

# TEL/AML1 spustením metabolického stresu zvyšuje citlivosť leukemických buniek na L-Asparaginázu

Starková J.<sup>1</sup>, Krejčí O.<sup>1</sup>, Otová B.<sup>2</sup>, Krejčíková K.<sup>1</sup>, Hrušák O.<sup>3</sup>, Starý J.<sup>1</sup>, Trka J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CLIP-Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika detské hematologie a onkologie, 2. LF UK Praha,

<sup>2</sup> Ústav lékařské biologie a genetiky, 1. LF UK Praha, <sup>3</sup> Ústav imunologie, 2. LF UK Praha

## Súhrn

L-Asparagináza je cytostatikum bežne používané pri liečbe detskej akútnej lymfoblastickej leukémie. U pacientov s fúznym génom TEL/AML1 bola zistená zvýšená citlivosť na toto terapeutikum. Táto geneticky definovaná skupina sa vyznačuje dobrou odpoveďou na liečbu, relaps však stále zostáva problémom pre asi 17 % detí. L-Asparagináza depletuje asparagín a glutamín z extracelulárneho prostredia. U leukemických buniek bola popísaná znížená aktivita enzýmu asparagín syntetázy, ktorá tieto aminokyseliny syntetizuje. Predchádzajúce práce však paradoxne ukázali zvýšenú expresiu asparagín syntetázy u TEL/AML1[+] pacientov. Autori teda hlbšie analyzovali biochemickú cestu, ktorá ovplyvňuje syntézu asparagínu a glutamínu v maligných lymfoidných bunkách. Analýza dát expresného profilovania pacientov s akútnou lymfoblastickou leukémiou poukázala na signifikantne nižšiu hladinu génu pre glutamát dehydrogenázu u TEL/AML1[+] leukémií v porovnaní s TEL/AML1[-]. Tento jav bol potvrdený aj pomocou kvantitatívnej RT-PCR. Autori predpokladajú, že práve nedostatočná funkcia glutamát dehydrogenázy vedie v konečnom dôsledku k nedostatočnej tvorbe glutamínu v bunke a tento nedostatok zvyšuje expresiu asparagín syntetázy. Možnosť bunkového metabolizmu reagovať na obmedzenie vonkajšieho prísunu asparagínu a glutamínu po podaní L-Asparaginázy je tak oslabená. Úplné objasnenie procesov, ktoré sú zodpovedné za zvýšenú senzitivitu k L-Asparagináze, by mohlo ovplyvniť doterajšie terapeutické postupy.

**Kľúčová slova:** L-Asparagináza, TEL/AML1, leukémie, asparagín syntetáza, glutamát dehydrogenáza

## Summary

Starková J., Krejčí O., Otová B., Krejčíková K., Hrušák O., Starý J., Trka J.: TEL/AML1 increases sensitivity of leukemia cells to L-Asparaginase by induction of metabolic stress

L-Asparaginase is a drug commonly used in the therapy of childhood lymphoblastic leukaemias. A higher sensitivity to L-Asparaginase has been detected in patients with TEL/AML1 fusion gene. This genotypically-defined group is distinguished by a good response to the therapy, yet relapses still occur in 17% of children. L-asparaginase depletes asparagines and glutamine from extracellular environment. The activity of asparagine synthetase that synthesizes these amino acids is reduced in leukaemic cells. This paper, as well as some previous studies, paradoxically proves increased expression of asparagine synthetase in TEL/AML1[+] patients. The authors have carried out a deep analysis of the biochemical cascade that affects the synthesis of asparagine and glutamine in malignant lymphoid cells. The analysis of expression profiling data from patients with acute lymphoblastic leukaemias have showed significantly decreased gene expression of glutamate dehydrogenase in TEL/AML1[+] patients, as compared with TEL/AML1[-] patients. This phenomenon has also been confirmed by quantitative real-time PCR. The authors assume that an insufficient function of glutamate dehydrogenase leads to an insufficient synthesis of glutamine in the cell, leading to an increased expression of asparagine synthetase gene. The cellular metabolism's ability to react to the limited asparagine and glutamine intake from extracellular environment following the administration of L-Asparaginase is thus weakened. An explanation of the higher sensitivity to L-Asparaginase of the specific subgroup of patients could affect existing therapeutic procedures.

**Key words:** L-Asparaginase, TEL/AML1, leukemia, asparagine synthetase, glutamate dehydrogenase

*Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 2, p. 70–75.*

## Úvod

Leukémie tvoria jednu tretinu všetkých nádorových ochorení u detí. Asi 80 % tvorí akútne lymfoblastické leukémie (ALL), 15–20 % akútne myeloidné leukémie (AML). Zavedenie molekulárnych vyšetrení typických genetických abnormalít v leukemických bunkách prispelo k pochopeniu patogenézy a prognózy ALL u detí (1, 2). Genetické aberácie (najčastejšie translokácie a inverzie) tvoria fúzne gény, ktoré kódujú kinázy a aberantné transkripčné faktory. Tieto genetické zmeny prispievajú k leukemickej transformácii hematopoetických kmeňových buniek alebo ich komitovaných progenitorov.

Narušujú dôležité regulačné procesy ako je proliferácia, diferenciácia a apoptóza. Najčastejšou chromozomálnou aberáciou u detských ALL je translokácia t(12;21)(p13;q22) (3, 4). Kóduje fúzny proteín pozostávajúci z TEL (tiež ETV6) génu ležiaceho na chromozóme 12p13 a AML1 (tiež RUNX1 alebo CBFA2) génu na chromozóme 21q22. TEL gén zastupuje transkripčný faktor z ETS rodiny, produkt tohto génu obsahuje dve funkčné domény: N-terminálnu PNT (pointed) doménu a C terminálnu ETS (erythroblast transformation specific) doménu (5–7). AML1 reprezentuje alfa-podjednotku CBF (Core Binding Factor), proteínový produkt je tvorený 480 aminokyselinami a vykazuje vysokú homológiu so segmentačným génom drosophily runt. Obsahuje nieko-

Iko charakteristických domén, doména Runt je zodpovedná za väzbu s DNA a proteín-proteínovou interakciou, v C-terminálnej oblasti sa nachádza transaktivačná doména bohatá na prolín a serín (8, 9). Pacienti nesúci hybridný gén TEL/AML1 tvoria skoro štvrtinu všetkých detí s ALL, hlavne predškolského veku, a napriek dobrej prognóze dochádza aj u nich k relapsom ochorenia (10, 11). Pochopenie mechanizmu účinku cytostatík, ktoré sú pri terapii bežne používané, by mohlo viesť k pochopeniu odlišnej prognózy v rámci tejto genotypovej skupiny a následne k detailnejšej stratifikácii liečebného protokolu so zohľadnením jednotlivých podskupín TEL/AML1 pozitívnych ALL.

My sme sa zamerali na sledovanie účinku L-Asparagínázy (L-Asp; L-asparagine amido-hydrolase), ktorá je jedným zo štandardne používaných cytostatík pri liečbe detskej ALL. V roku 1967, Oettgen et al. ukázali potenciálny účinok L-Asp proti leukémiám a lymfómom u človeka (12). Pri monoterapii dochádza ku kompletnej remisii u 40–60 % detských ALL pacientov (13). Okrem známeho účinku u ALL (kde je takmer výhradne používaná), niektorí autori predpokladajú benefit liečby L-Asp aj u pacientov s AML, konkrétne u podskupiny FAB M5 (14, 15). Práca Ramakers-van Woerden et al. identifikovala TEL/AML1+ ALL ako genotypicky definovanú skupinu s vyššou citlivosťou na L-Asp (16).

Popísaným mechanizmom účinku L-Asp je schopnosť depletovať asparagín a glutamín z prostredia, ktorá vedie k bunkovému effluxu a deplécii týchto aminokyselín (AMK) z buniek. Tieto AMK boli u lymfoidných buniek označené za esenciálne, pretože pri nadmernej proliferácii glutamín nahrádza glukózu a stáva sa jediným zdrojom energie (17). U rastlín zase asparagín slúži ako jediný transportér nitrogénu pri deprivácii karbohydrátov (18). Nedostatok asparagínu a glutamínu blokuje bunky v prechode bunkovým cyklom. Bunky sú zastavené v G1/G0 fáze a prechádzajú do apoptózy (19, 20). Zároveň u nich dochádza k zvýšenej expresii génu pre asparagín syntetázu (AsnS). Pri štúdiu teplotne závislých mutantov BHK (Syrian hamster) bunkovej línie, ktorí sú zablokovaní v špecifickej fáze bunkového cyklu pri non-permisívnej teplote, bol objavený gén ts11. Jeho expresia je špecifická pre rastúce alebo v raste blokované bunky a bola u ňo objavená homológia s ľudskou AsnS (21). Úloha AsnS je syntetizovať intracelulárny asparagín z aspartátu odštiepením aminoskupiny z glutamínu. Na základe týchto poznatkov sme predpokladali priamy vzťah AsnS a zvýšenej citlivosti TEL/AML1+ buniek na L-Asp. Pri kvantifikácii expresie génu pre AsnS sme paradoxne dokázali signifikantne vyššiu hladinu génu pre AsnS v TEL/AML1+ bunkách pacientov oproti TEL/AML1- a zdravým bunkám. Študovali sme bunkovú proliferáciu a bunkový cyklus v *in vitro* podmienkach simulujúcich terapeutický protokol pre liečbu detských lymfoblastických leukémií BFM (Berlin – Frankfurt – Münster) v TEL/AML1+ a TEL/AML1- bunkách. Napriek tomu, že k indukcii expresie AsnS dochádza u všetkých študovaných leukemických subtypov, TEL/AML1+ bunky na rozdiel od TEL/AML1- nepre-

chádzajú do S fázy bunkového cyklu v prítomnosti L-Asp (22). V tejto práci sme pomocou kvantitatívneho merania expresie génu pre AsnS potvrdili rozdiely medzi genotypicky rozdielnymi bunkami. Všetky dosiaľ publikované štúdie zamerané na účinok L-Asp sa zaujímali o depléciu asparagínu, pričom L-Asp kompletne štiepi aj glutamín. Meta-analýza verejne prístupných dát expresného profilovania získaných z veľkého súboru pacientov s ALL ukazuje na signifikantne zníženú hladinu génu pre glutamát dehydrogenázu (GDH) u TEL/AML1+ v porovnaní s TEL/AML1- leukémiami (23). Tento jav sme potvrdili pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (qRT-PCR). AsnS je v eukaryotických bunkách glutamín-dependentná, a keďže GDH nepriamo reguluje tvorbu glutamínu, predpokladáme, že zmena hladiny expresie génu pre GDH v TEL/AML1+ bunkách bude mať na citlivosť buniek na L-Asp významný vplyv (24).

## Materiál a metódy

### Pacienti

Boli použité výhradne vzorky kostnej drene pacientov s ALL. Celkový počet TEL/AML1+ pacientov bol 22, a to vo veku 2–6 rokov. V rovnakom vekovom rozmedzí bolo vybraných ďalších 20 vzoriek prekurzorových ALL pacientov bez TEL/AML1, BCR/ABL a MLL/AF4 fúzných génov.

Diagnóza bola prevedená na základe štandardných kritérií. Všetky vzorky boli získané na základe informovaného súhlasu rodičov alebo poručníkov detí. Imunofenotyp a DNA ploidita bola determinovaná pomocou FACS-Calibur prietokového cytometra, ako už bolo skôr publikované (11). Prítomnosť TEL/AML1, BCR/ABL a MLL/AF4 fúzných génov bola detekovaná pomocou dvojkolovej nested PCR (25, 26). Všetci pacienti boli liečení podľa ALL BFM 90/95 protokolov v jednom z centier Pracovnej skupiny pre detskú hematológiu v ČR. Všetky vzorky boli transportované na našu kliniku a spracované do 30 hod. od aspirácie.

### Bunkové línie

REH (TEL/AML1+ bunky, B-prekurzorová leukemická bunková línia s translokáciou (12;21)) bola získaná od R.Pieters (Erasmus Medical Center, Rotterdam), Nalm-6 (TEL/AML1- bunky, B-prekurzorová leukemická bunková línia) bola zakúpená v DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko. Bunky boli kultivované v Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 médiu s 2mM L-glutamínom, 10% fetálne telacie sérum a 10 ml/l antibiotický roztok (100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). Všetky kultúry boli inkubované pri 37 °C v 5% CO<sub>2</sub>. Bunky boli zbierané pomocou centrifugácie 10 min/240 g a resuspendované v koncentrácii 3 x 10<sup>5</sup> buniek/ml čerstvého média 24 hod. pred všetkými experimentami. Pri sledovaní dynamiky a génovej expresie AsnS boli bunky inkubované s L-Asp (Kidrolase, Rhone-Poulenc Bellon, Francúzsko) v koncentrácii 4 U/ml. Každých 24 h sme

zamrazovali pelety buniek na RNA extrakciu. Všetky experimenty boli robené v triplikátoch.

### Izolácia buniek

Mononukleárne bunky kostnej drene alebo periférnej krvi boli izolované pomocou Ficoll-Paque (hustota 1,077 g/ml, Pharmacia, Uppsala, Švédsko) denzitocentrifugácie a držané v  $-80^{\circ}\text{C}$  na RNA extrakciu.

### Izolácia RNA a prepis do cDNA

Totálna RNA bola extrahovaná zo štandardnej koncentrácie mononukleárov izolovaných z patientských vzoriek alebo bunkových línií podľa modifikovanej metódy Chomczynski a Sacchi (27). Totálna RNA bola rozpustená v odpovedajúcom objeme podľa východzieho množstva buniek a konvertovaná na cDNA použitím MoMLV reverznej transkriptázy (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) podľa návodu výrobcu.

### qRT-PCR

Kvantitatívna real-time polymerázová reťazová reakcia bola prevádzaná na prístroji LightCycler™ (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Nemecko). Na kvantifikáciu  $\beta 2$  mikroglobulínového génu ( $\beta 2m$ ), ktorý slúžil ako tzv. house-keeping gén, boli použité oligonukleotidové hybridizačné sondy, popísané už skôr (28). AsnS transkript bol detekovaný pomocou systému popísaného v predchádzajúcej práci (22). Pre detekciu expsie génu pre GDH bol použitý SYBRGreen a primery s nasledovnou sekvenciou: forward primer AAG ATC AAT CCC AAG AAC TAT ACT GAT, reverse primer GGA AGA CAC CAC GGC CAG T. PCR amplifikácia prebiehala pri rovnakých podmienkach ako už bolo popísané v predchádzajúcom článku (22). Kalibračná krivka k vypočítaniu hladiny AsnS, GDH a  $\beta 2m$  expsie bola pripravená riedením cDNA bunkovej línie REH v pufrovanej vode na experimenty bunkových línií. Kalibračná krivka na analýzu patientských vzoriek bola pripravená z cDNA periférnych mononukleárných buniek (PBMC) získaných zo zdravých dobrovoľníkov v pufrovanej vode. U in vitro experimentov bola u všetkých testov použitá cDNA riedená z rovnakej vzorky. Všetky vzorky bežali v duplikátoch; bola použitá hodnota priemeru. Normalizovaná expsia AsnS a GDH ( $AsnS_N$  a  $GDH_N$ ) bola vypočítaná ako pomer medzi hladinami expsie AsnS, resp. GDH a  $\beta 2m$  získané qRT-PCR.

### Štatistická analýza dát expresného profilovania

V pôvodných dátach expresného profilovania pacientov s ALL sme selektívne hľadali gény zúčastňujúce sa syntézy asparagínu a glutamínu (23). Na základe tejto reanalýzy bol vybraný gén pre GDH. Rozdiel v expresných dátach génu pre GDH detekovaný pomocou troch rôznych sád sond (31690-at, 31691-g-at, 37341-at) u TEL/AML1[+] a TEL/AML1[-] pacientov bol vypočítaný pomocou Mann-Whitney nepárového neparametrického testu. Pri analýze výsledkov kvantitatívnej detekcie

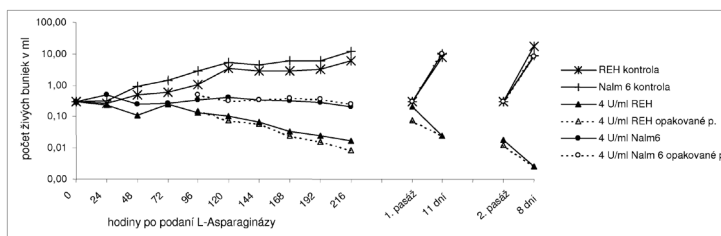
expsie normalizovaného génu u sledovaných pacientov bol takisto použitý Mann-Whitney nepárový neparametrický test.

## Výsledky

### Zástava rastu TEL/AML1[+] buniek po podaní L-Asp podľa BFM protokolu

Simulovali sme terapeutický protokol ALL-BFM 95 na REH (TEL/AML1[+]) leukemickej línií a Nalm-6 (TEL/AML1[-]) leukemickej bunkovej línií. L-Asp je v protokole BFM podávaná každý tretí deň. Pestovali sme bunky v RPMI 1640 médiu s L-Asp v koncentrácii 4 U/ml, vybranej podľa sérovej koncentrácie meranej vo farmakokinetickej štúdii (29). Experimentálne procedúry museli byť modifikované, aby bolo možné porovnať bunky REH a Nalm-6 medzi sebou. Nalm-6 bunky majú kratší čas delenia (36 hod.) a rýchla spotreba média nedovoľuje dlhotrvajúce kultivácie v nemenenom médiu. Aby bol dosiahnutý potrebný prísun živín, každé tri dni boli bunky prenesené do čerstvého média s náležitou koncentráciou L-Asp. Počas prvej časti experimentov (trvajúcich 9 dní), bunky vysadené v koncentrácii  $0,3 \times 10^5$  buniek/ml boli kultivované v médiu s L-Asp. Kontrolné bunky boli pestované v médiu bez L-Asp. Paralelne boli kultivované bunky s jednoduchým podaním (0 hod.) a opakovaným podaním (0, 72, 144 hod.) cytostatika. Po 9 dňoch bolo  $10^5$  buniek prenesených do čerstvého RPMI 1640 média bez L-Asp a kultivovaných ďalších 8 dní. Potom boli bunky zozbierané a presadené opäť do čerstvého média bez L-Asp a pestované ešte 11 dní. Každých 24 hod. bola sledovaná viabilita buniek, analyzovaný bunkový cyklus a pripravená peleta buniek na izoláciu RNA.

Rast buniek oboch bunkových línií bol vysoko potlačený pri jednoduchom aj opakovanom podaní v porovnaní s kontrolnými bunkami, ktorých počet exponenciálne narastal. Celkovo bola inhibícia bunkového rastu významnejšia u REH buniek. U buniek predkultivovaných v médiu s jednoduchým podaním L-Asp došlo k obnoveniu rastu po 19 dňoch v médiu bez L-Asp u oboch bunkových línií. REH bunky kultivované predtým s opakovanou dávkou L-Asp si však zachovali zástavu rastu i po prenesení do média bez L-Asp.

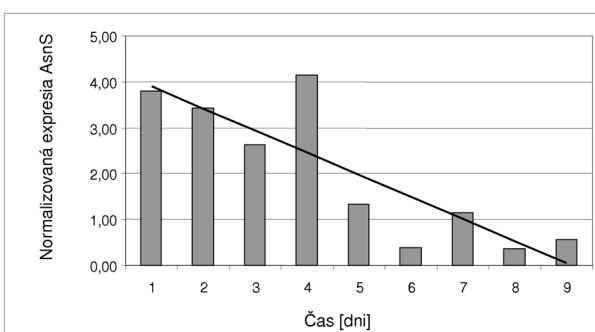


**Graf 1.** Rast TEL/AML1[+] bunkovej línie (REH) a TEL/AML1[-] bunkovej línie (Nalm-6) po podaní L-Asparaginázy s jednoduchým alebo opakovaným podaním monitorovaný počas 28 dní trvania experimentu. Po 9 dňoch kultivácie buniek v médiu s L-Asp boli bunky prenesené do média bez L-Asp a kultivované ďalších 19 dní s jednou pasážou.

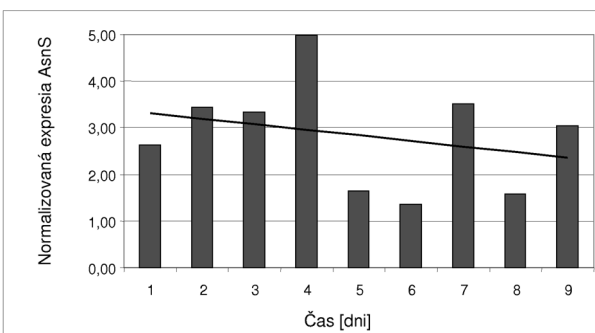
U Nalm-6 buniek nebol naproti tomu zaznamenaný žiadny rozdiel v prolongácii inhibície rastu po pasáži buniek v médiu bez L-Asp (22) (obr. 1).

### **Dynamika expresie AsnS u REH vs Nalm-6 buniek v experimente simulujúcom BFM protokol**

V rámci simulovaného experimentu sme u jednotlivých skupín buniek po každých 24 hod. zamrazovali pelety buniek a následne izolovali RNA. Sledovali sme vplyv L-Asp na expresiu génu pre AsnS. Po 24 hod. inkubácie v médiu s L-Asp došlo k významnému zvýšeniu hladiny génu pre AsnS u REH aj Nalm-6 buniek. Absolútna hladina expresie génu bola závislá na bazálnej hladine AsnS u jednotlivých bunkových línii. V ďalších



**Graf 2a.** Normalizovaná hladina AsnS detekovaná v TEL/AML1[-] bunkách (Nalm-6) každých 24 hod. v experimente simulujúcom liečebný protokol BFM-ALL95 po 9 dní.

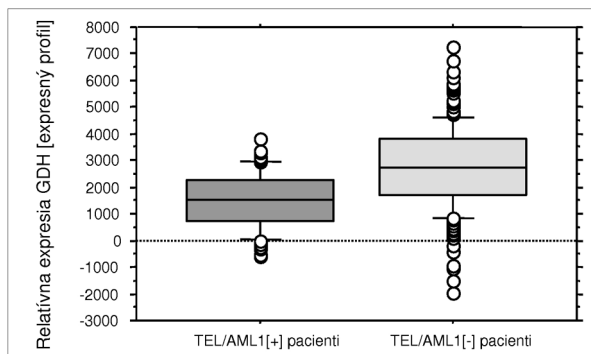


**Graf 2b.** Normalizovaná hladina AsnS detekovaná v TEL/AML1[+] bunkách (REH) každých 24 hod. v experimente simulujúcom liečebný protokol BFM-ALL95 po 9 dní.

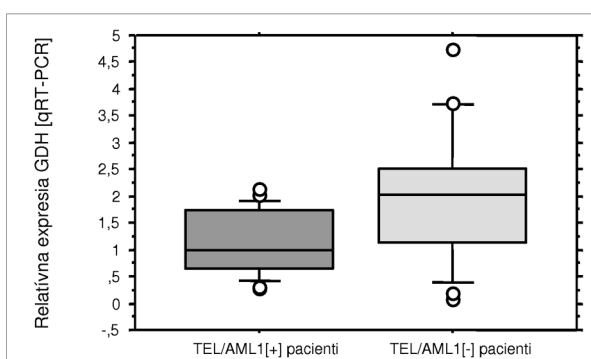
časových bodoch bola dynamika  $AsnS_N$  rozdielna. U Nalm-6 buniek klesala až na hladinu rovnakú s hladinou expresie u kontrolnej skupiny. U REH buniek AsnS expresia si udržiavala približne rovnakú hodnotu po celých 9 dní jej sledovania (obr. 2).

### **Metaanalýza expresného profilovania**

Na základe verejne prístupných dát expresného profilovania ALL pacientov sme pomocou štatistickej analýzy identifikovali gény asociované s TEL/AML1 fenotypom. Na základe najprísnejších kritérií sme vybrali gény zúčastňujúce sa syntézy asparagínu a glutamínu a identifikovali gény pre GDH.



**Graf 3a.** Štatistická analýza relatívnej expresie génu GDH z expresného profilovania pacientov TEL/AML1[+] a porovnaná s ostatnými pacientmi;  $p < 0,00001$  vypočítaná Mann-Whitney neparametrickým nepárovým testom.



**Graf 3b.** Porovnanie normalizovanej expresie génu GDH detekovanej pomocou qRT-PCR medzi TEL/AML1[+] a TEL/AML1[-] pacientmi;  $p = 0,013$  vypočítaná Mann-Whitney neparametrickým nepárovým testom.

### **Porovnanie expresie génu pre GDH medzi pacientmi TEL/AML1[+] vs ostatnými ALL pacientmi**

Pomocou qRT-PCR sme detekovali hladiny génu kódujúceho GDH. Použili sme diagnostické vzorky TEL/AML1[+] pacientov a TEL/AML1[-] pacientov a jednotlivé  $GDH_N$  porovnali a rozdiel štatisticky vyhodnotili. U TEL/AML1[+] pacientov bola expresia  $GDH_N$  signifikantne nižšia v porovnaní s ostatnými ALL pacientmi ( $p = 0,013$ ) (obr. 3).

## **Diskusia**

Pôvodná teória zaoberajúca sa mechanizmom účinku L-Asp na leukemické bunky vychádzala z hypotézy o neschopnosti leukemických buniek zvyšovať aktivitu AsnS (30). Zdá sa však, že za citlivosť pacientov na L-Asp nebude zodpovedná znížená schopnosť indukcie expresie AsnS, pretože pri sledovaní hladiny AsnS u TEL/AML1[+] pacientov, u ktorých bola pomocou cytotoxického MTT testu zistená zvýšená citlivosť na toto cytostatikum, sme detekovali paradoxne vyššie hodnoty expresie (16, 22, 31). Na základe detekcie množstva transkriptu sa predpokladá lineárna závislosť s množstvom proteínu a enzymatickou aktivitou (32). In vitro experimenty simulujúce liečebný protokol BFM ukázali, že obe bunkové línie vykazovali

zástavu v raste. V dlhodobej kultivácii už bez prítomnosti L-Asp však Nalm-6 bunky (TEL/AML[-]) svoj rastový blok odstránili, pričom u REH (TEL/AML[+]) buniek bol rastový blok zachovaný. Zástava rastu REH buniek bola potvrdená aj pri analýze bunkového cyklu pomocou prietokovej cytometrie. REH bunky sa hromadili v G1/G0 fáze oproti Nalm-6 bunkám, ktoré boli schopné prechodu do S fázy. Z viacerých štúdií vyplýva, že práve nedostatok glutamínu a asparagínu zabraňuje prechodu buniek do S fázy (20). Expresia AsnS sa zvyšuje pri deprivácii aminokyselín, čo sa zhoduje s našimi výsledkami kvantifikácie expresie génu pre AsnS. Po 24 hod. inkubácie buniek s L-Asp bolo zvýšenie AsnS výrazné u oboch bunkových línií, no v ďalších časových bodoch sledovania sa výsledky rozchádzajú. U Nalm-6 buniek sa hladina génu pre AsnS vyrovnáva hodnotám nameraným v kontrolnej skupine buniek pestovaných celý čas bez L-Asp, pričom REH bunky si zachovávajú približne rovnaké zvýšenie expresie génu až do 9. dňa experimentu. Vyplýva z toho, že REH bunky nie sú schopné obísť nutričný stres spôsobený nedostatkom asparagínu a glutamínu v prostredí a pretrváva u nich predĺžený účinok L-Asp. Nalm-6 bunky si pravdepodobne nahradia depletovaný asparagín a glutamín z vlastných zdrojov. Táto neschopnosť dlhodobo kompenzovať nedostatok asparagínu a glutamínu (a nie neschopnosť krátkodobo zvyšovať expresiu AsnS) je zrejme príčinou vyššej účinnosti L-Asp u TEL/AML1[+] buniek.

Z analýzy expresného profilovania vyplýva, že senzitivita resp. rezistencia na L-Asp bude korelovať s expresiou aj iných génov (33). Okrem toho v bunkách ALL pacientov zvýšená expresia AsnS nie je asociovaná s L-Asp rezistenciou (34).

AsnS je závislá na prítomnosti glutamínu a aspartátu. Táto aminotransferáza využíva glutamín ako jediný zdroj aminoskupiny. Jeho prítomnosť v bunkách je závislá na aktivite glutamín syntetázy (GS), ktorá je regulovaná produktom oxidačnej deaminácie glutamátu 2-oxoglutarátom (35). Túto enzymatickú reakciu zabezpečuje práve GDH (36). U TEL/AML1[+] pacientov sme detekovali signifikantne nižšiu hladinu expresie génu pre GDH na rozdiel od ostatných ALL pacientov, z čoho vyplýva znížená aktivita GS. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že množstvo glutamínu v bunkách a schopnosť buniek si ho samostatne produkovať ovplyvňuje citlivosť buniek na L-Asp. Pokiaľ ďalšie experimenty túto teóriu potvrdia, objasníme tak podrobnejšie mechanizmus účinku L-Asp v antileukemickej terapii. Už v tejto chvíli naše výsledky napovedajú, prečo majú TEL/AML1[+] pacienti lepšie liečebné výsledky na protokoloch s vyšším dávkovaním L-Asp (37).

## Literatura

- Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 2002; 1: 417–420.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535–1548.
- Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood* 1997; 90: 571–577.
- Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995; 9: 1985–1989.
- Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 2001; 20: 3716–3725.
- Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 1999; 274: 30132–30138.
- Guidex F, Petrie K, Ford AM, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000; 96: 2557–2561.
- Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia* 1999; 13: 1932–1942.
- Speck NA. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 192–196.
- Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Czech Paediatric Haematology Working Group. Leukemia* 1999; 13: 22–24.
- Hrusak O, Trka J, Zuna J, Houskova J, Bartunkova J, Stary J. Aberrant expression of KOR-SA3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AML1 negativity. *The Pediatric Hematology Working Group in the Czech Republic. Leukemia* 1998; 12: 1064–1070.
- Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967; 27: 2619–2631.
- Sutow WW, Garcia F, Starling KA, Williams TE, Lane DM, Gehan EA. L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia. *The Southwest Cancer Chemotherapy Study Group. Cancer* 1971; 28: 819–824.
- Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 2879–2886.
- Dubbers A, Wurthwein G, Muller HJ, et al. Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol* 2000; 109: 427–429.
- Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 1094–1099.
- Chang WK, Yang KD, Shaio MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 482–488.
- Barbosa-Tessmann IP, Pineda VL, Nick HS, Schuster SM, Kilberg MS. Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *Biochem J* 1999; 339 ( Pt 1): 151–158.
- Horig H, Spagnoli GC, Figueira L, et al. Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J Cell Biochem* 1993; 53: 343–351.
- Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 1997; 11: 1858–1861.
- Greco A, Gong SS, Ittmann M, Basilico C. Organization and expression of the cell cycle gene, ts11, that encodes asparagine synthetase. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2350–2359.
- Krejci O, Starkova J, Otova B, et al. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 2004; 18: 434–441.

23. **Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al.** Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1: 133–143.
24. **Tanizawa Y, Nakai K, Sasaki T, et al.** Unregulated elevation of glutamate dehydrogenase activity induces glutamine-stimulated insulin secretion: identification and characterization of a GLUD1 gene mutation and insulin secretion studies with MIN6 cells overexpressing the mutant glutamate dehydrogenase. *Diabetes* 2002; 51: 712–717.
25. **van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901–1928.
26. **Trka J, Zuna J, Hrusak O, et al.** No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples. *Blood* 1999; 93: 1106–1107; discussion 1108–1110.
27. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.
28. **Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J.** Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cyclers significantly affects real-time PCR. *Biotechniques* 2002; 33: 508, 510, 512.
29. **Muller HJ, Beier R, Loning L, et al.** Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *Br J Haematol* 2001; 114: 794–799.
30. **Pui C-H.** *Childhood Leukemias* (ed first). Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
31. **Stams WA, Den Boer ML, Beverloo HB, et al.** Sensitivity to L-Asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in (t(12;21) positive pediatric ALL. *Blood* 2002.
32. **Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM, Kilberg MS.** Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am J Physiol* 1997; 272: C1691–1699.
33. **Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al.** Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004; 351: 533–542.
34. **Fine BM, Kaspers GJ, Ho M, Loonen AH, Boxer LM.** A genome-wide view of the in vitro response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005; 65: 291–299.
35. **Rotoli BM, Uggeri J, Dall'Asta V, et al.** Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15: 281–292.
36. **Voet D, Voetová JG.** *Biochemie*: Victoria Publishing; 1990.
37. **Loh ML, Silverman LB, Young ML, et al.** Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 4792–4797.

**PODPORA**

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ 7433.*

*Mgr. Júlia Starková*

*Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF*

*V Úvalu 84*

*150 06 Praha 5*

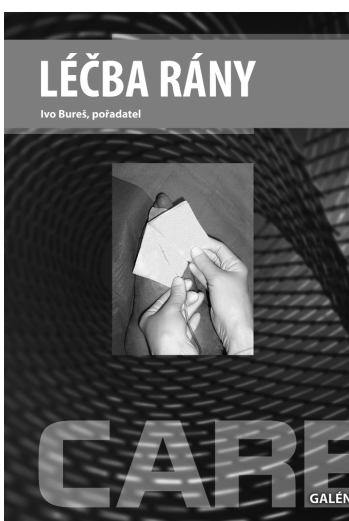
*Korespondující autor:*

*Doc. MUDr. Jan Trka, Ph.D.*

*jan.trka@lfmotol.cuni.cz*

*Došlo do redakce: 6. 2. 2006*

*Přijato: 10. 4. 2006*



## LÉČBA RÁNY

*Ivo Bureš, pořadatel*

Publikace obsahuje články – příspěvky lékařů a sester – zabývající se novými poznatky v oboru léčby různých typů ran (např. rány po amputaci, dekubity, syndrom diabetické nohy, infekční komplikace chronických ran). Vedle teoretických příspěvků jsou v příručce zařazeny i kazuistiky z ošetrovatelské praxe.

*Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-413-X, 78 s. formát*

*150 x 210 mm, brož., barev., 78 str., 60 Kč.*

*Edice CARE – příloha periodika Florence, číslo 5, ročník II, 2006*

**Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz**