastěji dochází k translokaci s genem kódující promyelocytární leukemický protein (PML). Fúzní gen *PML-RARα* vzniká translokací t(15;17) a pacienti s tímto nálezem se řadí do prognosticky příznivé skupiny. Vzácně pak vzniká fúzní gen *PLZF-RARα* a *NPM-RARα* a to translokací t(11;17) a t(5;17). Tyto aberace jsou prognosticky velmi nepříznivé [33].

Nepřiměřená aktivace genu *EVII*, která je často způsobena přestavbou chromozomu 3q26 je spojována s AML s myelodysplastickými rysy. *EVII* je např. ovlivněna fúzním genem *TEL/AML1*. Takto postižení pacienti patří do skupiny pacientů s vysokým rizikem a jejich prognóza není příznivá [34]. Poměrně vzácná translokace t(3;5), pomocí které vzniká fúzní gen *NPM-MLF1*, se vyskytuje přibližně u 1 % dětských pacientů [14]. Translokace t(6;9) je genetická aberace, při které vzniká fúzní gen *DEK-CAN* a je často spojována s velmi špatnou prognózou [35]. Fúzní gen *FUS-ERG* vzniklý translokací t(16;21) se objevuje jak v akutní tak chronické myeloidní leukémii. Tato aberace je spojována se špatnou prognózou a s vysokým rizikem relapsu do 1 roku. Poslední nenáhodnou aberací objevující se u AML je translokace t(7;11), při které vzniká fúzní gen *NUP98-HOXA9* a stejně jako u výše zmíněných neznáčí dobrou prognózu. [14]



Obrázek 7 Distribuce onkogenů u dětských pacientů a mladých dospělých s AML. Nejvíce zastoupené jsou náhodné genetické aberace, které se vyskytují až u 36 % nemocných a v grafu jsou znázorněny zelenou barvou. U 19 % se nevyskytují žádné doposud objevené aberace, což je znázorněno v grafu barvou světle modrou. Světle růžovou barvou je vyznačen fúzní gen *AML1-ETO*, který je přítomný u myeloblastických buněk AML. Dalším hojně zastoupeným fúzním genem je *CBFβ-MYH11*, který je přítomen u myelomonocytů a znázorněn oranžově. Tmavě modré pole patří monoblastickému fúznímu genu *MLL-AF9*. Růžově je znázorněn soubor genetických aberací genu *RARα*, který se vyskytuje u promyelocytů. Žlutou barvou jsou vyznačeny onkogeny nacházející se u myelodysplastického typu AML. Převzato a upraveno z [20]

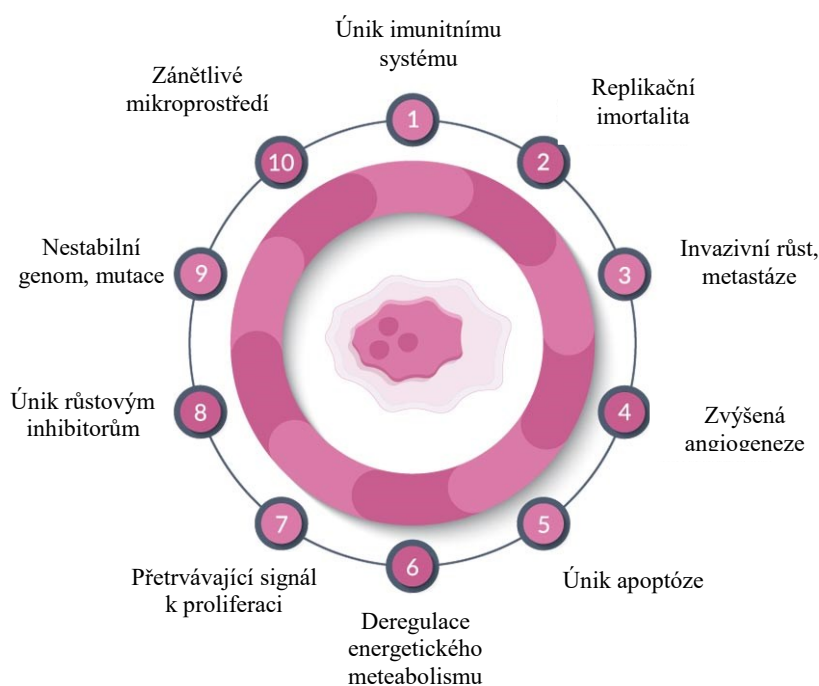
1.2.2.1 Léčba akutní myeloidní leukémie

Léčba AML se volí podle podtypu onemocnění, dle cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření a dle věku pacienta. Cílem léčby je vyvolání remise a následné zabránění relapsu. Léčba se rozděluje do dvou fází, a to na indukci remise a na konsolidaci, tedy post-remisní fázi [30]. Během indukční léčby se snižuje počet leukemických buněk v kostní dřeni na co nejnižší hodnotu. Základním lékem indukce remise, který se využívá již přes 30 let je kombinace cytarabinu a antracyklinu [36]. Po dosažení remise přichází na řadu konsolidační fáze léčby, která zahrnuje chemoterapii či transplantaci hematopoetických buněk u pacientů s vysokým rizikem. Pro konsolidační léčbu se většinou používá opět cytarabin. Remise dosáhne až 80 % pacientů mladších 60

let a celkové přežití je přibližně 50 %, u starších pacientů remise dosáhne přibližně polovina a celkové přežití je pouze 15 %. [37]

1.3 Metabolismus nádorových buněk

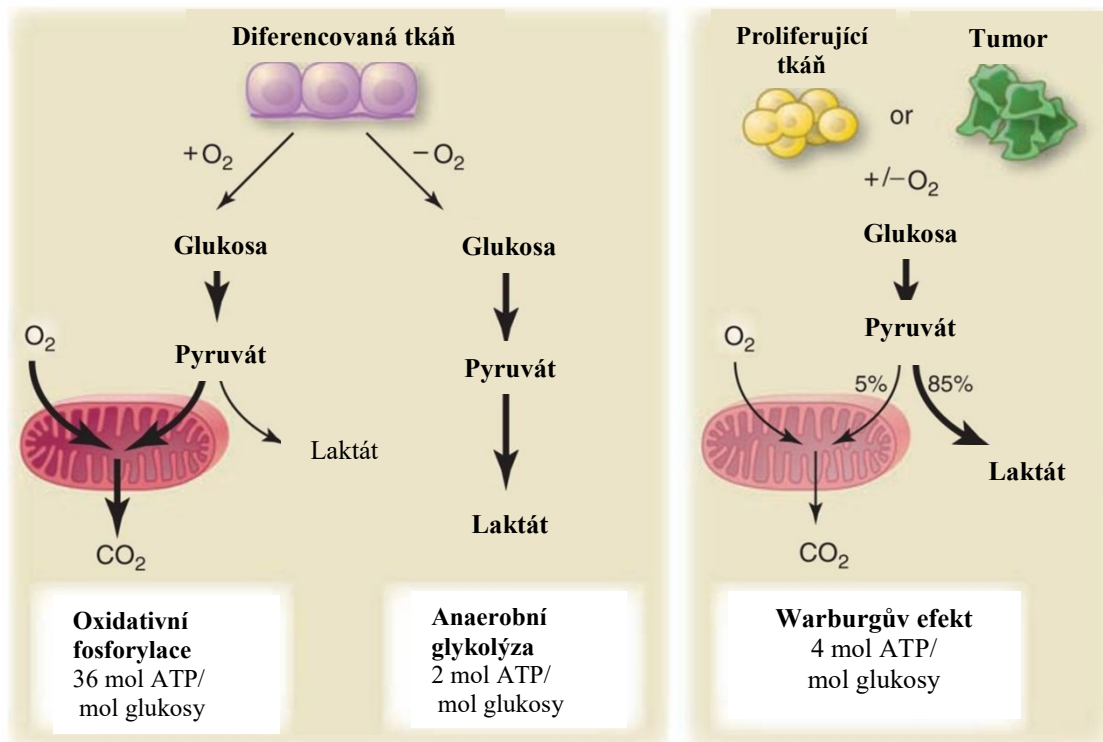
Nádorové buňky se od buněk zdravých liší v mnohých vlastnostech, ať už se jedná např. o míru replikace a proliferace či metabolismus. Nádorové buňky mají deset charakteristických vlastností, kterými se liší od buněk zdravých a jsou znázorněny na obrázku 8. Metabolismus nádorových buněk je upraven tak, aby buňky měly dostatečné množství živin a energie potřebné k nadměrnému bujení. V posledním desetiletí se ukázalo, že metabolické změny se týkají interakce buňky s metabolitem, změn vedoucích ke schopnosti získat větší množství potřebných živin a také preferenčních metabolických drah při metabolismu různých živin. Abnormality metabolismu nádorových buněk jsou možné terapeutické cíle. [38]



Obrázek 8 - Charakteristické znaky nádorových buněk. Na obrázku je znázorněno deset typických znaků nádorových buněk, kterými je lze odlišit od buněk zdravých.

Nejdůležitějším zdrojem energie je glykolýza, u které dochází k jedné z hlavních změn metabolismu nádorových buněk. Již v roce 1924 Otto Warburg pozoroval, že v nádorových buňkách dochází k mnohem větší spotřebě glukosy než v okolních tkáních a že i v přítomnosti kyslíku je glukosa metabolizována stejně jako za anaerobních podmínek na laktát [39]. Warburg to přisuzoval špatnému fungování mitochondrií, což podle jeho představy vedlo k maligním transformacím. Později však bylo zjištěno, že tato

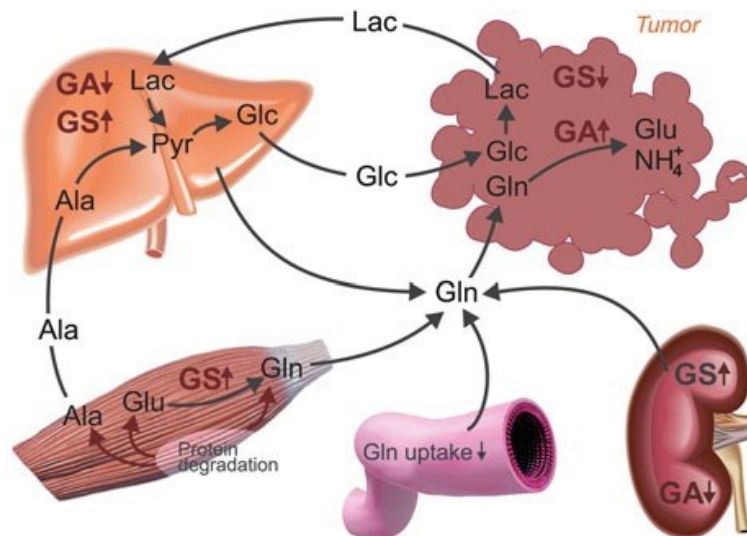
abnormalita je spíše výsledkem mutací onkogenů a tumor supresorových genů. Ačkoliv je glykolýza, při které dále vzniká laktát, daleko méně účinná, při dostatečném množství glukosy vzniká ATP rychleji než při oxidativní fosforylaci a obejde se bez použití mitochondrií, které hrají důležitou roli při spouštění apoptózy [40]. Rozdíly mezi oxidativní fosforylací, anaerobní glykolýzou a aerobní glykolýzou jsou znázorněny na obrázku 9. Warburgův efekt se využívá jak při diagnostice, tak jako terapeutický cíl [41]. Při diagnostice se využívá faktu, že nádorové buňky akumulují glukosu a při podání značené látky chovající se obdobně můžeme pomocí pozitronové emisní tomografie detekovat nádory. Jako terapeutický cíl je možné využít faktu, že nádorové buňky jsou závislé na glykolýze, kdežto buňky zdravé mohou využívat oxidativní fosforylaci a jako náhradní zdroje energie využívat mastné kyseliny či aminokyseliny[42]. Při výzkumu terapeutických cílů se zaměřili právě na inhibici některých glykolytických enzymů.



Obrázek 9 – Rozdíly mezi oxidativní fosforylací, anaerobní glykolýzou a aerobní glykolýzou. Na obrázku vlevo je znázorněno schéma a energetická bilance oxidativní fosforylace a anaerobní glykolýzy u diferencované tkáně. Nejprve je glukosa přeměněna na pyruvát, jehož další osud je ovlivněn přítomností kyslíku. Oxidativní fosforylace probíhá v aerobním prostředí a dochází k úplné oxidaci pyruvátu v mitochondriích na oxid uhličitý. Při nedostatku kyslíku, a tedy v anaerobním prostředí dochází k přeměně pyruvátu na laktát. Anaerobní glykolýzou sice vzniká mnohonásobně méně ATP, avšak dochází ke zpětné přeměně NADH na NAD⁺. Na obrázku vpravo je znázorněn Warburgův efekt neboli aerobní glykolýza, při které dochází z větší míry k přeměně glukosy na laktát i za přítomnosti kyslíku. Převzato a upraveno. [43]

1.3.1 Metabolismus glutaminu

Hned po glukose je druhou nejdůležitější živinou pro nádorové buňky glutamin, který je klíčový kvůli své schopnosti být donorem jak uhlíku, tak dusíku, čehož se hojně využívá v řadě metabolických cest podporující buněčný růst. Glutamin je tak primárním zdrojem energie nejen pro nádorové buňky, ale také pro ostatní rychle proliferující buňky, jako jsou buňky imunitního systému, lidské fibroblasty či adipocyty [44]. Ačkoliv je glutamin pro savce neesenciální aminokyselinou, některé nádorové buňky se stávají zcela závislé na jeho vnějším přísunu. Glutamin hraje důležitou roli při tvorbě energie, udržování redoxní rovnováhy v buňkách a také při biosyntéze esenciálních molekul, jako jsou aminokyseliny, puriny, pyrimidiny či mastné kyseliny [45]. Stejně jako u glukosy byl pozorován zvýšený příjem glutaminu z prostředí. Již v roce 1955 Harry Eagle prokázal, že je potřeba až stonásobný molární přebytek glutaminu v kultivačním médiu v poměru k ostatním aminokyselinám, aby bylo dosaženo optimálního růstu HeLa buněk, což jsou nádorové buňky odebrané z nádoru děložního hrdla [46]. Na obrázku 10 je znázorněno, jak nadměrná potřeba glutaminu v tumoru ovlivňuje okolní tkáň.



Obrázek 10 Transport glutaminu do nádorové tkáně. Na obrázku je znázorněné schéma zobrazující transport glutaminu, způsobený nadměrnou potřebou dusíku nádorovými buňkami, z jednotlivých tkání do tumoru. Hostitelské buňky předávají buňkám nádorovým nejen glutamin, ale také glukosu. Během tumorigeneze dochází v játrech a ledvinách ke snížené expresi glutaminasy a ke zvýšené expresi glutamin synthetasy, což má za následek přebytek glutaminu, který je dále transportován do nádorové tkáně. V pozdějším stádiu je odbourávána svalová hmota a glutamin je také transportován do nádorové tkáně. Dále bylo pozorováno u některých experimentálních nádorů, že ve svalových buňkách dochází ke zvýšené expresi glutaminasy a ve střevech pak ke sníženému využití glutaminu, což také zvyšuje množství cirkulujícího glutaminu. V nádorové tkáni pak dochází k masivní glutaminolýze, při které se vyplavuje velké množství kyseliny glutamové a amoniaku. Převzato a upraveno [45]

Katabolismus glutaminu je odstartován přeměnou glutaminu na glutamát za uvolnění amoniaku pomocí reakce katalyzované glutaminasami. U savčích buněk byly popsány dva geny, a to *GLS1* a *GLS2*, které kódují izoformy těchto glutaminas. *GLS1* se nachází na chromozomu 2 a kóduje izoformu ledvinového typu a *GLS2* se nachází na chromozomu 12 a kóduje izoformu jaterního typu. Při zkoumání těchto izoenzymů bylo zjištěno, že enzymová aktivita enzymů kódovaných *GLS1* koreluje s rychlostí růstu a malignitou, zatímco *GLS2* patří mezi geny regulované *p53* a řadí se tak mezi tumor-supresorové geny [47]. Glutamát může být dále využit na přeměnu glutathionu pomocí enzymu γ -glutamylcysteinsynthetasou a γ -glutamylcysteinu. Dále je glutamát důležitý jako prekurzor pro syntézu dalších neesenciálních aminokyselin jako je alanin, aspartát, glycin a serin. V neposlední řadě je glutamát přeměněn na α -ketoglutarát, který se může zapojit do Krebsova cyklu anebo do lipogeneze. Zvýšeným metabolismem glutaminu vzniká velké množství oxidu uhličitého, jenž je přeměněn na hydrogenuhličitanový anion, který spolu s velkým množstvím laktátu okyseluje vnitřní prostředí. [48]

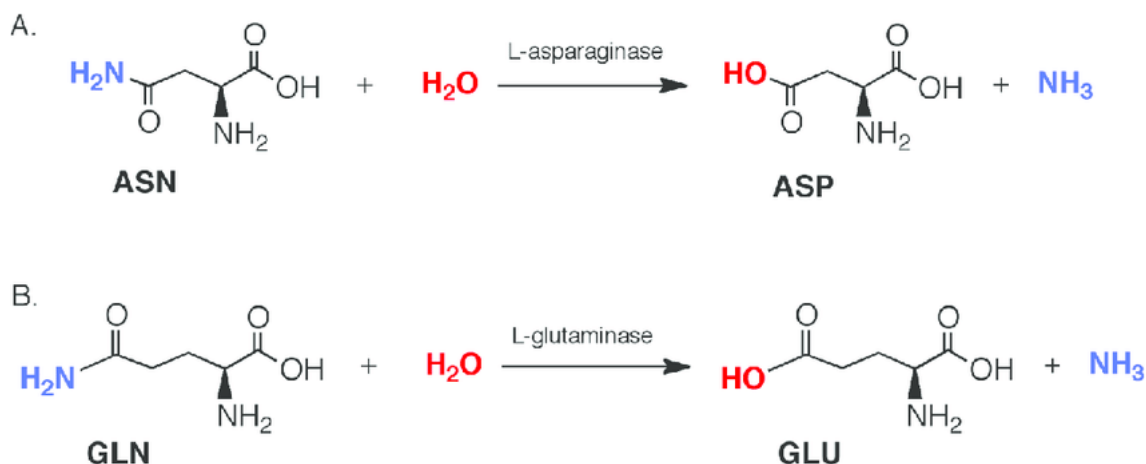
Metabolismus glutaminu je regulován hned v několika krocích prostřednictvím *MYC* onkogenu. Nejenže se váže na promotor dvou důležitých glutaminových transportérů, a to ASCT2 a SN2, ale také zvyšuje expresi jejich mRNA, díky tomu je zajištěný zvýšený import glutaminu do buněk [49]. Dále bylo zjištěno, že *MYC* onkogen způsobuje zvýšenou expresi glutaminasy, a to nepřímou regulací mitochondriální *GLS2* pomocí transkripční represe miR-23a a miR-23b [50]. U gliomových buněk bylo experimentálně zjištěno, že při umlčení *MYC* onkogenu pomocí shRNA, jsou buňky schopné přežít i bez přítomnosti glutaminu v kultivačním médiu. [51]

Metabolismus glutaminu nádorových buněk je častým cílem studia při výzkumu terapeutických cílů. Pro léčbu rakoviny závislé na glutaminu se ukázaly přínosné látky jako je benzylserin a L- γ -glutamyl-p-nitroanilid, které způsobují inhibici glutaminového transportéru ASCT2. Dalším možným terapeutickým cílem je inhibice určitých izoform glutaminasy pomocí CB-839 a (bis-2-(5-fenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfidu (BPTES). BPTES inhibuje *GLS1*, který je důležitý pro nádorový růst. Bohužel tato sloučenina není vhodná kvůli špatné rozpustnosti. Stejně jako BPTES i CB839 inhibuje *GLS1* a vykazuje tak silné protinádorové účinky např. u leukemických buněk. [52]

1.3.2 Metabolismus asparaginu

Asparagin je důležitou aminokyselinou pro nádorové buňky převážně proto, že může udržovat životaschopnost buněk, které mají nedostatek glutaminu. Glutamin může dále přispívat k syntéze několika aminokyselin, ale pouze asparagin vyžaduje glutamin pro *de novo* syntézu pomocí enzymu asparaginsynthetasy (ASNS) [53]. ASNS se řadí mezi aminotransferasy, protože přenáší aminoskupinu z glutaminu na aspartát. Míra exprese ASNS je regulována prostřednictvím transkripčních faktorů, a to jako odpověď na buněčný stres nebo nedostatek některých aminokyselin. V důsledku zkoumání protinádorového účinku asparaginasy u leukemických onemocnění byla zjištěna nízká aktivita ASNS, což znamená, že leukemické buňky jsou závislé na extracelulárním asparaginu. [54]

L-asparginasa (ASNasa) je antagonistou ASNS. Je to enzym, který katalyzuje hydrolytický rozklad asparaginu za vzniku kyseliny asparagové a amoniaku (viz obrázek 11, str. 31). V menší míře má však i glutaminasovou aktivitu a rozkládá tak glutamin na kyselinu glutamovou a amoniak. V roce 1953 bylo zjištěno, že po aplikaci séra z morčete začalo docházet ke zmenšování lymfosarkomu u myši [55]. V dalších letech Broome prokázal to, že ASNasa má antileukemické účinky [56]. ASNasa rozkládá asparagin a snižuje tak koncentraci asparaginu v krevním séru. Asparagin je nezbytně důležitý pro tvorbu DNA, RNA a proteinů [57]. Zdravé buňky si nedostatek kompenzují pomocí ASNS, ale protože leukemické buňky mají tohoto enzymu málo, použití ASNasy vede k buněčné smrti. Přesný mechanismus účinku ASNasy není však dodnes znám. [58]



Obrázek 11 - Reakce katalyzovaná ASNasou. Na obrázku je pod písmenem A zobrazená reakce asparaginasové aktivity, při které se hydrolyticky štěpí asparagin za vzniku kyseliny asparagové a amoniaku. Pod písmenem B je znázorněna glutaminasová aktivita ASNasy, při které je hydrolyticky rozkládán glutamin za vzniku kyseliny glutamové a amoniaku. Převzato a upraveno. [59]

ASNasa se přirozeně vyskytuje v řadě mikroorganismů, rostlin a savců vyjma člověka. V roce 1967 byly objeveny dva izoenzymy, a to ASNasa I a ASNasa II. Oba tyto izoenzymy mají jak asparaginasovou aktivitu, tak glutaminasovou aktivitu. Rozdíl mezi těmito izoenzymy je především v afinitě a umístění [60]. ASNasa I je nízkoafinitní cytoplazmatický enzym, zatímco ASNasa II je periplazmatický enzym s vysokou afinitou. Pro léčbu ALL dětského věku se typicky používá izoenzym I a to buď z *Escherichia coli* nebo z *Erwinia chrysanthemi*. Při léčbě pouze pomocí ASNasy I dochází u dětských pacientů k úplné remisi u 40-60 % a rezistence na tuto léčbu se řadí mezi špatné prognostické faktory.[58]

U některých pacientů dochází k rezistenci vůči ASNase, avšak přesné mechanismy vzniku této rezistence nejsou dosud známé. U rezistentních leukemických buněk byla *in vitro* pozorována zvýšená exprese ASNS, ale u lidských pacientů se to neprokázalo [61]. Z výzkumu Remarkers-van Woerden vyšlo najevo, že leukemické buňky s fúzním proteinem TEL/AML jsou mnohem citlivější k léčbě pomocí ASNasy, přestože u nich dochází k vyšší expresi genu ASNS. Dle studií lze tedy předpokládat, že míra exprese genu ASNS hraje určitou roli v citlivosti k ASNase, ale určitě není jediným ovlivňujícím faktorem [62]. V posledních letech se přikládá velký význam hostitelským faktorům, jako je např. míra exprese ASNS v mezenchymálních buňkách kostní dřeně. Zvýšená exprese by mohla vykompenzovat nedostatek asparaginu v leukemických buňkách a vytvořit tak rezistenci vůči ASNase. [63]

1.3.3 Metabolismus argininu

Semiesenciální aminokyselina arginin hraje klíčovou roli během proliferace a syntézy proteinů. Dále je také prekurzorem kreatininu, prolinu a kyseliny glutamové. U některých nádorů byla prokázána neschopnost syntetizovat právě tuto aminokyselinu, čehož by se dalo využít k léčbě. [64]

Endogenní syntéza argininu může probíhat dvěma cestami. Více užívaná cesta začíná v tenkém střevě, ve kterém vzniká citrulin, např. z prolinu, glutaminu či kyseliny glutamové. Citrulin je transportován do ledvin, kde se zapojuje do močovinového cyklu za vzniku argininu. Enzymy katalyzující jeho vznik jsou argininosukcinátsynthasa (AS) a argininosukcinátlyasa (ASL). Druhou možností je syntéza argininu v játrech, kde se citrulin také mění na arginin. V játrech je ale vysoká koncentrace arginasy, která arginin opět rychle rozkládá. Degradaci argininu vyvolává hned několik enzymů, jako již zmíněná arginasa, nebo NO-synthasa, či arginindekarboxylasa. [64]

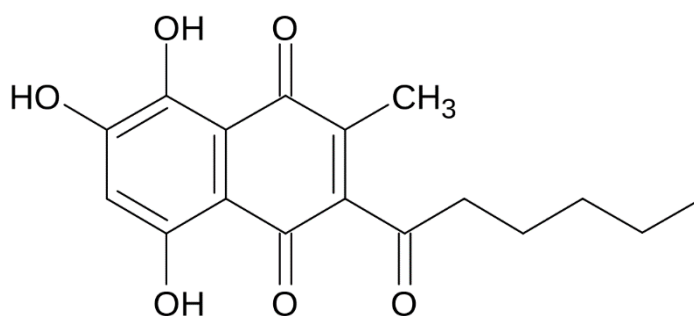
V řadě nádorových buněčných linií, jako je melanom, hepatocelulární karcinom či karcinom ledvin, byla zjištěna auxotrofie pro arginin. V těchto buňkách byla nízká exprese genu pro AS. Zvláštní ale je, že nebyly popsány nádorové buňky, ve kterých by byla nízká exprese ASL, důvod však zatím není znám [64]. AS by tak mohl být slibným prognostickým markerem, který by ukazoval citlivost na léčbu pomocí deprivace argininem. U některých buněk bylo vysvětleno umlčení genu pomocí methylace u jiných zase umlčení hypoxií indukovatelného faktoru α . U auxotrofních nádorů způsobuje deprivace argininem zastavení buněčného růstu až indukci apoptózy. [65]

Deprivace argininem se zdá být jako teoreticky vhodná cesta při léčbě, ale na druhé straně jeho dostatek pomáhá vyvolat imunitní odpověď hostitele. Dostupnost argininu se tak zdá být podstatným krokem při léčbě. Pro deprivaci terapie byly *in vitro* zkoumány celkem tři enzymy, a to arginasa, arginindeiminasa (ADI) a arginindekarboxylasa (ADC). Terapie za pomoci argininy byla testována už od roku 1950 na zvířatech, ale přestože testy *in vitro* vypadaly nadějně, později se tento přístup moc neosvědčil. Neúspěch byl nejspíše způsoben nízkou afinitou k argininu a vysokým pH optimem [64]. Mnohem atraktivněji se jeví ADI, enzym katalyzující přeměnu argininu na citrulin a amoniak. ADI působí za fyziologického pH a má vysokou afinitu k argininu. Kvůli nedostatečné expresi AS v nádorových buňkách, nedochází k přeměně citrulinu na arginin. Zdravé buňky však tuto schopnost neztratily a díky tomu nedochází

k tkáňové toxicitě. [65] Posledním hojně zkoumaným enzymem je ADC, která katalyzuje přeměnu argininu na agmatin a oxid uhličitý, což se také neprojevovalo jako slibné terapeutické činidlo. Agmatin za fyziologických podmínek nelze přeměnit na arginin, což zvyšuje cytotoxický účinek ve zdravých buňkách. [66]

1.4 Quambalarin B

Quambalarin B je sekundární metabolit produkovaný basidiomycetami *Quambalaria cyanescens*. Tento kmen byl poprvé izolován z lidské kůže v roce 1973. Strukturně se quambalarin B (QB) řadí mezi přírodní 1,4-naftochinony, což je skupina látek, která je nedílnou součástí tradičních medicín (viz obrázek 12). [67]



Obrázek 12 – Struktura quambalarinu B. Quambalarin B patří mezi přírodní 1,4-naftochinony a jeho systematický název je 3-hexanoyl-2,5,7,8-tetrahydroxy-1,4-naftochinon.

1,4-naftochinony jsou velmi známé pro celou škálu léčivých schopností. Byla u nich prokázána např. antibakteriální, antimykotická, antivirová i protizánětlivá schopnost. V 70. letech minulého století byl prováděn hromadný screening přírodních látek, mezi nimiž bylo i 1500 chinonů, kvůli potenciální protinádorové aktivitě [68]. Chinony v této studii byly identifikovány jako skupina látek s často se vyskytující cytotoxickou aktivitou. Jednou ze zkoumaných látek, u které byla prokázána cytotoxická aktivita, byl shikonin. Ten v menších dávkách dokázal kompletně zastavit akutní lymfoidní leukémii u myších modelů [69]. Další látkou, u které byla potvrzena cytotoxická aktivita je β -lapachon. Ten se ukázal být vhodným pro léčení několika typů rakovin u potkanů. Dobré výsledky vykazoval u Walkerova karcinomu prsu, karcinomu prostaty či u rakoviny vaječníků [70]. Není tedy překvapením, že quambalarin B, jakožto strukturně příbuzná látka vykazuje také protinádorovou aktivitu.

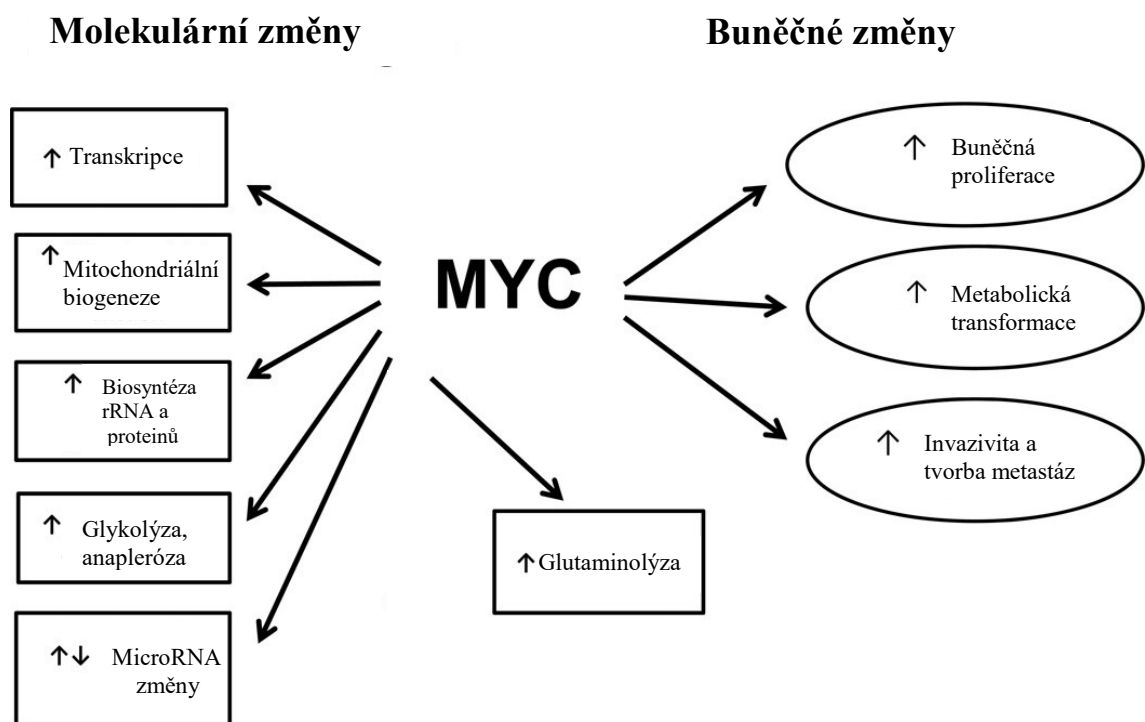
Cytotoxická aktivita 1,4-naftochinonů může být způsobena hned několika vlastnostmi. Chinony se často podílejí na redoxním cyklu a jednou z možných příčin cytotoxicity tak může být oxidační stres. Oxidoredukce chinonů indukuje produkci

reaktivních forem kyslíku, která může narušit buňky a způsobit tak buněčnou smrt nádorových buněk. 1,4-naftochinony mohou být redukovány několika NADP či NADPH oxidoreduktázami a mohou také způsobit narušení některých specifických funkcí. Dále některé 1,4-naftochinony byly potvrzeny jako inhibitory mitochondriálních respiračních komplexů. Dalším možným mechanismem je redukce chinonů *in vivo*, která dále způsobí eliminaci vhodně umístěné odstupující skupiny, díky čemuž vzniká silné alkylační činidlo. Takto vzniklý elektrofil může vychytávat buněčné nukleofily, jako je např. glutathion či DNA, což může mít za následek až buněčnou smrt. Cytotoxicita může být také způsobena inhibicí životně důležitých enzymů jako např. DNA topoizomerasy. Inhibiční aktivita u tohoto enzymu byla prokázána u shikoninu. Dále bylo zjištěno, že C2 a C3 nesubstituované naftochinony mohou vytvářet kovalentní modifikace s thioly nebo aminy biomolekul. Takovéto modifikace velmi často narušují správné fungování cílových molekul. Příkladem narušení správného fungování cílové molekuly je inhibice proteinové tyrosinfosfatasy kvůli modifikaci aktivního cysteinového zbytku. [69]

Grobárová a spol. ve své práci zkoumala cytotoxicitu QB pro jednotlivé leukemické linie a dále se také zaměřila na testování účinku QB na expresi *C-MYC* a to právě kvůli strukturní podobnosti mezi QB a shikoninem, u nějž byl pozorován účinek právě na tento protoonkogen. Cytotoxicita QB byla nejvyšší u leukemické linie Jurkat, což je linie zastupující akutní T-lymfoblastickou leukémií. Dále byla cytotoxická aktivita zkoumána u linie NALM6 (B-ALL) a REH (B-ALL), avšak u těchto linií byl účinek nižší. [71]

V další části práce Grobárové a spol. byl zkoumán vliv QB na expresi *C-MYC* protoonkogenu, který se podílí na buněčné proliferaci a ovlivňuje také metabolismus [71]. Expres *C-MYC* u zdravých buněk je přísně kontrolovaná, naopak u nádorových buněk je exprese deregulovaná a způsobuje např. nekontrolovatelnou proliferaci. Potlačení *in vitro* tohoto protoonkogenu u některých nádorových buněčných linií snižuje buněčnou proliferaci a někdy také indukuje apoptózu. *C-MYC* kóduje transkripční faktor leucinového zipu, který dimerizuje s transkripčním faktorem MAX. C-Myc transkripční faktor reguluje velkou škálu genů a jeho pleiotropní efekt pak ovlivňuje velmi podstatné aspekty buněčného života (viz obrázek 13, str. 36). Jedním z velmi důležitých cílových genů, který je přímo ovlivněn c-Myc transkripčním faktorem je laktátdehydrogenasa A (LDHA), která katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát a je tedy součástí glykolytické dráhy. Později bylo zjištěno, že c-Myc přímo ovlivňuje také glukózový transportér

GLUT1, hexokinasu 2, fosfofruktokinasu a enolasu 1. Upregulace těchto genů tedy dochází k zesílení Warburgova efektu. Nepřímo pak c-MYC ovlivňuje především glykolytický enzym pyruvátkinasu M2 (PKM2), který katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát, a také glutaminolytický enzym glutaminasu (GLS), který hydrolyticky deaminuje glutamin na kyselinu glutamovou. Při zkoumání vlivu QB na expresi C-MYC byla zjištěna snížená hladina tohoto genu a zároveň byla detekována výrazně nižší exprese LDHA a PKM2. Exprese GLS se však dle předpokladu snížila pouze u 2 ze 3 buněčných linií, a to u Jurkat a NALM6. [72][49]



Obrázek 13 – Pleiotropní efekt exprese genu c-Myc. Gen c-Myc má efekt na molekulární i buněčné změny. Na molekulární úrovni dochází ke zvýšené transkripci, mitochondriální biogenezi a ke zvýšené biosyntéze rRNA a proteinů. Dále také zvyšuje míru glykolýzy a glutaminolýzy. Na molekulární úrovni poté ještě působí na změny microRNA. Na buněčné úrovni pak dochází ke zvýšené buněčné proliferaci, metabolickým transformacím a ke zvýšené invazivitě a tvorbě metastáz. [49]

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo sledovat účinky přírodního 1,4-naftochinonu quambalarinu B na metabolismus aminokyselin u tří buněčných linií a to Jurkat, Ramos a THP-1, přičemž každá buněčná linie zastupuje jiný typ akutní leukémie. Metabolismus byl sledován měřením jednak intracelulárního a jednak extracelulárního množství jednotlivých aminokyselin a sledováním jeho změny po aplikaci quambalarinu B.

3 Použitý materiál a přístroje

3.1 Buněčné linie

- Jurkat E6.1 – lidské T lymfocyty akutní lymfoblastické leukémie – Merck (Německo)
- Ramos – lidské B lymfocyty akutní lymfoblastické leukémie – Merck (Německo)
- THP-1 – lidské monocyty akutní lymfoblastické leukémie – Merck (Německo)

3.2 Přístroje a vybavení

- AccQ Tag kolona 3,9x150 mm Waters (USA)
- Automatické pipety Eppendorf (Německo)
- Automatické počítadlo buněk Luna II™ Automated Cell Counter Logos Biosystems (USA)
- Centrifuga Centrifuge 5424 R Eppendorf (Německo)
- Centrifuga MiniSpin Plus Eppendorf (Německo)
- Centrifugační zkumavky s kónickým dnem P-Lab (ČR)
- CO₂ inkubátor
- Dělená pipeta P-Lab (ČR)
- HPLC Prominence Shimadzu (Japonsko)
- Kultivační destička 6 jamek 9,60 cm² P-Lab (ČR)
- Kultivační láhev 75 cm², 150 cm² P-Lab (ČR)
- Laminární box SafeFAST Classic FASTER (Itálie)
- Mikrozkušavky P-Lab (ČR)
- Nástavec na pipety Pipetus Merck (Německo)
- Plastové špičky na pipety P-Lab (ČR)
- Počítací komůrky Luna™ Cell Counting Slides Logos Biosystems (USA)
- Rotátor Thermo Fisher Scientific (USA)
- Sonikační lázeň S30H Elmasonic
- Termostat Eppendorf ThermoMixer C Thermo Fisher Scientific (USA)
- UHPLC UltiMate 3000 Dionex (USA)

- Vakuový koncentrátor a odstředivý evaporátor Concentrator plus Eppendorf (Německo)
- Vialky Thermo Fisher Scientific (USA)
- Vodní lázeň Biosan (USA)
- Vortex V-1 plus Biosan (USA)

3.3 Chemikálie

- Acetonitril Merck (Německo)
- AccQTag Eluent A Waters (USA)
- AccQTag Reagent A, 2A, 2B Waters (USA)
- Amino Acid (AA) Standard 2,5 mM Waters (USA)
- DMSO Sigma (USA)
- Fetální hovězí sérum (FBS) Sigma (USA)
- Chloroform Sigma (USA)
- Kyselina aminomáselná Sigma (USA)
- Merkaptoethanol Sigma (USA)
- Methanol Merck (Německo)
- Norleucin Sigma (USA)
- Penicilin Sigma (USA)
- Quambalarin B prof. Miroslav Flieger, MBÚ
AVČR, v.v.i.
- Streptomycin Sigma (USA)
- Trypan blue stain Sigma (USA)
- Voda W4502-1L Sigma (USA)

3.4 Roztoky

- PBS – pH 7,4
 - Voda
 - Hydrogenfosforečnan sodný 10 mmol/l
 - Chlorid sodný 137 mmol/l
- 10x ředěný Eluent A od firmy Waters (USA)
- RPMI médium s L-Glu od firmy Lonza (Švýcarsko)

3.5 Software

- Chromeleon
- MS Excel
- Numbers
- LabSolution

Thermo Fisher Scientific (USA)

Microsoft (USA)

Apple (USA)

Shimadzu (Japonsko)

4 Metody

4.1 Kultivace buněk

Pro tuto práci byly použity tři buněčné linie, a to buněčná linie Jurkat, Ramos a THP-1. Jurkat je buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie lidských T lymfocytů. Ramos zde zastupuje akutní lymfoblastickou leukémií lidských B lymfocytů a THP-1 je buněčná linie akutní myeloidní leukémie lidských monocytů. Celá práce s buňkami byla prováděna v laminárním boxu SafeFAST classic. Buňky byly pěstovány v BioWhittaker® RPMI médiu s L-glutaminem, do kterého bylo přidáno 10% FBS, streptomycin o koncentraci 100 mg/l a penicilin v množství 100 000 U/l. Do média, ve kterém byla kultivována buněčná linie THP-1 byl přidán 0,05 M merkaptoethanol. Koncentrace buněk při počátku kultivace byla 100 000 buněk/ml, přičemž buňky byly kultivovány v 75 cm³ kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% oxidu uhličitého.

4.2 Pasážování buněk

Pasážování buněk je prováděno přenesením části buněk do jiné kultivační láhve s novým RPMI médiem, přičemž se provádí kvůli tomu, že po určité době dochází k vyčerpání živin v médiu. K buněčné linii THP-1 byl opět do média přidán 0,05M merkaptoethanol. Pasážování bylo prováděno dle potřeby, jediným požadavkem bylo, aby buněčná hustota nepřesáhla 1 000 000 buněk/ml, přičemž buňky byly počítány v automatické počítačce buněk Luna II™. Počítání bylo prováděno smícháním 10 µl vzorku s 10 µl barviva trypan blue v počítací komůrce Luna™ cell counting slides. V počítací komůrce dále byla spočítána životaschopnost buněk. Buňky byly dále kontrolovány pod mikroskopem.

4.3 Ošetření buněk quambalarinem B

Po dostatečném namnožení buněk byly buňky opětovně spočítány a vypočteno množství potřebné pro dosažení koncentrace 1 000 000 buněk/ml pro 10 ml suspenze. Výpočet byl proveden dle rovnice 1.

$$\frac{c \cdot V_{celk.}}{n_{živých b.}} = V$$

(1)

Celý postup ošetření QB byl prováděn v duplikátech. Bylo odebráno vypočítané množství do 25 ml plastových centrifugačních zkumavek s kónickým dnem. Vzorky byly centrifugovány při 400×g po dobu 4 minut. V dalším kroku bylo odebráno dvakrát 5 ml média, a to pro kontrolní vzorek a vzorek ošetřený quambalarinem B do kultivační destičky a zbytek média byl vylit. Poté bylo k buňkám na dně zkumavky přidáno 10 ml nového média a buňky v něm byly resuspendovány. Dále bylo do kultivační destičky pipetováno dvakrát 5 ml od každé buněčné linie, a to pro kontrolní buňky a buňky ošetřené QB. Vzorky byly poté 1 hodinu ponechány v kultivátoru při 37 °C a atmosféře 5% oxidu uhličitého. Po ustálení byly do jedné poloviny vzorků přidány 2 µl 5mM roztoku QB rozpuštěném v DMSO a do druhé byly přidány 2 µl samotného DMSO. Buňky byly ponechány po dobu 24 hodin v kultivátoru za stejných kultivačních podmínek.

4.4 Sklizení buněčných kultur

Po uplynutí 24 hodin po ošetření QB byly z každého vzorku odebrány 2 ml a přeneseny do mikrozkušavek. Na přístroji Luna IITM byla spočítána životaschopnost buněk stejným postupem jako při počítání buněk. Následně byly vzorky centrifugovány při 400×g a 20 °C po dobu 4 minut. Z centrifugovaných vzorků byl odebrán 1 ml a zbytek média byl vylit. Odebraný 1 ml bude sloužit k zjištění aminokyselinového složení v médiu. Vzorky médií byly dále centrifugovány při 20 000×g po dobu 8 minut a poté byl opatrně odpipetován 1 ml bez usazené pelety, který byl následně zamražen. K buněčným vzorkům byl přidán 1 ml PBS, ve kterém byly buňky promyty. Znovu byly vzorky centrifugovány při 400×g a 20 °C po dobu 4 minut, poté bylo PBS odebráno. V dalším kroku byly buňky resuspendovány v 300 µl směsi chloroform:methanol v objemovém poměru 2:1. Vzorky byly po dobu 10 minut míchány na rotátoru v 1,5 ml mikrozkušavkách. Poté bylo přidáno 300 µl ledové vody a 300 µl chloroformu. Směs byla promíchána ve vortexu a sonikována v sonikační lázni po dobu 10 minut. Následně byly vzorky centrifugovány na 15 000×g po dobu 5 minut při 20 °C ve stolní centrifuze. Po centrifugaci byly již patrné dvě fáze, a to fáze vodná a organická. Pro další analýzu byly fáze dále zpracovány a připraveny vzorky pro HPLC.

4.5 Příprava vzorků pro aminokyselinovou analýzu

Vzorky pro aminokyselinovou analýzu s fluorescenční detekcí byly připraveny za použití AccQ-Tag Chemistry kit dle protokolu od firmy Waters [73].

Zamražené vzorky byly rozmrazeny a vysušené byly dále rozpuštěny v 10 μ l borátového pufru. Dále bylo připraveno derivatizační činidlo AccQ Fluor Reagent podle instrukcí výrobce.

Do mikrozkušavek bylo pipetováno 5 μ l vzorku (buněčné kultury, média, AA standardu) a 35 μ l borátového pufru obohaceného o vnitřní standard (norleucin a/nebo kyselinu α -aminomáselnou). Dále bylo přidáno 10 μ l derivatizačního činidla a roztok se krátce promíchal. Po uplynutí 1 minuty během které proběhla reakce se mikrozkušavky přenesly do termostatu vytemperovaného na 55 °C. V termostatu byly mikrozkušavky ponechány 10 minut a tím se zastavila reakce derivatizace. Obsah mikrozkušavek byl následně přenesen do vialek a vzorky tak byly připraveny k aminokyselinové analýze.

4.6 Aminokyselinová analýza

Aminokyselinová analýza s následnou fluorescenční detekcí byla prováděna na chromatografech UHPLC UltiMate 3000 a HPLC Prominence vybavených fluorescenčním detektorem. Pro separaci aminokyselin byla použita kolona AccQ-Tag amino acid analysis a kolonový prostor byl temperován na 37°C. Pro separaci se využívá binárního koncentračního gradientu (viz tabulka 2), a to mobilní fáze A a B. Mobilní fáze A je 10 \times ředěný komerčně dodávaný Eluent A a mobilní fáze B je 60% acetonitril.

Tabulka 1 – Koncentrační gradient pro analýzu s fluorescenční detekcí. V tabulce je zaznamenán časový průběh procentuálního koncentračního gradientu mobilní fáze A a mobilní fáze B, přechody mezi jednotlivými kroky jsou lineární.

| Čas [min] | %A | %B |
|-----------|-----|-----|
| 0,0 | 100 | 0 |
| 0,5 | 98 | 2 |
| 15,0 | 93 | 7 |
| 19,0 | 90 | 10 |
| 32,0 | 67 | 33 |
| 34,0 | 0 | 100 |
| 41,5 | 100 | 0 |
| 50,0 | 100 | 0 |

Doba jedné analýzy byla 50 minut přičemž průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/min. Objem nanášeného vzorku byl 5 μ l. Byla měřena emisní vlnová délka 395 nm s excitací při 250 nm. Fotonásobič byl na obou přístrojích nastaven na základní nejnižší hodnotu.

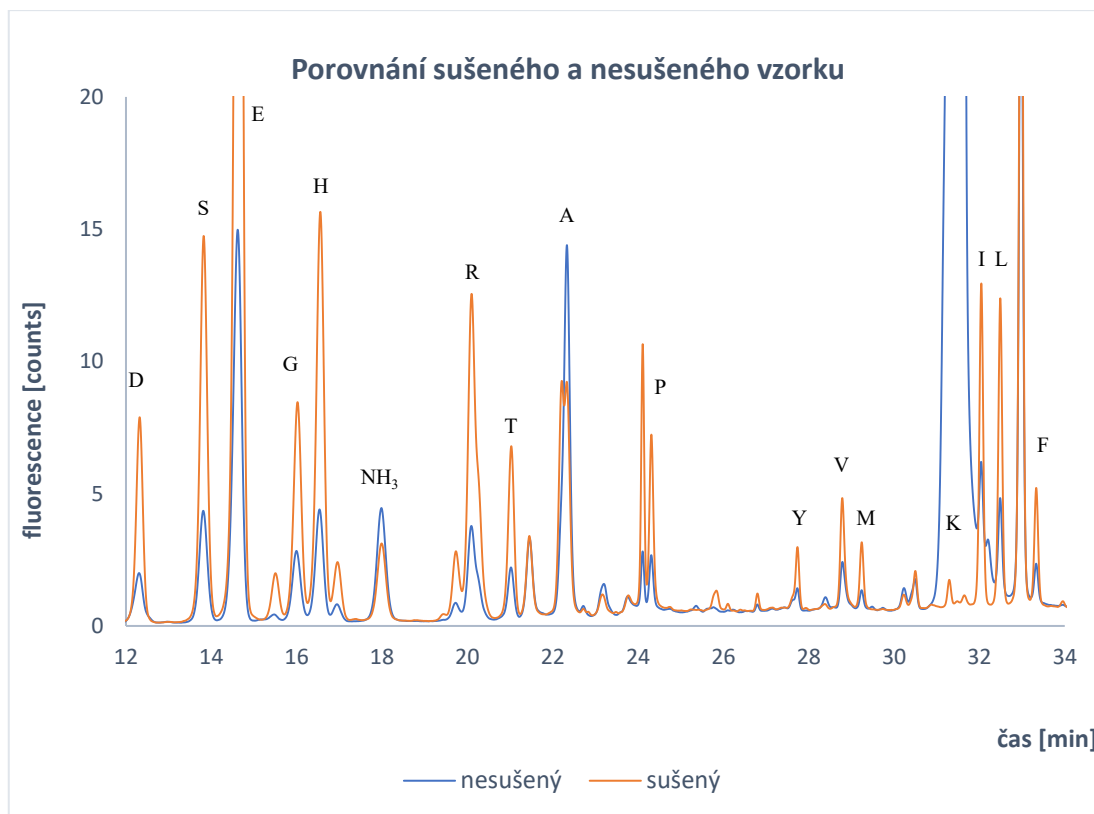
5 Výsledky

5.1 Zpracování výsledků

Naměřená data byla dále zpracována v programu Chromeleon od firmy Thermo Fisher či v programu LabSolutions od firmy Shimadzu. V těchto programech byly nastavené jednotlivé chromatografické parametry, jako např. eluční čas pro automatické přiřazení chromatografického vrcholu k jednotlivým aminokyselinám. Dále byly plochy jednotlivých vrcholů přepočítány na látkové množství či koncentraci dle kalibrační křivky aminokyselinových standardů. Automatické přiřazení bylo vždy překontrolováno a popřípadě byly chyby opraveny. Takto zpracovaná data byla následně exportována a dále vyhodnocována v programu Excel od firmy Microsoft, kde byly výsledky normalizovány pomocí vnitřního standardu a dále vyhodnoceny.

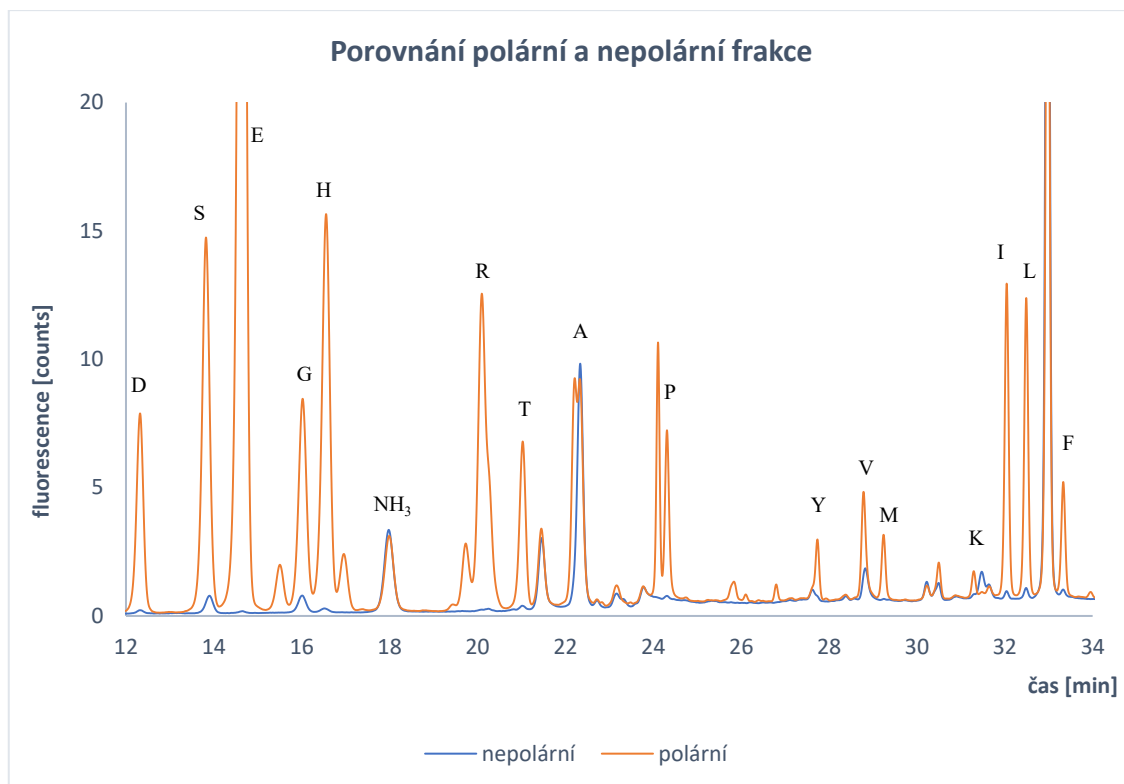
5.2 Optimalizace přípravy vzorků

V první řadě byla zkoumána optimální příprava vzorků. Nejprve jsme se zaměřili na uchování vzorků, tedy zdali je vhodné vzorky pouze zamrazit či nejprve vysušit a až poté zamrazit. Porovnali jsme si tedy chromatogramy vysušených a nevysušených vzorků. Výsledek je zobrazen na obrázku 14, str. 43. Z chromatogramu lze vyzorovat, že u vysušeného vzorku je vyšší fluorescence, tedy vyšší látkové množství jednotlivých aminokyselin a menší obsah nežádoucích chromatografických vrcholů. Jediný problémový chromatografický vrchol se vyskytuje hned za alaninovým chromatografickým vrcholem, který do něj zasahuje a znemožňuje tak spolehlivou kvantifikaci alaninu. U nevysušeného vzorku se objevuje stejný problém s alaninem, ale v tomto případě se dva chromatografické vrcholy spojily v jeden. Další problém nastává kolem 31. minuty, kdy se eluuje nám neznámá fluoreskující látka, která překrývá vrchol lysinu. Díky tomuto pozorování jsme pro další práci používali vzorky vysušené.



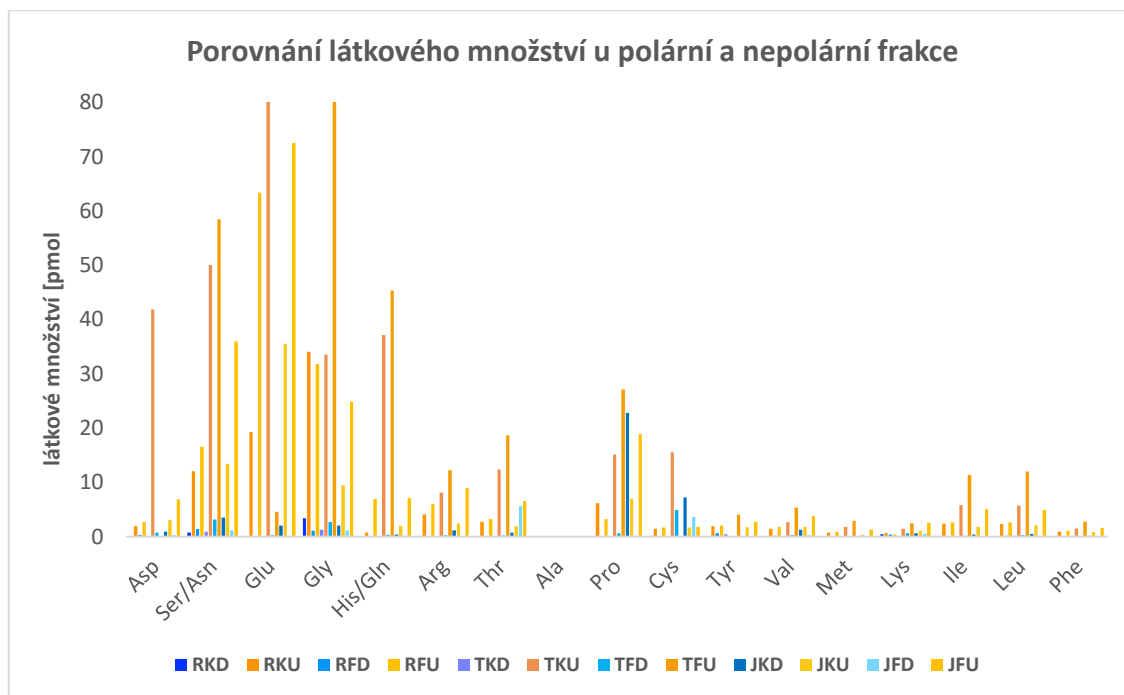
Obrázek 14 - Porovnání chromatogramů vysušeného a nevysušeného vzorku. Modrá křivka zastupuje závislost fluorescence na čase u nesusušeného vzorku, oranžová pak znázorňuje stejnou závislost ale u vzorku sušeného. Jednotlivé aminokyseliny jsou označeny jednopísmennou zkratkou. Lze pozorovat vyšší odezvu u jednotlivých aminokyselin u sušeného vzorku, naopak u nesusušeného vzorku můžeme pozorovat větší odezvu nežádoucích látek. Nejvíce problémový je chromatografický vrchol kolem 31. minuty u nesusušeného vzorku, který dále zasahuje do chromatografických vrcholů lysinu a částečně do vrcholu isoleucinu.

V dalším kroku bylo zjišťováno množství aminokyselin v polární a nepolární fázi. Porovnání dvou chromatogramů, a to specificky chromatogramů polární a nepolární fáze u buněčné linie Jurkat je znázorněno na obrázku 15, str. 44. Z chromatogramu lze vyčíst, že v polární frakci je mnohonásobně vyšší množství aminokyselin a pouze malé množství nepolárních aminokyselin přešlo do nepolární frakce.



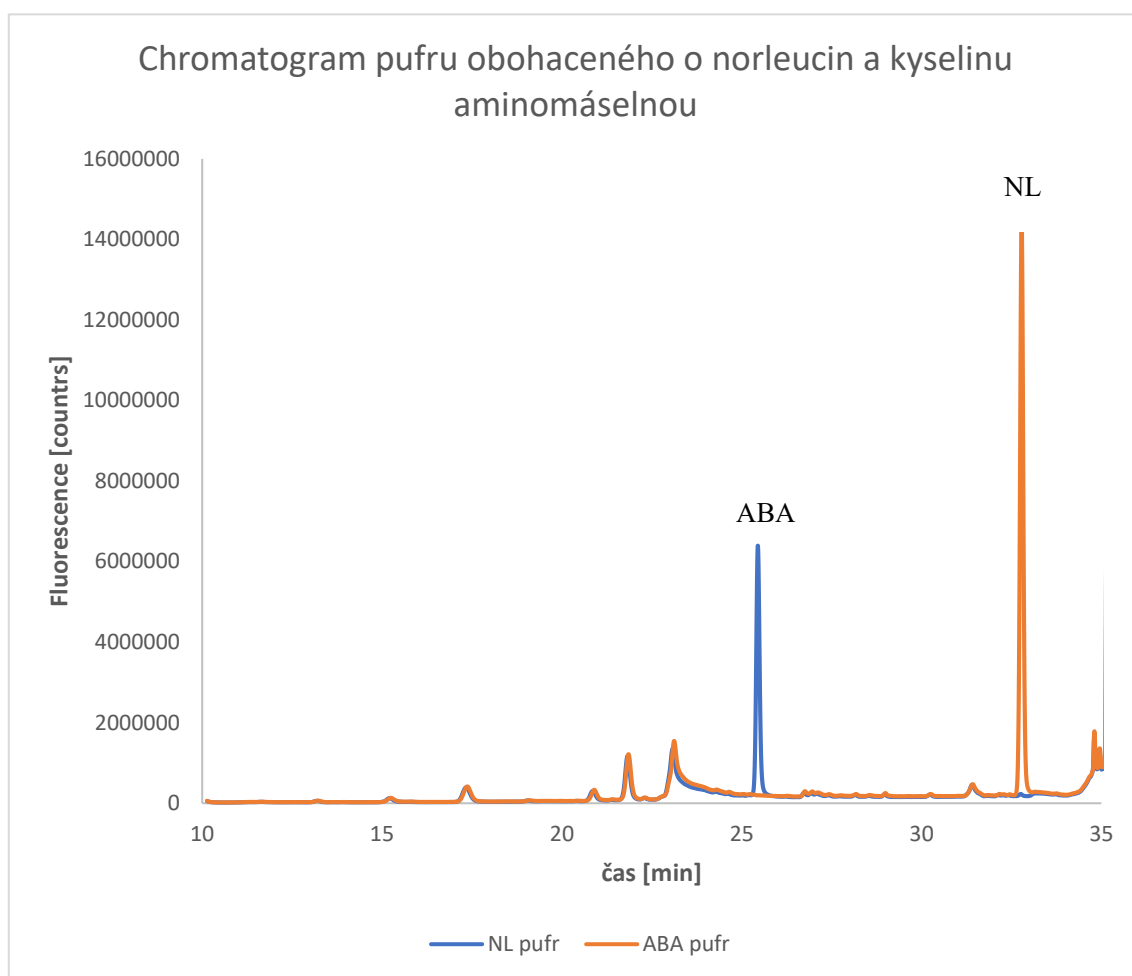
Obrázek 15 – Porovnání chromatogramů nepolární a polární frakce. Graf znázorňuje závislost fluorescence v čase. Modře znázorněná je nepolární frakce a oranžově zbarvená je frakce polární. Jednotlivé vrcholy aminokyselin jsou označeny jednopísmennou zkratkou. Z porovnání obou chromatogramů je patrné, že takřka všechno množství aminokyselin se nachází v polární frakci a do polární frakce přešlo jen nepatrné množství aminokyselin.

Dále bylo pro jistotu měření dolní nepolární frakce (D) a horní polární frakce (U) provedeno pro všechny buněčné linie, a to Ramos (R), THP-1 (T) a Jurkat (J), přičemž měření bylo provedeno jak pro kontrolu (K), tak pro vzorky ošetřené quambalarinem B (F). Na obrázku 16 je znázorněno aminokyselinové zastoupení v jednotlivých vzorcích. U všech buněčných linií lze pozorovat trend, který byl u buněčné linie Jurkat, a tedy v polární frakci zůstaly všechny aminokyseliny až na menší množství nepolárních aminokyselin, které přešlo do nepolární frakce. Jediná aminokyselina, která se vyskytla ve větší míře v nepolární frakci, je prolin u kontrolního vzorku buněčné linie Jurkat. U ostatních vzorků je však množství zanedbatelné. Z vyhodnocení je vyloučen alanin, a to díky výše zmíněné nežádoucí látce s podobným elučním časem znemožňující jeho spolehlivé vyhodnocení. Díky těmto poznatkům jsme pro další měření využili pouze horní polární fáze.



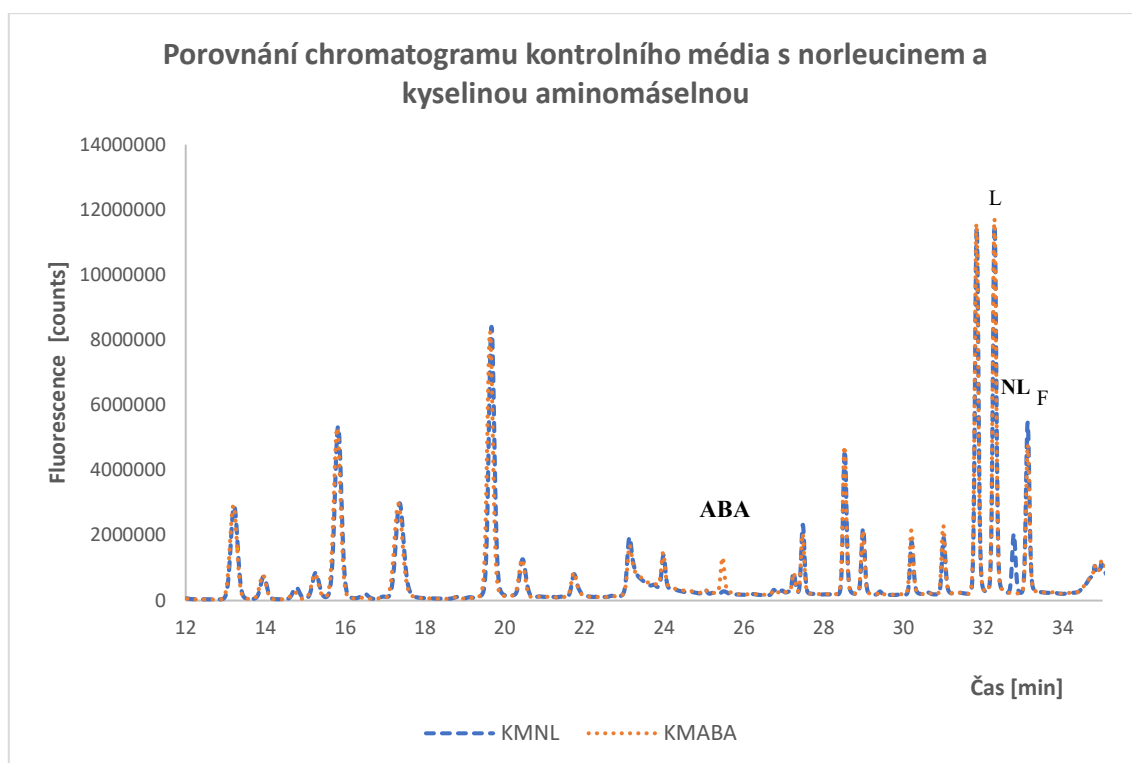
Obrázek 16 – Porovnání látkového množství aminokyselin u polární a nepolární frakce. V grafu je znázorněno látkové množství jednotlivých aminokyselin u všech buněčných linií, a to u kontrolních vzorků a vzorků ošetřených quambalarinem B. Písmeno R značí buněčnou linii Ramos, písmeno T buněčnou linii THP-1 a písmeno J buněčnou linii Jurkat. Písmenem K jsou označeny kontrolní vzorky a písmenem F vzorky ošetřené quambalarinem. Vzorky označeny písmenem D jsou odebrány ze spodní nepolární frakce a vzorky označeny písmenem U jsou odebrány z vrchní polární frakce. Pro lepší znázornění jsou veškeré vzorky odebrané z horní frakce zbarveny do oranžova, zatímco vzorky z frakce nepolární jsou zbarveny do modrých odstínů. Z grafu je patrné, že aminokyseliny jsou zastoupeny převážně v polární frakci. Jedinou výjimku představuje prolin a cystein, který částečně přešel i do nepolární frakce.

Poslední optimalizace přípravy vzorků se týkala vnitřního standardu. Bylo zjišťováno, zdali je vhodnější použití norleucinu či kyseliny α -aminomáselné jako vnitřního standardu. Nejprve byla provedena analýza s borátovým pufrem obohaceným buď o kyselinu aminomáselnou nebo o norleucin (50 pmol každé látky), aby byl zjištěn eluční čas daných sloučenin (viz obrázek 17 na str. 46).



Obrázek 17 – Časová závislost fluorescence borátového pufru obohaceného kyselinou α -aminomáselnou a norleucinem. Na obrázku je oranžově znázorněn chromatogram vnitřního standardu kyseliny aminomáselné. Eluční čas této látky je 25,5 min. Modře zbarvený je chromatogram vnitřního standardu norleucinu, jehož eluční čas je 32,8 min.

Dalším krokem bylo porovnání reprezentativního vzorku, kterým byl vzorek kontrolního média s dvěma různými vnitřními standardy (viz obrázek 18). Na obrázku lze pozorovat, že se kyselina aminomáselná eluuje v čase, ve kterém nedochází k eluci jiných aminokyselin, zatímco norleucin má eluční čas blízký leucinu a fenylalaninu. Z toho důvodu byl pro další práci vybrán vnitřní standard tvořený kyselinou aminomáselnou.



Obrázek 18 – Porovnání chromatogramu kontrolního média s norleucinem a kyselinou α -aminomáselnou. Na obrázku jsou vyznačené dvě závislosti fluorescence na čase u vzorku kontrolního média (KM). Modrá znázorňuje vzorek s norleucinovým vnitřním standardem a oranžová vnitřní standard kyseliny aminomáselné. Kyselina aminomáselná se eluuje kolem 25. minuty a v její blízkosti nedochází k eluci dalších aminokyselin. Norleucin má eluční čas ve 33. minutě, ale těsně před ním dochází k eluci leucinu a těsně za ním k eluci fenylalaninu.

5.3 Buněčná linie Jurkat

První zkoumanou linií byla buněčná linie Jurkat. Buňky byly spočítány a z daných hodnot byla vypočítána životaschopnost buněk jak u buněk kontrolních, tak u buněk ošetřených quambalarinem B (viz tabulka 3).

Tabulka 2 – Porovnání životaschopnosti kontrolních buněk a buněk ošetřených quambalarinem B. Životaschopnost byla vypočítána z celkového počtu buněk děleného počtem živých buněk.

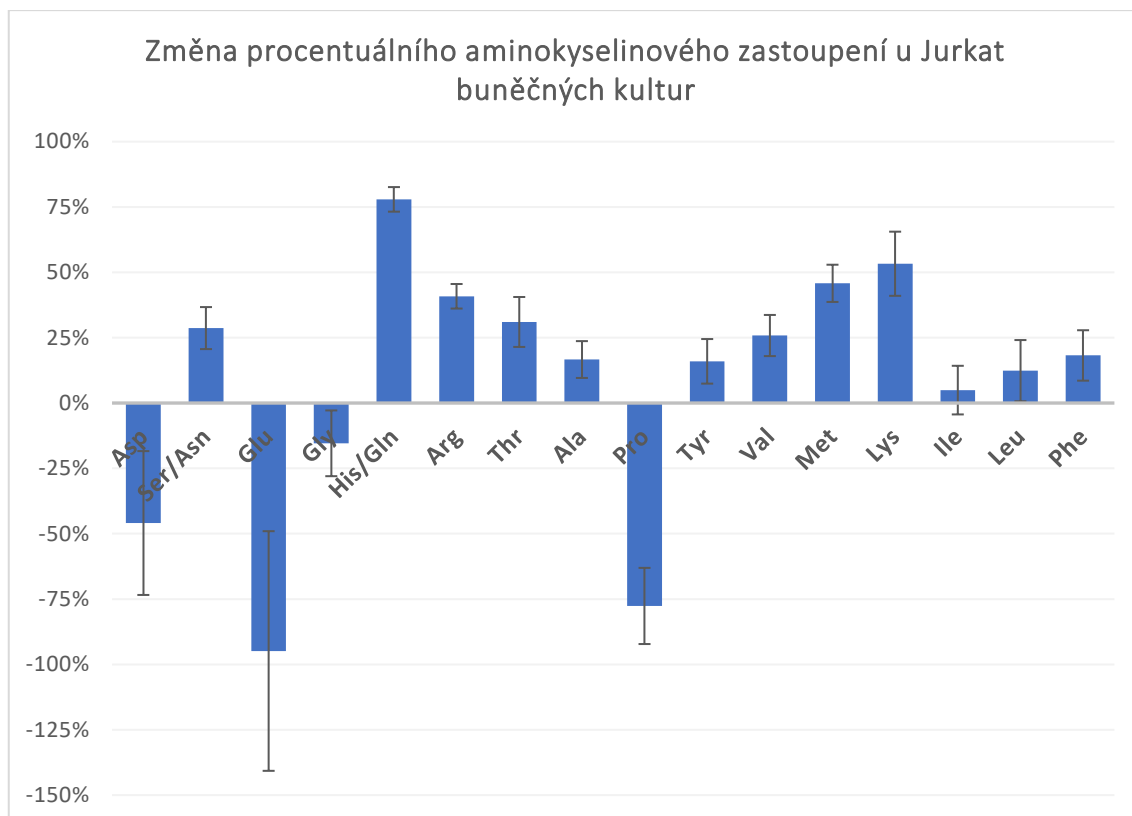
| | Kontrolní buňky | Buňky ošetřené QB |
|-----------------|-----------------|-------------------|
| Životaschopnost | 84,1 % | 60,8 % |

Dále byla provedena aminokyselinová analýza polárních frakcí buněčných kultur. Přepočítaná látková množství z plochy chromatografických vrcholů jsou zaznamenána v tabulce 4. Z dat byl vypočítán procentuální nárůst či úbytek jednotlivých aminokyselin

a data byla zprůměrována. Pro lepší přehlednost byl z naměřených hodnot vytvořen graf (viz obrázek 19).

Tabulka 3 – Přepočítaná látková množství u vzorků buněčných kultur Jurkat a vypočítaná procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. (J - buněčná linie Jurkat, K – kontrolní vzorky, F – vzorky ošetřené quambalarinem B, C – vzorky buněčných kultur, 1,2 – číslo vzorku)

| | JKC1 [pmol] | JFC1 [pmol] | JKC2 [pmol] | JFC2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Asp | 218 | 126 | 78 | 66 | -73 | -18 | -46 |
| Ser/Asn | 532 | 670 | 252 | 398 | 21 | 37 | 29 |
| Glu | 2266 | 941 | 821 | 551 | -14 | -49 | -95 |
| Gly | 664 | 519 | 361 | 351 | -28 | -3 | -15 |
| His/Gln | 82 | 473 | 32 | 122 | 83 | 73 | 78 |
| Arg | 132 | 207 | 89 | 164 | 36 | 46 | 41 |
| Thr | 126 | 160 | 58 | 98 | 21 | 41 | 31 |
| Ala | 83 | 92 | 25 | 33 | 10 | 24 | 17 |
| Pro | 529 | 275 | 283 | 173 | -92 | -63 | -78 |
| Tyr | 47 | 51 | 27 | 36 | 7 | 24 | 16 |
| Val | 59 | 72 | 32 | 49 | 18 | 34 | 26 |
| Met | 24 | 40 | 12 | 25 | 39 | 53 | 46 |
| Lys | 23 | 39 | 6 | 18 | 41 | 66 | 53 |
| Ile | 124 | 119 | 57 | 66 | -4 | 14 | 5 |
| Leu | 118 | 119 | 51 | 67 | 1 | 24 | 12 |
| Phe | 40 | 44 | 22 | 31 | 9 | 28 | 18 |

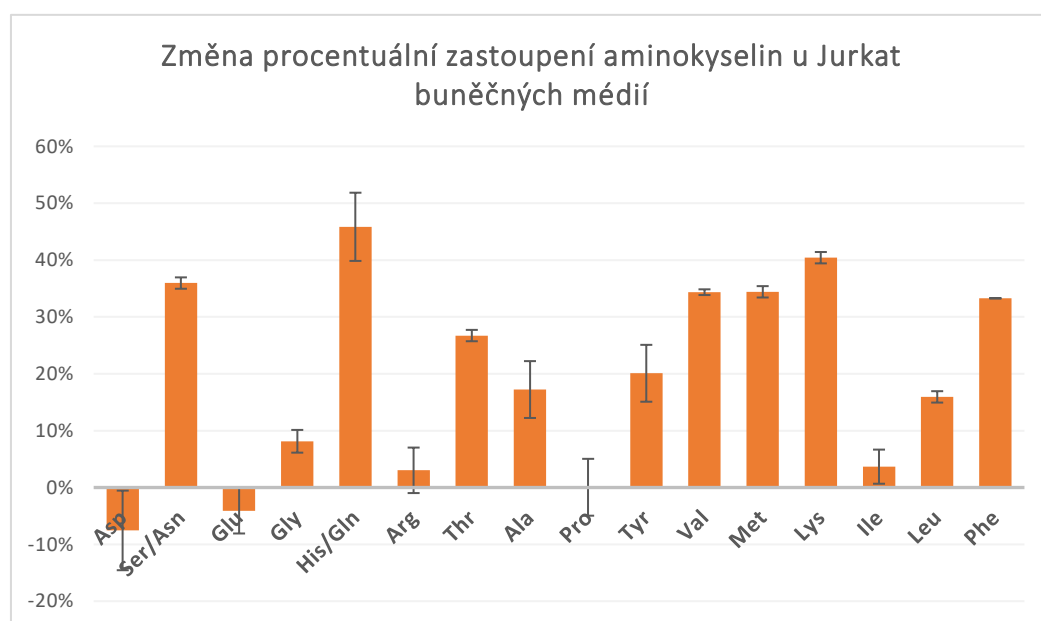


Obrázek 19 – Procentuální změna obsahu aminokyselin u kontrolních buněk a buněk ošetřených quambalarinem B. Poměrně velký pokles lze pozorovat u kyseliny asparagové a glutamové a dále u prolinu. U kyseliny asparagové a glutamové lze pozorovat poměrně velkou výběrovou směrodatnou odchylku, která ukazuje rozptyl naměřených dat u dvou různých vzorků. Nárůst jsme zaznamenali především u serinu/asparaginu, histidinu/glutaminu, argininu, threoninu, methioninu a lysinu.

Měření probíhalo také u buněčných médií, ve kterých se zkoumalo extracelulární aminokyselinové složení. Naměřená data byla opět přepočítána na látkové množství a vypočítána změna obsahu aminokyselin (viz tabulka 5, obrázek 20).

Tabulka 4 – Přepočítaná látková množství a procentuální změna obsahu aminokyselin v Jurkat buněčném médiu. (J – buněčná linie Jurkat, K – kontrolní vzorky, F – vzorky ošetřené quambalarinem B, M – vzorky média, 1,2 – číslo vzorku)

| | JKM-1 [pmol] | JFM-1 [pmol] | JKM-2 [pmol] | JFM-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Asp | 152 | 150 | 168 | 148 | -1 | -14 | -8 |
| Ser/Asn | 314 | 485 | 254 | 400 | 35 | 37 | 36 |
| Glu | 260 | 261 | 284 | 262 | 0 | -8 | -4 |
| Gly | 171 | 189 | 149 | 160 | 10 | 6 | 8 |
| His/Gln | 344 | 570 | 174 | 362 | 40 | 52 | 46 |
| Arg | 807 | 871 | 697 | 688 | 7 | -1 | 3 |
| Thr | 100 | 134 | 88 | 122 | 26 | 28 | 27 |
| Ala | 78 | 83 | 72 | 86 | 13 | 22 | 17 |
| Pro | 153 | 162 | 144 | 137 | 5 | -5 | 0 |
| Cys | 239 | 222 | 197 | 194 | -8 | -2 | -5 |
| Tyr | 76 | 101 | 72 | 86 | 25 | 15 | 20 |
| Val | 90 | 137 | 75 | 116 | 34 | 35 | 34 |
| Met | 46 | 71 | 40 | 60 | 35 | 34 | 34 |
| Lys | 94 | 156 | 80 | 135 | 40 | 41 | 40 |
| Ile | 230 | 245 | 208 | 210 | 6 | 1 | 4 |
| Leu | 211 | 254 | 183 | 215 | 17 | 15 | 16 |
| Phe | 55 | 82 | 45 | 67 | 33 | 33 | 33 |



Obrázek 20 – Změna procentuálního zastoupení aminokyselin u Jurkat buněčných médií. Z grafu je patrné, že u buněk ošetřených quambalarinem B došlo k nárůstu serinu/asparaginu, histidinu/glutaminu, threoninu, tyrosinu, valinu, methioninu, lysinu a fenylalaninu.

5.4 Buněčná linie Ramos

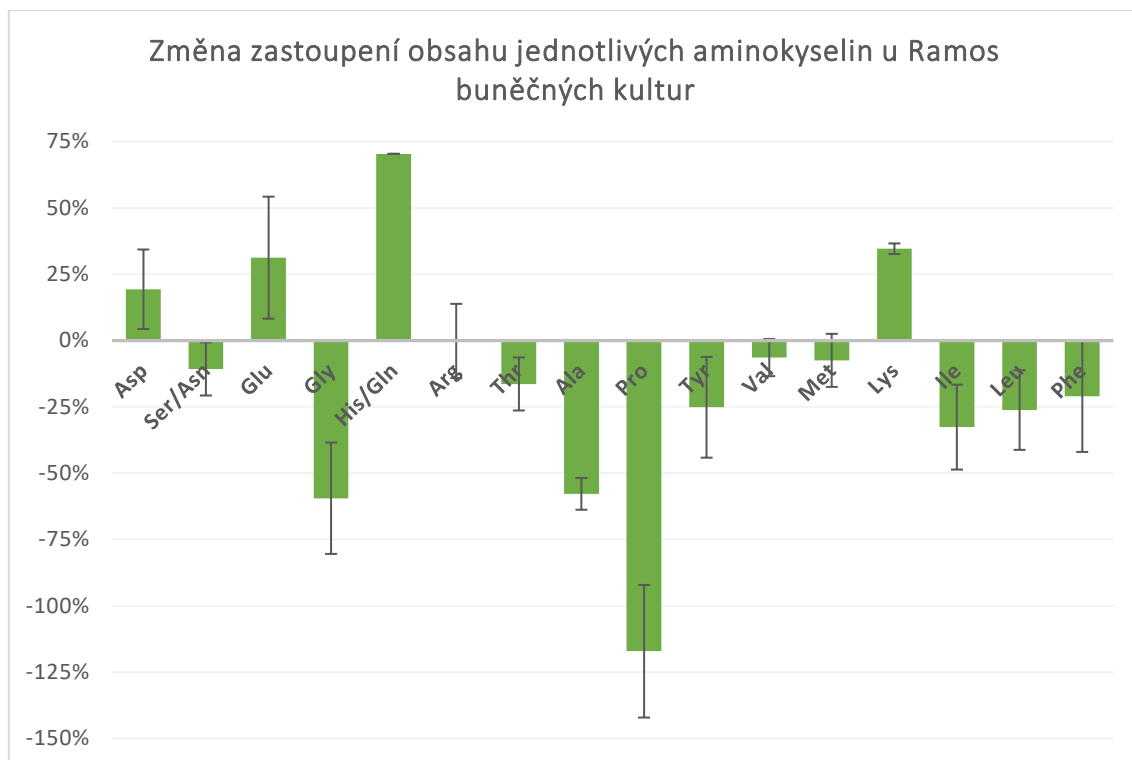
Další zkoumanou linií byla buněčná linie Ramos. Stejně jako u předešlého měření byla vypočítána životaschopnost buněk po užití quambalarinu B (viz tabulka 6). A následně byla přepočítána plocha chromatografických vrcholů na látkové množství a vypočítána procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin u vzorků buněčných kultur (viz tabulka 7 a obrázek 21).

Tabulka 5 – Porovnání životaschopnosti u kontrolních buněk a buněk ošetřených quambalarinem B.

| | Kontrolní buňky | Buňky ošetřené QB |
|-----------------|-----------------|-------------------|
| Životaschopnost | 71,1 % | 47,1 % |

Tabulka 6 – Látková množství jednotlivých buněčných kultur a následně vypočítaná změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. V tabulce jsou zaznamenána naměřená látková množství a dále přepočítána procentuální změna obsahu aminokyselin u kontrolních buněk a buněk ošetřených quambalarinem B. Procentuální změna je dále zprůměrována. Zaznamenané hodnoty patří celkem čtyřem vzorkům. (R – buněčná linie Ramos, K – kontrolní vzorky, F – vzorky ošetřené quambalarinem B, C – vzorky buněčných kultur, 1,2 – číslo vzorku)

| | RKC-1 [pmol] | RFC-1 [pmol] | RKC-2 [pmol] | RFC-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Asp | 99 | 103 | 30 | 46 | 4 | 35 | 19 |
| Ser/Asn | 526 | 437 | 214 | 212 | -20 | -1 | -11 |
| Glu | 956 | 1036 | 241 | 532 | 8 | 55 | 31 |
| Gly | 1406 | 775 | 607 | 441 | -81 | -38 | -59 |
| His/Gln | 102 | 339 | 37 | 129 | 70 | 71 | 70 |
| Arg | 356 | 313 | 111 | 128 | -14 | 14 | 0 |
| Thr | 165 | 131 | 67 | 63 | -27 | -6 | -16 |
| Ala | 242 | 148 | 84 | 55 | -63 | -52 | -58 |
| Pro | 310 | 128 | 131 | 69 | -143 | -92 | -117 |
| Tyr | 88 | 61 | 35 | 33 | -44 | -6 | -25 |
| Val | 85 | 74 | 29 | 29 | -14 | 1 | -6 |
| Met | 50 | 43 | 23 | 23 | -18 | 3 | -7 |
| Lys | 37 | 56 | 9 | 14 | 33 | 36 | 35 |
| Ile | 164 | 111 | 50 | 43 | -49 | -17 | -33 |
| Leu | 156 | 110 | 46 | 42 | -41 | -11 | -26 |
| Phe | 70 | 49 | 28 | 28 | -43 | 1 | -21 |

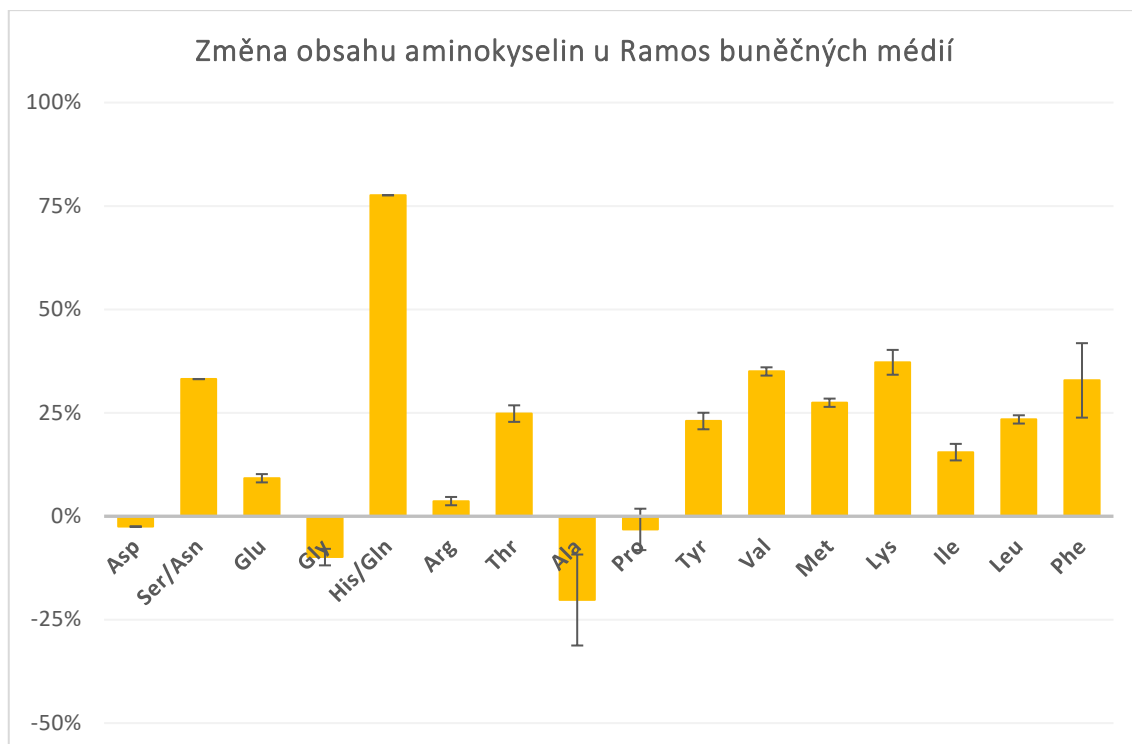


Obrázek 21 – Procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin u vzorků buněčných kultur Ramos. V grafu je zaznamenána průměrná změna zastoupení aminokyselin s chybovou úsečkou. Z grafu je patrné, že pokles byl zaznamenán především u glycinu, alaninu, prolinu, tyrosinu, isoleucinu a leucinu. Nárůst byl zaznamenán u kyseliny glutamové, histidinu/glutaminu a lysinu.

Naměřená a přepočítaná látková množství vzorků médií buněčné linie Ramos jsou zaznamenána v tabulce 8 i s vypočítanými hodnotami procentuální změny zastoupení u kontrolní buněk a buněk ošetřených quambalarinem B. Data byla následně zprůměrována a byl vytvořen graf zaznamenávající průměrnou změnu obsahu aminokyselin (viz obrázek 22, str. 54).

Tabulka 7 – Naměřená a přepočítána data z měření Ramos buněčných médií. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty látkového množství a procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. (R – buněčná linie Ramos, K – kontrolní vzorek, F – vzorek ošetřený quambalarinem B, M – buněčné médium, 1,2 – číslo vzorku)

| | RKM-1 [pmol] | RFM-1 [pmol] | RKM-2 [pmol] | RFM-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Asp | 146 | 144 | 162 | 157 | -2 | -3 | -3 |
| Ser/Asn | 329 | 488 | 293 | 443 | 33 | 34 | 33 |
| Glu | 239 | 260 | 236 | 263 | 8 | 10 | 9 |
| Gly | 249 | 230 | 248 | 222 | -8 | -12 | -10 |
| His/Gln | 117 | 506 | 80 | 368 | 77 | 78 | 78 |
| Arg | 830 | 860 | 716 | 745 | 3 | 4 | 4 |
| Thr | 101 | 138 | 94 | 122 | 27 | 23 | 25 |
| Ala | 186 | 170 | 208 | 159 | -9 | -31 | -20 |
| Pro | 164 | 167 | 154 | 142 | 1 | -8 | -3 |
| Tyr | 75 | 101 | 79 | 99 | 25 | 21 | 23 |
| Val | 92 | 143 | 87 | 133 | 36 | 34 | 35 |
| Met | 56 | 78 | 53 | 72 | 28 | 26 | 27 |
| Lys | 104 | 174 | 105 | 160 | 40 | 34 | 37 |
| Ile | 204 | 238 | 185 | 223 | 14 | 17 | 15 |
| Leu | 196 | 252 | 177 | 235 | 22 | 24 | 23 |
| Phe | 59 | 87 | 54 | 81 | 33 | 33 | 33 |



Obrázek 22 – Procentuální změna obsahu aminokyselin u Ramos buněčných médií. V grafu jsou zaznamenány průměrné hodnoty změny zastoupení u vzorků buněčných médií. V grafu lze pozorovat nárůst serinu/asparaginu, histidinu/glutaminu, threoninu, valinu, methioninu, lysinu a fenylalaninu.

5.5 Buněčná linie THP-1

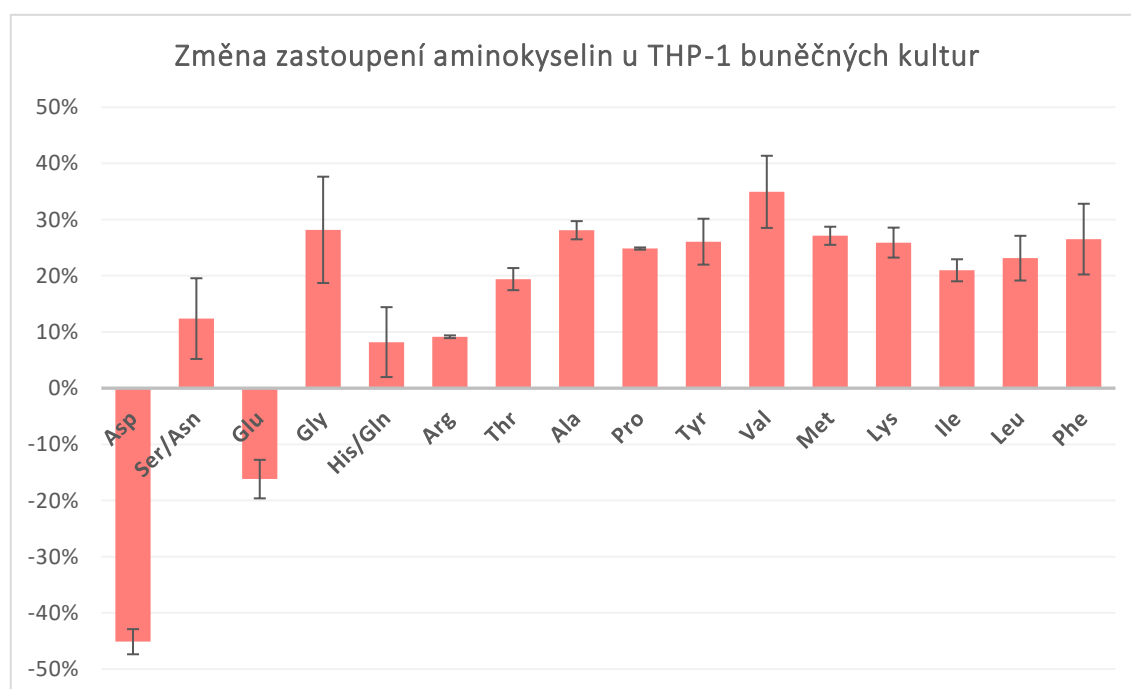
U vzorků THP-1 byla vypočítána životaschopnost buněk (viz tabulka 9). Následně byla provedena aminokyselinová analýza buněčných kultur. V tabulce 10 jsou zaneseny data z tohoto měření a vypočítaná změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. Z těchto hodnot byl poté vytvořen graf zprůměrovaných hodnot (viz obrázek 23, str. 55). Dále byla provedena analýza buněčných médií, ve kterých byly buňky THP-1 pěstovány. Naměřená data jsou zaznamenána v tabulce 11 a obrázku 24 na straně 56.

Tabulka 8 – Životaschopnost kontrolních buněk a buněk ošetřených quambalarinem B.

| | Kontrolní buňky | Buňky ošetřené QB |
|-----------------|-----------------|-------------------|
| Životaschopnost | 82,3 % | 73,3 % |

Tabulka 9 – Látková množství a procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin u THP-1 buněčných kultur. (T – buněčná linie THP-1, K – kontrolní vzorky, F – vzorky ošetřené quambalarinem B, C – vzorky buněčných kultur, 1,2 – číslo vzorku)

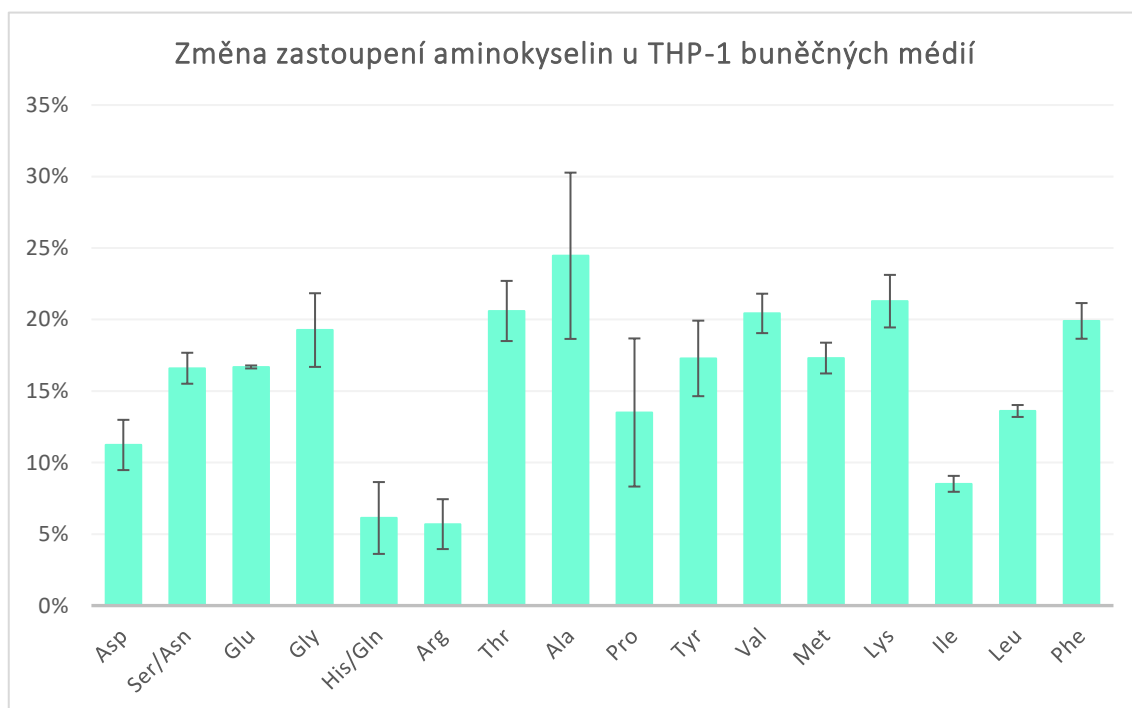
| | TKC-1 [pmol] | TFC-1 [pmol] | TKC-2 [pmol] | TFC-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| Asp | 430 | 291 | 283 | 198 | -47 | -43 | -45 |
| Ser/Asn | 885 | 1101 | 458 | 483 | 20 | 5 | 12 |
| Glu | 3243 | 2877 | 1753 | 1465 | -13 | -20 | -16 |
| Gly | 1620 | 1993 | 516 | 827 | 19 | 38 | 28 |
| His/Gln | 1072 | 1252 | 448 | 458 | 14 | 2 | 8 |
| Arg | 268 | 296 | 121 | 133 | 9 | 9 | 9 |
| Thr | 275 | 350 | 133 | 161 | 21 | 17 | 19 |
| Ala | 123 | 175 | 59 | 80 | 30 | 26 | 28 |
| Pro | 296 | 395 | 130 | 172 | 25 | 25 | 25 |
| Tyr | 95 | 122 | 39 | 56 | 22 | 30 | 26 |
| Val | 84 | 117 | 29 | 50 | 29 | 41 | 35 |
| Met | 56 | 75 | 27 | 38 | 26 | 29 | 27 |
| Lys | 29 | 38 | 10 | 13 | 23 | 29 | 26 |
| Ile | 178 | 220 | 65 | 84 | 19 | 23 | 21 |
| Leu | 188 | 233 | 64 | 88 | 19 | 27 | 23 |
| Phe | 79 | 100 | 30 | 45 | 20 | 33 | 27 |



Obrázek 23 – Průměrná změna zastoupení aminokyselin u THP-1 buněčných kultur. Pokles byl zaznamenán u kyseliny asparagové a glutamové. Naopak nárůst byl zaznamenán u glycinu, alaninu, prolinu, tyrosinu, valinu, methioninu, lysinu a fenylalaninu.

Tabulka 10 – Látková množství a změna procentuálního zastoupení aminokyselin u vzorků ošetřených quambalarinem B a vzorků kontrolních u buněčných médií THP-1. (T – buněčná linie THP-1, K – kontrolní vzorky, F – vzorky ošetřené quambalarinem B, M – vzorky buněčných médií)

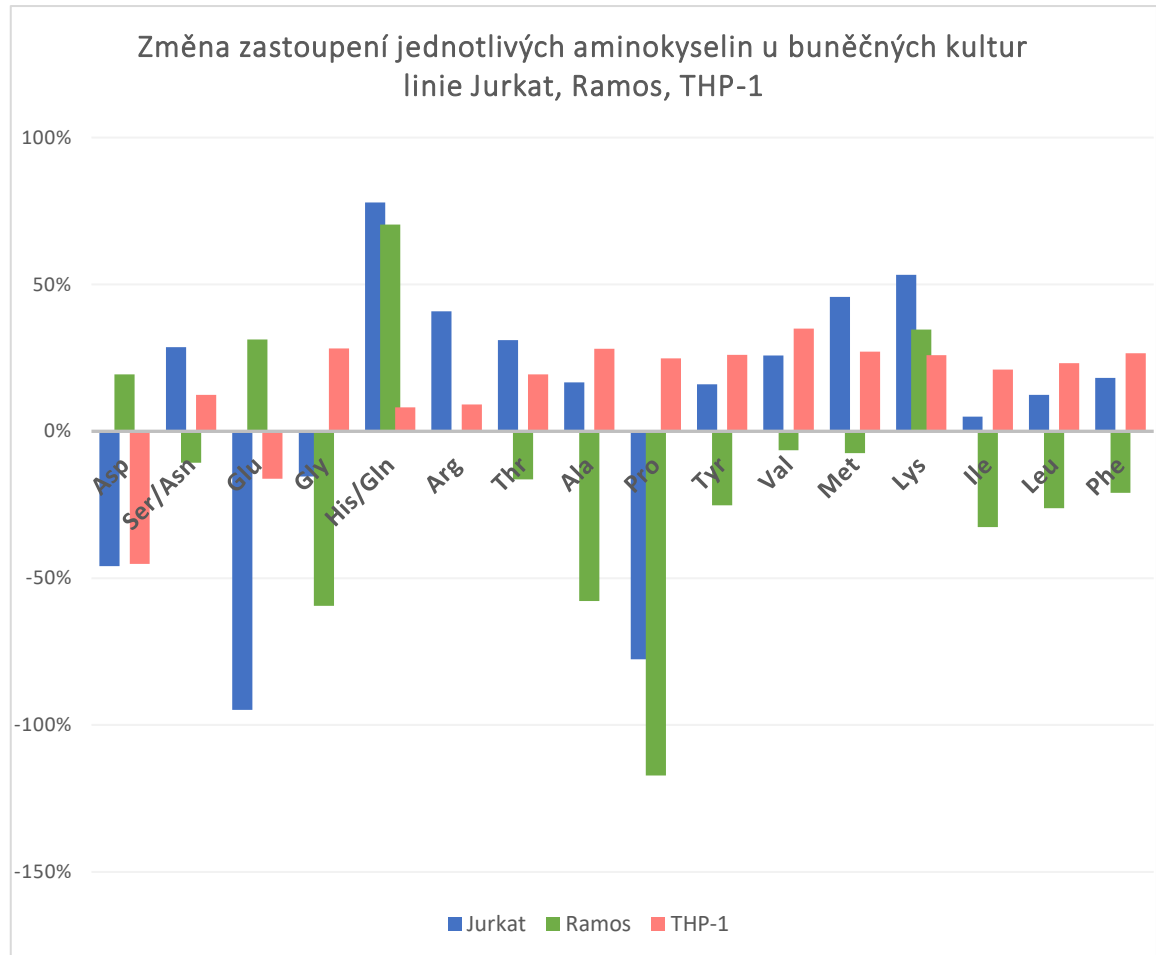
| | TKM-1 [pmol] | TFM-1 [pmol] | TKM-2 [pmol] | TFM-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| Asp | 113 | 130 | 120 | 133 | 13 | 9 | 11 |
| Ser/Asn | 294 | 357 | 227 | 269 | 18 | 16 | 17 |
| Glu | 287 | 344 | 284 | 342 | 17 | 17 | 17 |
| Gly | 241 | 290 | 223 | 286 | 17 | 22 | 19 |
| His/Gln | 480 | 525 | 322 | 334 | 9 | 4 | 6 |
| Arg | 796 | 860 | 701 | 730 | 7 | 4 | 6 |
| Thr | 115 | 142 | 93 | 121 | 18 | 23 | 21 |
| Ala | 83 | 102 | 76 | 109 | 19 | 30 | 24 |
| Pro | 137 | 149 | 110 | 135 | 8 | 19 | 14 |
| Tyr | 79 | 93 | 71 | 89 | 15 | 20 | 17 |
| Val | 115 | 142 | 97 | 124 | 19 | 22 | 20 |
| Met | 61 | 73 | 53 | 65 | 16 | 18 | 17 |
| Lys | 129 | 160 | 112 | 145 | 19 | 23 | 21 |
| Ile | 235 | 258 | 209 | 227 | 9 | 8 | 9 |
| Leu | 229 | 264 | 197 | 229 | 13 | 14 | 14 |
| Phe | 66 | 81 | 55 | 70 | 19 | 21 | 20 |



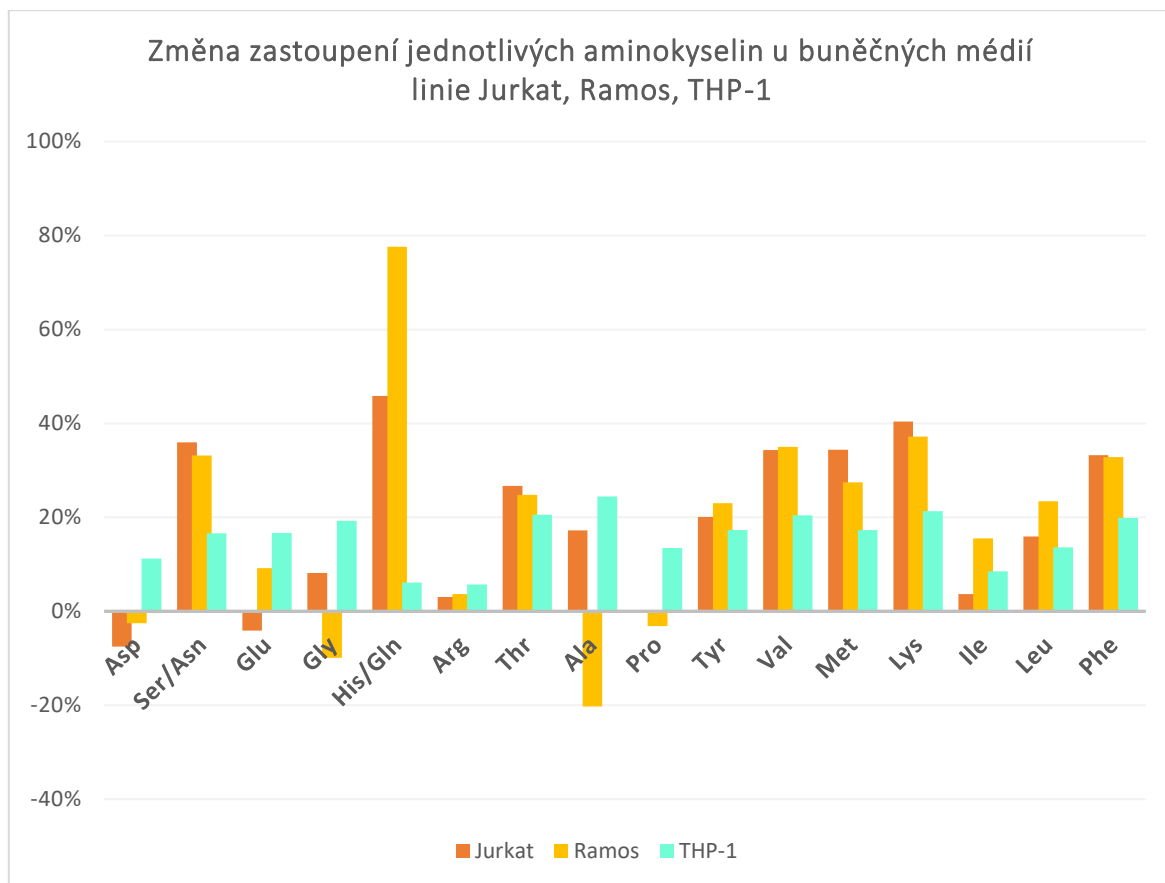
Obrázek 24 - Průměrná změna zastoupení aminokyselin u THP-1 buněčných médií. Je zaznamenán rozdíl obsahu aminokyselin u kontrolních vzorků a vzorků ošetřených quambalarinem B. Nárůst lze pozorovat především u alaninu.

5.6 Porovnání jednotlivých buněčných linií

Pro lepší přehlednost byly následně porovnány intracelulární i extracelulární změny aminokyselinového složení u jednotlivých buněčných linií. Na obrázku 25 je znázorněna procentuální změna intracelulárních hladin jednotlivých aminokyselin, zatímco na obrázku 26, str. 58 je znázorněna změna extracelulárních hladin.



Obrázek 25 – Procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin u buněčných kultur linie Jurkat, Ramos a THP-1. Modře znázorněná je buněčná linie Jurkat, zeleně buněčná linie Ramos a červeně buněčná linie THP-1.



Obrázek 26 – Procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselin u buněčných médií linie Jurkat, Ramos a THP-1. Oranžové zbarvení má buněčné linie Jurkat, žluté linie Ramos a tyrkysovou barvu má linie THP-1.

5.7 Buněčná média

Poslední testované vzorky byly samotná RPMI média obohacená o L-glutamin, přičemž opět byl vzorek kontrolní a vzorek ošetřený quambalarinem B. Stejně jako u předešlých vzorků byla přepočítána z kalibrační přímky látková množství jednotlivých aminokyselin a vypočítána procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. Vypočítané hodnoty byly zprůměrovány a zapsány do tabulky 12.

Tabulka 11 – Naměřená a přepočítaná látková množství buněčných médií a procentuální změna zastoupení jednotlivých aminokyselin. (M – RPMI médium, K – kontrolní vzorky, F - vzorky ošetřené quambalarinem B)

| | MK-1 [pmol] | MF-1 [pmol] | MK-2 [pmol] | MF-2 [pmol] | Změna zastoupení AMK – 1 [%] | Změna zastoupení AMK – 2 [%] | Průměrná změna [%] |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Asp | 146 | 131 | 153 | 164 | 7 | -12 | -3 |
| Ser/Asn | 555 | 493 | 478 | 519 | 8 | -13 | -2 |
| Glu | 178 | 158 | 167 | 179 | 6 | -13 | -3 |
| Gly | 160 | 143 | 142 | 154 | 8 | -12 | -2 |
| His/Gln | 760 | 681 | 573 | 621 | 8 | -12 | -2 |
| Arg | 875 | 784 | 714 | 773 | 8 | -12 | -2 |
| Thr | 156 | 140 | 139 | 149 | 7 | -11 | -2 |
| Ala | 91 | 83 | 98 | 85 | -15 | -10 | -13 |
| Pro | 153 | 135 | 134 | 132 | -1 | -14 | -7 |
| Tyr | 112 | 100 | 99 | 98 | -1 | -11 | -6 |
| Val | 176 | 156 | 157 | 170 | 8 | -12 | -2 |
| Met | 88 | 78 | 77 | 81 | 4 | -13 | -4 |
| Lys | 191 | 166 | 169 | 187 | 10 | -15 | -3 |
| Ile | 318 | 283 | 282 | 305 | 8 | -12 | -2 |
| Leu | 330 | 295 | 292 | 317 | 8 | -12 | -2 |
| Phe | 95 | 85 | 84 | 91 | 7 | -12 | -2 |

6 Diskuze

První část této práce byla zaměřená na optimalizaci přípravy vzorků. Nejprve bylo potřeba zjistit, jak vzorky uchovávat, zdali vysušené a zamražené či pouze zamražené. U nesušeného vzorku byla menší odezva u aminokyselin a vyšší odezva u nežádoucích látek. Tento jev mohl být způsoben např. reziduální aktivitou enzymů, proto se dále pracovalo pouze se vzorky vysušenými. Dále byl zkoumán obsah aminokyselin v polární a nepolární frakci, které byly vytvořeny resuspendací buněčných kultur ve směsi chloroform:methanol a chloroform:voda. Z obrázku 19 na straně 48 je patrné, že většina aminokyselin zůstala v polární frakci, a proto jsem dále pracovala pouze s touto frakcí. Avšak malá část aminokyselin přešla i do fáze nepolární, což mohlo způsobovat menší odchylky. Nicméně je pravděpodobné, že tento podíl zůstával konstantní, takže výsledky nejspíš výrazně neovlivnil. Jedinou výraznější výjimkou byl prolin v případě buněčné linie Jurkat. Vzhledem k absenci této aminokyseliny v nepolární fázi ve všech ostatních případech však šlo v tomto případě spíše o experimentální chybu. Posledním krokem optimalizace byla volba vnitřního standardu. Rozhodovalo se mezi norleucinem a kyselinou α -aminomáselnou. Byla provedena analýza pufrů obohacených o tyto aminokyseliny, aby byl zjištěn jejich eluční čas. Dále byla analýza provedena s reprezentativními vzorky a kvůli elučnímu času norleucinu, který byl příliš blízký elučnímu času leucinu a fenylalaninu, byla pro vnitřní standard použita kyselina α -aminomáselná, jejíž eluční čas nezasahoval do žádné jiné aminokyseliny.

Poté přišla na řadu analýza samotných vzorků. Již první měřený údaj, kterým byla životaschopnost buněk, ukazuje, že quambalarin B určitým způsobem ovlivňuje schopnost buněk přežít a je pro ně tedy cytotoxický. Z výsledků je patrné, že došlo k výraznému snížení životaschopnosti u buněčné linie Jurkat a Ramos a to o 24 %. U buněčné linie THP-1 sice došlo také ke snížení, ale o pouhých 9 %. Toto pozorování však bylo provedeno pouze dvakrát, a proto by bylo vhodné experiment zopakovat a potvrdit tak naměřená data. Výrazné snížení životaschopnosti u buněčné linie Jurkat nebylo překvapením, jelikož Grobárová a spol. při zkoumání cytotoxicity této látky došli k závěru, že nejcitlivější buněčná linie ze tří zkoumaných (Jurkat – T-ALL, REH – pre-B-ALL, NALM6 – B-ALL) je právě buněčná linie Jurkat [71]. Překvapením však byla buněčná linie Ramos, zastupující Burkittův lymfom, která dosáhla stejného snížení životaschopnosti, přestože se jedná také o B-ALL. Rozdíl mezi liniemi REH, NALM6 a

Ramos je nejen zralost lymfocytů, ale také např. věk pacienta. U buněčné linie NALM6 se jedná o B-ALL dospělého věku, zatímco buněčná linie Ramos zastupuje B-ALL dětského věku.

Při porovnání změn aminokyselinového zastoupení intracelulární a extracelulární hladiny u jednotlivých buněčných linií (obrázek 26, str. 57 a obrázek 27, str. 58) lze pozorovat, že quambalarin B působí na každou buněčnou linii jiným způsobem, avšak mohou být pozorovány některé podobnosti, a to hlavně u buněčné linie Jurkat a THP-1. Buněčná linie Ramos se ve většině případů výrazně odlišuje, ovšem za povšimnutí v těchto souvislostech stojí výrazně nižší viabilita buněk i bez ošetření quambalarinem B. Za nárůst či pokles množství aminokyselin byl v této práci stanoven minimální rozdíl 20 %, rozdíly pod tuto mez jsou zde považovány za méně věrohodné. Ačkoliv přesnost měření se zdá být poměrně vysoká, což ukazuje např. vnitřní standard, který udává že reprodukovatelnost nástřiku je s chybou do 1 %, rozdíly mohly vzniknout už při přípravě vzorků. Kvůli poměrně vysokým odchylkám v duplikátech a nedostatečnému množství opakování experimentu byla tedy pro mez zvolena vyšší hodnota. V dalším zkoumání by bylo vhodné použít vnitřní standard již při sklizení buněk, abychom si ověřili opakovatelnost přípravy vzorků, přičemž by mohl být použit norleucinový vnitřní standard díky kterému by bylo možné porovnat ztráty během zpracování. Chybové úsečky u jednotlivých grafů ukazují, že maximální odchylka u buněčných médií je do 10 %, ale u buněčných kultur je podstatně vyšší, ale v průměru do 20 %. U některých aminokyselin by tato mez mohla být ještě vyšší a to např. u kyseliny glutamové, glycinu či prolinu. Pro přesnější vyhodnocování by tedy bylo vhodné experiment ještě několikrát zopakovat, což by umožnilo při vyhodnocení použít statistické metody, ale to kvůli časovým a přístrojovým důvodům nebylo možné.

Nyní se podíváme detailněji na změny jednotlivých aminokyselin. U buněčné linie Jurkat a THP-1 lze pozorovat takřka stejný pokles intracelulárního aspartátu a to o přibližně 50 %. Tento pokles mohl způsobit inhibici buněčné proliferace [74]. U buněčné linie Ramos však ke změně nedošlo. Extracelulární hladina u všech tří buněčných linií je také nezměněna.

Další zkoumanou aminokyselinou je serin a asparagin. Kvůli stejnému detekčnímu času tyto aminokyseliny od sebe nelze rozlišit a zkoumat mechanismus účinku quambalarinu B na tyto aminokyseliny je obtížné, proto by v dalším bádání mohla být využita aminokyselinová analýza s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Tato metoda

má však také nevýhody, a to například menší citlivost a až několikařádrový rozdíl v citlivosti pro různé aminokyseliny. Dalším možným řešením tohoto problému je, že při použití fluorescenční detekce by byly vzorky inkubovány s asparinasou, popřípadě s kyselinou chlorovodíkovou, která asparagin případně glutamin u dvojice histidin/glutamin převede na kyselinou asparagovou či glutamovou. Porovnáním výsledků vzorků bez a po použití kyseliny chlorovodíkové bychom zjistili podíl asparaginu či glutaminu.

Intracelulární hladina těchto aminokyselin se zvýšila pouze u linie Jurkat, u ostatních zůstala nezměněna. Extracelulární hladina se zvýšila jak u linie Jurkat tak u linie Ramos, THP-1 zůstala nezměněna. Z tohoto pozorování lze předpokládat, že quambalarin B nepůsobí na žádnou z těchto aminokyselin u linie THP-1, jelikož se nezměnilo množství intracelulární ani extracelulární a je velmi nepravděpodobné, že by se jejich změny v našem vyhodnocení přesně kompenzovaly. Můžeme předpokládat, že zvýšená extracelulární hladina může být způsobena sníženým příjmem asparaginu, jakožto oblíbené živiny leukemických buněk. Akumulace těchto aminokyselin může být vysvětlena např. opětovným zapojením glykolytického toku, autofagií či inhibicí syntézy proteinů [74].

Množství glutamátu se změnilo především v buněčných kulturách linie Jurkat. Pokles této aminokyseliny dosahoval 95 %. Naopak u buněčné linie Ramos lze pozorovat nárůst přibližně o 30 % a u buněčné linie THP-1 nedošlo k žádným změnám. Extracelulární hladina zůstala stejná u všech linií. Snížená hladina intracelulárního glutamátu objevující se u buněčné linie Jurkat a nezměněná extracelulární hladina značí, že se nezvýšil export této aminokyseliny ven z buňky, ale snížená hladina byla způsobena vnitřními procesy. Jedním z vysvětlení může být snížená hladina GLS, což by naznačovala i zvýšená hladina glutaminu. Fakt, že quambalarin B ovlivňuje hladinu některých enzymů pozorovala ve své práci již Grobárová a spol., přičemž tento fakt vysvětluje tím, že quambalarin B ovlivňuje expresi C-MYC protoonkogenu a tím nepřímo ovlivňuje některé enzymy jako právě GLS či pyruvátkinasu M2 (PKM2) [71]. U buněčné linie Ramos však došlo k intracelulárnímu nárůstu této aminokyseliny, což může naznačovat třeba prostou kumulaci této aminokyseliny. Quambalarin B zjevně neovlivňuje metabolismus glutamátu u buněčné linie THP-1.

Dalšími zajímavými aminokyselinami jsou glutamin a histidin, které od sebe nelze rozlišit, stejně jako tomu bylo u serinu a asparaginu. U buněčné linie Jurkat a Ramos lze

pozorovat zvýšené hladiny glutaminu či histidinu jak v buněčných médiích, tak u buněčných kultur. U buněčné linie THP-1 nedošlo k žádným změnám. Nyní budeme předpokládat, že k navýšení došlo díky glutaminu a metabolismus histidinu není ovlivněn. Tento předpoklad byl zvolen kvůli tomu, že v odborné literatuře se v této souvislosti o ovlivňování metabolismu histidinu nehovoří, zatímco glutamin je často jednou z ústředních aminokyselin [75]. Kumulace uvnitř buněk a snížený příjem této aminokyseliny z média značí, že quambalarin B inhibuje glutaminolýzu či některé z glutamin-dependetních reakcí. Zvýšenou hladinu intracelulárního glutaminu u buněčné linie Jurkat také pozoroval ve své práci Vališ a spol., přičemž předpokládal, že jedním z důvodů je blokáda mitochondriálního komplexu II či inhibice biosyntézy nukleotidů a hexosaminů [74].

U žádné aminokyseliny až na alanin u buněčné linie Ramos jsme nepozorovali zvýšený příjem z média. Naopak byl pozorován u všech buněčných linií snížený příjem tyrosinu, valinu, methioninu, lysinu a fenylalaninu. U buněčné linie Jurkat a THP-1 dochází právě u těchto aminokyselin k akumulaci uvnitř buněk, což může být způsobeno inhibicí syntézy proteinů. Buněčná linie Ramos má sníženou hladinu tyrosinu, isoleucinu, leucinu a fenylalaninu, což může být způsobeno nižším příjmem těchto aminokyselin. Zajímavé je, že buněčná linie Ramos má zvýšený příjem alaninu z média, a přesto intracelulární hladina klesla přibližně o 60 %. Quambalarin B nejspíš ovlivňuje aktivitu enzymů podílejících se na metabolismu alaninu. Alanin může být např. použit na syntézu jiných aminokyselin či pro tvorbu energie.

Posledním zkoumaným faktem byla reaktivnost quambalarinu B s ostatními aminokyselinami. Byla provedena analýza samotného RPMI média a média ošetřeného quambalarinem B. Z tabulky 12 na straně 59 je patrné, že průměrná změna zastoupení jednotlivých aminokyselin je takřka zanedbatelná a lze tedy předpokládat, že quambalarin B s aminokyselinami nijak nereaguje. Tyto změny také mohou ukazovat přesnost a spolehlivost automatického softwarového vyhodnocení.

7 Závěr

Podařilo se splnit vytyčený cíl práce, který spočíval v pozorování vlivu quambalarinu B na hladinu aminokyselin uvnitř buněk a ve vnějším prostředí. U buněčné linie Jurka jsme pozorovali po aplikaci quambalarinu B snížení intracelulární hladiny aspartátu, glutamátu a prolinu. Naopak zvýšení jsme pozorovali u serinu či asparaginu, histidinu či glutaminu, argininu, threoninu, valinu, methioninu a lysinu. Extracelulární hladina u této linie se zvýšila u serinu či asparaginu, histidinu či glutaminu, threoninu, tyrosinu, valinu, methioninu, lysinu a fenylalaninu. Na ostatní aminokyseliny neměl quambalarin B vliv. U buněčné linie Ramos jsme pozorovali pokles intracelulární hladiny glycinu, alaninu, prolinu, tyrosinu, isoleucinu a leucinu. Intracelulární hladina narostla u glutamátu, histidinu/glutaminu a lysinu. Nárůst u extracelulární hladiny jsme pozorovali u serinu/asparaginu, histidinu/glutaminu, threoninu, tyrosinu, valinu, methioninu, lysinu, leucinu a fenylalaninu. Buněčné linie THP-1 byla nejméně ovlivněná quambalarinem B, přičemž intracelulární hladina narostla u glycinu, alaninu, prolinu, valinu, methioninu, lysinu, isoleucinu, leucinu a fenylalaninu. Pokles intracelulární hladiny byl viditelný pouze u kyseliny asparagové. Extracelulární hladina se zvýšila pouze u alaninu, lysinu, valinu a fenylalaninu.

Seznam použité literatury

- [1] Jan Starý, “Leukemie v dětském věku,” *Linkos*, 2017.
- [2] T. G. Parslow, *Medical immunology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2001.
- [3] Václav Hořejší and Jiřina Bartůňková, *Základy imunologie*. Triton, 2010.
- [4] J. Domen and I. L. Weissman, “Self-renewal, differentiation or death: Regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate,” *Mol. Med. Today*, vol. 5, no. 5, pp. 201–208, May 1999.
- [5] S. J. Morrison, A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright, and I. L. Weissman, “Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors,” *Development*, vol. 124, no. 10, pp. 1929–1939, May 1997.
- [6] P. Ghezzi and M. Brines, “Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine,” *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. SUPPL. 1, pp. S37-44, Jul. 2004.
- [7] N. O. Fortunel, A. Hatzfeld, and J. A. Hatzfeld, “Transforming growth factor-: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis,” 2000.
- [8] D. G. Tenen, R. Hromas, J. D. Licht, and D. E. Zhang, “Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia,” *Blood*, vol. 90, no. 2. pp. 489–519, 15-Jul-1997.
- [9] Abul Abbas, Andrew Lichtman, and Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology - 9th Edition*. Elsevier, 2017.
- [10] Miroslav Pecka, *Laboratorní hematologie v přehledu*. FINIDR, 2006.
- [11] “Next-generation treatment for acute myeloid leukemia discovered. - Thailand Medical News.” [Online]. Available: <https://www.thailandmedical.news/news/next-generation-treatment-for-acute-myeloid-leukemia-discovered->. [Accessed: 08-Jul-2020].
- [12] Wiernik Peter, *Adult Leukemias*. PMPH-USA, 2001.
- [13] T. Radivoyevitch *et al.*, “Defining AML and MDS second cancer risk dynamics after diagnoses of first cancers treated or not with radiation,” *Leukemia*, vol. 30, no. 2, pp. 285–294, Feb. 2016.
- [14] “File:Acute leukemia-ALL.jpg - Wikimedia Commons.” [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acute_leukemia-ALL.jpg. [Accessed: 08-Jul-2020].
- [15] “File:AML-M3.jpg - Wikimedia Commons.” [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AML-M3.jpg>. [Accessed: 08-Jul-2020].
- [16] Josef Koutecký, Edita Kabičková, and Jan Starý, *Dětská onkologie pro praxi*. Triton, 2002.
- [17] C. Šálek, F. Folber, and M. Doubek, “Akutní lymfoblastická leukémie informace pro pacienty a jejich blízké.”
- [18] C. H. Pui, M. V. Relling, and J. R. Downing, “Mechanisms of disease: Acute lymphoblastic leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 15, pp. 1535–1548, Apr.

2004.

- [19] J. E. Rubnitz *et al.*, “TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: A new genetic marker with prognostic significance,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 3, pp. 1150–1157, Mar. 1997.
- [20] A. T. Look, “Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias,” *Science (80-.)*, vol. 278, no. 5340, pp. 1059–1064, 1997.
- [21] F. Ravandi and P. Kebriaei, “Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia,” *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 23, no. 5. NIH Public Access, pp. 1043–1063, Oct-2009.
- [22] C. H. Pui and W. E. Evans, “Treatment of acute lymphoblastic leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 2, pp. 166–178, Jan. 2006.
- [23] František Folber, Štěpán Hrabovský, and Michael Doubek, “Akutní lymfoblastická leukemie dospělých,” *onkologiescs*, 2015.
- [24] A. Redaelli, B. L. Laskin, J. M. Stephens, M. F. Botteman, and C. L. Pashos, “A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL),” *European Journal of Cancer Care*, vol. 14, no. 1. pp. 53–62, Mar-2005.
- [25] F. Y. Mortuza *et al.*, “Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 4, pp. 1094–104, 2002.
- [26] J. M. Chessels, “RELAPSED LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA IN CHILDREN: A CONTINUING CHALLENGE,” *Br. J. Haematol.*, vol. 102, no. 2, pp. 423–439, Jul. 1998.
- [27] M. D. Amylon *et al.*, “Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: A Pediatric Oncology Group study,” *Leukemia*, vol. 13, no. 3, pp. 335–342, Mar. 1999.
- [28] A. J. Barrett *et al.*, “Bone Marrow Transplants from HLA-Identical Siblings as Compared with Chemotherapy for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in a Second Remission,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 19, pp. 1253–1258, Nov. 1994.
- [29] Michal Karas, “Akutní myeloidní leukemie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk,” 2011.
- [30] Petra Bučková, Alena Bulíková, Melanie Cermanová, Petr Cetkovský, and Miriam Lánská, *AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE informace pro pacienty a jejich blízké*. 2013.
- [31] J. D. Licht, “AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML,” *Oncogene*, vol. 20, no. 40 REV. ISS. 4, pp. 5660–5679, Sep. 2001,.
- [32] J. M. Bennett *et al.*, “Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 103, no. 4, pp. 620–625, 1985.
- [33] S. R. Cingam and N. V. Koshy, *Cancer, Acute Promyelocytic Leukemia (APL,*

- APML). StatPearls Publishing, 2019.
- [34] G. Nucifora, “The EVI1 gene in myeloid leukemia,” *Leukemia*, vol. 11, no. 12, pp. 2022–2031, 1997.
- [35] L. Garçon *et al.*, “DEK-CAN molecular monitoring of myeloid malignancies could aid therapeutic stratification,” *Leukemia*, vol. 19, no. 8, pp. 1338–1344, Jun. 2005.
- [36] B. Ob, L. Öwenberg, J. Ames, R. D. Owing, A. Lan, and B. Urnett, “ACUTE MYELOID LEUKEMIA.”
- [37] D. L. Longo, H. Döhner, D. J. Weisdorf, and C. D. Bloomfield, “Acute Myeloid Leukemia,” *New Engl. J. Med. Downloaded from nejm.org*, vol. 12, pp. 1136–52, 2015.
- [38] J. R. Cantor and D. M. Sabatini, “Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces,” *Cancer Discovery*, vol. 2, no. 10. NIH Public Access, pp. 881–898, Oct-2012.
- [39] O. Warburg, F. Wind, and E. Negelein, “Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper,” *Klin. Wochenschr.*, vol. 5, no. 19, pp. 829–832, May 1926.
- [40] M. V. Liberti and J. W. Locasale, “The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 211–218, Mar. 2016.
- [41] H. Pelicano, D. S. Martin, R. H. Xu, and P. Huang, “Glycolysis inhibition for anticancer treatment,” *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4633–4646, Aug. 2006.
- [42] M. Upadhyay, J. Samal, M. Kandpal, O. V. Singh, and P. Vivekanandan, “The Warburg effect: Insights from the past decade,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 137, no. 3, pp. 318–330, Mar. 2013.
- [43] M. G. V. Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, “Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation,” *Science*, vol. 324, no. 5930. NIH Public Access, pp. 1029–1033, 22-May-2009.
- [44] C. T. Hensley, A. T. Wasti, and R. J. DeBerardinis, “Glutamine and cancer: Cell biology, physiology, and clinical opportunities,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 9. American Society for Clinical Investigation, pp. 3678–3684, 03-Sep-2013.
- [45] J. Márquez, J. M. Matés, F. J. Alonso, M. Martín-Rufián, C. Lobo, and J. A. Campos-Sandoval, “Canceromics studies unravel tumor’s glutamine addiction after metabolic reprogramming,” in *Tumor Cell Metabolism: Pathways, Regulation and Biology*, Springer-Verlag Vienna, 2015, pp. 257–286.
- [46] H. Eagle, “Utilization of Dipeptides by Mammalian Cells in Tissue Culture,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 89, no. 1, pp. 96–99, May 1955.
- [47] M. Martín-Rufián *et al.*, “Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells,” *J. Mol. Med.*, vol. 92, no. 3, pp. 277–290, 2014.
- [48] “Živa – Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci (Věra Slaninová, Alena Krejčí).” [Online]. Available: <https://ziva.avcr.cz/2013-5/rakovinna-bunka-a-zmeny-jejeho-metabolismu-cesta-k-preziti-i-nastroj-k-destrukci.html>. [Accessed: 30-May-2020].

- [49] D. M. Miller, S. D. Thomas, A. Islam, D. Muench, and K. Sedoris, “c-Myc and cancer metabolism,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 20. NIH Public Access, pp. 5546–5553, 15-Oct-2012.
- [50] P. Gao *et al.*, “C-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism,” *Nature*, vol. 458, no. 7239, pp. 762–765, Apr. 2009.
- [51] D. R. Wise *et al.*, “Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 48, pp. 18782–18787, Dec. 2008.
- [52] Y. K. Choi and K. G. Park, “Targeting glutamine metabolism for cancer treatment,” *Biomolecules and Therapeutics*, vol. 26, no. 1. Korean Society of Applied Pharmacology, pp. 19–28, 01-Jan-2018.
- [53] L. Vettore, R. L. Westbrook, and D. A. Tennant, “New aspects of amino acid metabolism in cancer,” *British Journal of Cancer*, vol. 122, no. 2. Springer Nature, pp. 150–156, 21-Jan-2020.
- [54] J. Zhang *et al.*, “Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion,” *Mol. Cell*, vol. 56, no. 2, pp. 205–218, 2014.
- [55] J. G. KIDD, “Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum,” *J. Exp. Med.*, vol. 98, no. 6, pp. 565–582, Dec. 1953.
- [56] J. D. Broome, “Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects,” *Nature*, vol. 191, no. 4793, pp. 1114–1115, 1961.
- [57] R. A. Egler, S. P. Ahuja, and Y. Matloub, “L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia,” *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, vol. 7, no. 2. Medknow Publications, pp. 62–71, 01-Apr-2016.
- [58] T. Batool, E. A. Makky, M. Jalal, and M. M. Yusoff, “A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 178, no. 5. Humana Press Inc., pp. 900–923, 01-Mar-2016.
- [59] “The L-asparaginase and L-glutaminase reactions. The E. chrysanthemi... | Download Scientific Diagram.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/The-L-asparaginase-and-L-glutaminase-reactions-The-E-chrysanthemi-L-asparaginase-has_fig1_293634984. [Accessed: 02-Jun-2020].
- [60] Y. N. Srikhanta, J. M. Atack, I. R. Beacham, and M. P. Jennings, “Distinct physiological roles for the two l-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 436, no. 3, pp. 362–365, Jul. 2013.
- [61] S. H. Chen, “Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance,” *Pediatrics and Neonatology*, vol. 56, no. 5. Elsevier (Singapore) Pte Ltd, pp. 287–293, 01-Oct-2015.
- [62] O. Krejci *et al.*, “Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukemic cells,”

- Leukemia*, vol. 18, no. 3, pp. 434–441, Jan. 2004.
- [63] S. Iwamoto, K. Mihara, J. R. Downing, C. H. Pui, and D. Campana, “Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 4, pp. 1049–1057, Apr. 2007.
- [64] S. Zou, X. Wang, P. Liu, C. Ke, and S. Xu, “Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 118. Elsevier Masson SAS, p. 109210, 01-Oct-2019.
- [65] V. L. Albaugh, C. Pinzon-Guzman, and A. Barbul, “Arginine—Dual roles as an onconutrient and immunonutrient,” *Journal of Surgical Oncology*, vol. 115, no. 3. John Wiley and Sons Inc., pp. 273–280, 01-Mar-2017.
- [66] L. Feun *et al.*, “Arginine Deprivation as a Targeted Therapy for Cancer,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 11, pp. 1049–1057, May 2008.
- [67] X. Fan, M. Xiao, F. Kong, T. Kudinha, H. Wang, and Y.-C. Xu, “A Rare Fungal Species, *Quambalaria cyanescens*, Isolated from a Patient after Augmentation Mammoplasty – Environmental Contaminant or Pathogen?,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e106949, Oct. 2014.
- [68] Petr Babula, R. Mikelová, J. Víteček, and René Kizek, “Naftochinony – výskyt v přírodě, biologické vlastnosti a jejich chromatografické stanovení v biologickém materiálu ,” 2005.
- [69] V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, E. A. Couladouros, D. Hepworth, and K. C. Nicolaou, “The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 38, no. 3, pp. 270–301, Feb. 1999.
- [70] A. Pardee, Y. Li, and C. Li, “Cancer Therapy with β -Lapachone,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 2, no. 3, pp. 227–242, Mar. 2005.
- [71] V. Grobárová *et al.*, “Quambalarine B, a Secondary Metabolite from *Quambalaria cyanescens* with Potential Anticancer Properties,” *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 9, pp. 2304–2314, Sep. 2016.
- [72] H. Wang *et al.*, “c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle,” *Oncogene*, vol. 27, no. 13, pp. 1905–1915, Mar. 2008.
- [73] *Waters AccQ-Tag Chemistry Package - Instruction manual*. 1993.
- [74] K. Vališ *et al.*, “Reprogramming of leukemic cell metabolism through the naphthoquinonic compound Quambalarine B,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 61, pp. 103137–103153, 2017.
- [75] M. Goto *et al.*, “Importance of glutamine metabolism in leukemia cells by energy production through TCA cycle and by redox homeostasis,” *Cancer Invest.*, vol. 32, no. 6, pp. 241–247, 2014.

