

Nové přístupy léčby u pacientů s TEL/AML1 pozitivní akutní lymfoblastickou leukémií

Mgr. Júlia Starková

Školitel: Doc. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Univerzita Karlova v Praze
2.lékařská fakulta
2006

Poděkování:

V prvom rade by som chcela poďakovať svojmu školiteľovi Doc. J.Trkovi za odborné vedenie na tomto projekte a za to, že mi umožnil pracovať v Laboratóriu molekulárnej genetiky Kliniky detskej hematológie a onkológie. Ondřejovi Krejčímu by som chcela poďakovať za zasvätenie do tajov L-Asparaginázy. Neoceniteľný prínos pre mňa mali rady a nápady Jozefa Madža a takisto ďakujem Doc. B. Otovej za odovzdanie skúseností zo svojej dlhoročnej praxe. Celej pracovnej skupine CLIP ďakujem za vytvorenie priateľského prostredia. Robertovi Fischmannovi ďakujem za inšpirujúce domáce prostredie.

Obsah:

Úvod	4
Akutní leukémie	4
Charakteristika podskupin ALL	5
Změny v počtu chromosomů	5
t(9;22)(q34;q11) s fúzním genem BCR/ABL	6
Přestavby genu MLL (11q23)	7
TEL/AML1 pozitivní ALL pacienti	8
Gen TEL	9
Gen AML1	11
Funkce fúzního proteinu TEL/AML1	12
Etiologie TEL/AML1 pozitivní ALL	14
Prognóza TEL/AML1 pozitivní ALL	16
Vývoj terapie pacientů s AL	17
L-Asparagináza	18
Inhibitory deacetyláz histonů	20
Cíle dizertační práce	25
Část I	25
Část II	26
Metody I	27
Výsledky I	29
Porovnání exprese genu pro AsnS v TEL/AML1 pozitivních vs TEL/AML1 negativních leukemických buňkách a ve vzorcích zdravých jedinců	29
Hladina exprese genu pro AsnS jako prognostický znak	30
Porovnání exprese AsnS u diagnostických a relapsových vzorků pacientů s ALL	31
TEL/AML1 pozitivní linie rezistentní na L-Asp	31
Dynamika exprese AsnS v krátkodobém experimentu po podání L-Asp	32
In vitro experiment simulující terapeutický protokol ALL-BFM 95	33
Meta-analýza dat expresního profilování – role glutamát dehydrogenázy	36
Metody II	37
Výsledky II	40
Vliv HDACi na proliferaci a apoptózu leukemických buněk	40
Detekce diferenciačního posunu	41
Funkční důkaz regulace aberantním transkripčním faktorem TEL/AML1	42
Strategie analýzy expresních dat pro identifikaci cílových genů	43
Expresní profilování vs qRT-PCR	44
Závěry a diskuse I	46
Závěry a diskuse II	47
Příloha 1:	49
Příloha 2:	58
Příloha 3:	65
Příloha 4:	89
Použitá literatura	97
Seznam publikací a přednášek	106
Seznam použitých zkratk	109

Úvod

Akutní leukémie

Leukémie je charakterizována akumulací nezralých, abnormálních krevních buněk v krvi a kostní dřeni, které kompetují s normálními hematopoetickými buňkami. Tento stav vede k selhání normální hematopoézy, projevujícím se anemií, infekcemi a krvácením, leukemické buňky navíc mohou invadovat do ostatních tkání a orgánů. Potlačení normální krvinek tvorby souvisí s klinickými symptomy onemocnění. Na základě klinických projevů se leukémie dělí na akutní (AL) a chronické a na základě typů buněk, ze kterých pocházejí, do dvou hlavních skupin na lymfoidní a myeloidní.

U dětí tvoří leukémie asi 1/3 všech nádorových onemocnění. Z toho 80% tvoří akutní lymfoblastická leukémie (ALL), incidence je 3 nové případy/100 000 dětí a adolescentů do 15 věku života za jeden rok. V České republice onemocní ročně asi 65-70 dětí. Další 15-20% tvoří akutní myeloidní leukémie a zbylé případy jsou chronické myeloidní leukémie a ostatní typy příbuzné leukémie. Nejčastěji je toto onemocnění diagnostikováno mezi 2. a 6. rokem života. Molekulární analýzy běžných genetických abnormalit v leukemických buňkách přispěly k porozumění patogeneze a ke zlepšení prognózy ALL u dětí(1,2). Chromosomální přestavby u tohoto onemocnění často přítomné způsobují aberantní expresi protoonkogenů a tvoří fúzní geny, které kódují konstitutivně aktivní kinázy a aberantní transkripční faktory. Tyto genetické změny přispívají k leukemogenní transformaci hematopoetických buněk. Mění důležité regulační mechanismy udržování nebo podporou sebeobnovovací schopnosti buněk, narušením kontroly normální proliferace, blokováním diferenciací a podporováním rezistence k apoptóze.

Léčba ALL v posledních desítkách let dosáhla velkých pokroků. Do kompletní remise se dostane 98% všech léčených dětí a víc než 70% v ní zůstává. Zbýlých 20-25% dětí recidivuje. Důležitým krokem je v současnosti zaměřit se na léčbu reziduální nemoci tj. na leukemické buňky, které jsou rezistentní vůči iniciální chemoterapii.

Specifickou skupinu ALL tvoří pacienti s fúzním genem TEL/AML1. U dětí s touto translokací je pozorována rychlá odpověď na iniciační léčbu a proto jsou řazeny do skupiny s příznivou prognózou. Poněvadž však i u nich dochází k relapsom onemocnění, zaměřili jsme se u této genotypicky definované podskupiny ALL na cílenou terapii. V první části jsme se snažili objasnit mechanismus účinku L-Asparaginázy (L-Asp) vzhledem k popsané vyšší citlivosti TEL/AML1 pozitivních pacientů na toto cytostatikum a dále jsme studovali nový přístup v léčbě využitím inhibitorů deacetyláz histonů (HDACi).

Charakteristika podskupin ALL

Nejčastějšími a nejvýznamnějšími nenáhodnými genetickými aberacemi nacházenými u neoplázií z B prekurzorů jsou změny v počtu chromosomů a translokace t(12;21), t(9;22), t(1;19) s fúzními geny TEL/AML1, BCR/ABL respektive E2A/PBX1 a přestavby genu MLL.

Změny v počtu chromosomů

Jedna z největších podskupin ALL je charakterizována tím, že nese ve svých blastech zvýšený počet chromosomů - hovoříme o nízce hyperdiploidní (nad 47 chromosomů) a vysoce hyperdiploidní (nad 50 chromosomů či DNA index $\geq 1,16$) ALL. Vysoce hyperdiploidní leukémie tvoří asi 25% dětských ALL, v dospělosti jejich podíl postupně klesá na přibližně 3-5%. Hyperdiploidní blasty jsou citlivější k některým cytostatikům a *in vitro* vykazují zvýšenou apoptózu. U dětí je tato abnormalita spojena s velmi dobrou prognózou (přežití bez známek onemocnění (DFS) 80-90%). Molekulární podstata maligní transformace u tohoto typu leukémie není dosud odhalena. I když zastoupení nadpočetných chromosomů není zcela náhodné (nejčastěji se objevují 3-4 kopie chromosomů X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 a 21), variabilita je příliš velká a tak se zatím nepodařilo určit, které specifické genetické oblasti jsou v patogenezi těmi klíčovými. Dosud publikovaná data pouze naznačují, že vznik hyperdiploidie je první či časnou změnou (ne-li ve všech případech pak alespoň v některých vzniklou již prenatálně) a druhým zásahem může být například mutace v genu pro receptorovou kinázu FLT3(3). Dobrá prognóza u dětských případů je spojována především s nadbytečnými chromosomy 4, 10 a 17.

Hypodiploidní leukémie tvoří asi 5% případů a jejich zastoupení se s věkem významně nemění. Na rozdíl od hyperdiploidních jsou spojovány s významně horší prognózou, zejména tam, kde je počet chromosomů nižší než 40-42 (DFS 10-60%)(4,5).

t(9;22)(q34;q11) s fúzním genem BCR/ABL

Derivovaný chromosom 22 účastnící se translokace $t(9;22)(q34;q11)$ bývá označován jako Philadelphský (neboli Ph) chromosom. Byl poprvé popsán vědci z Philadelphie (odtud jeho název) v roce 1960 a je historicky první cytogenetickou abnormalitou specificky asociovanou s maligním onemocněním. V roce 1973 bylo odhaleno, že Ph chromosom je produktem translokace $t(9;22)$ a v polovině 80. let byly klonovány a popsány i geny ABL a BCR, které se této translokace účastní. Philadelphský chromosom je charakteristickým znakem chronické myeloidní leukémie (CML) a u dětské ALL se vyskytuje relativně vzácně – asi ve 4% případů. S věkem pak jeho zastoupení mezi ALL roste a u starších dospělých tvoří BCR/ABL pozitivní leukémie až čtvrtinu všech ALL. Podle oblasti místa zlomu v genu BCR rozlišujeme několik variant hybridního genu BCR/ABL, mezi nimi tři základní: nejkratší m-BCR/ABL („minor“), častý právě u dětí s ALL, M-BCR/ABL („Major“) charakteristický pro CML, ale vyskytující se i u pediatrických ALL, a nejdelší, vzácnou variantu μ -BCR/ABL („micro“), nalezenou u sporadických případů CML, charakterizovaných jako chronické neutrofilní leukémie (CML-N), ale i u klasických CML. To, že se určité typy přestaveb vyskytují preferenčně u určitých onemocnění, ukazuje na vliv fúzního proteinu BCR/ABL na transformaci hematopoetických buněk. Tato schopnost byla prokázána v experimentálních pokusech *in vitro* a na myších modelech. Translokací dochází k interakci proteinu BCR/ABL s beta (c) podjednotkou receptoru pro interleukin-3 a ke konstitutivní aktivaci buněčné tyrozín-kinázy ABL. U ALL se mohou vyskytovat oba nejčastější typy hybridních proteinů – $p190^{bcr/abl}$ i $p210^{bcr/abl}$, translační produkty minor respektive Major varianty fúzního genu. Zatím nebyl nalezen signifikantní rozdíl v průběhu a prognóze onemocnění s jedním či druhým typem přestavby, léčebné výsledky jsou u obou variant stejně nepříznivé - ve většině terapeutických protokolů je přítomnost BCR/ABL považována za prognosticky negativní marker a tito pacienti jsou obvykle řazeni do léčebných ramen s nejvyšším rizikem(4,6,7).

Přestavby genu MLL (11q23)

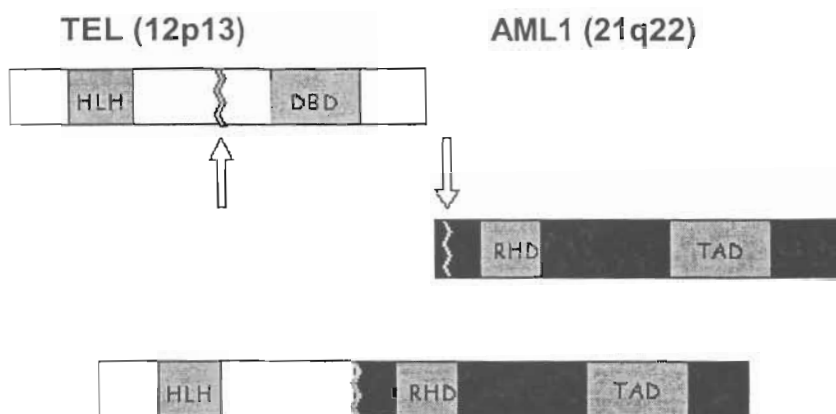
Gen MLL, který leží na dlouhém raménku 11. chromosomu, je u hematologických malignit mimopřádně promiskuitním translokačním partnerem. Dosud bylo popsáno více než 80 chromosomálních lokusů, se kterými se MLL gen spojuje, a z nich více než 50 již bylo i charakterizováno na genové úrovni. Nejčastějšími partnery jsou geny AF4 (MLLT2), AF9 (MLLT3), ENL (MLLT1), AF10 (MLLT10) a AF6 (MLLT4), které jsou součástí translokací t(4;11), t(9;11), t(11;19), t(10;11) respektive t(6;11) a které tvoří dohromady asi 85% případů. Přestavby MLL se objevují u lymfoidních i myeloidních leukémií a výsledky studií expresních profilů leukémií s těmito přestavbami ukazují, že tvoří zvláštní skupinu onemocnění stojící mezi klasickou ALL a akutní myeloidní leukémií (AML). Leukémie s translokacemi zahrnujícími chromosomální lokus 11q23 jsou typické zejména v kojeneckém věku, kde tvoří až 80% všech akutních leukémií, u ostatních dětských leukémií jsou relativně vzácné (s výjimkou akutních myeloidních leukémií podtypu M5) a o něco častěji se s nimi pak setkáváme u starších dospělých s ALL. Relativně časté jsou u leukémií sekundárních, vzniklých následkem cytostatické léčby - je prokázáno, že některá cytostatika (zejména inhibitory topoisomerázy II a antracyklíny) způsobují zlomy v MLL genu a vyvolávají tak vznik translokací(8).

I když se i u leukémií s MLL přestavbou předpokládá nejméně dvoustupňový model, jejich latence je obvykle (na rozdíl například od ALL s TEL/AML1 fúzí) velmi krátká. Navíc jsou leukémie s přestavbou genu MLL považovány obecně za prognosticky nepříznivé. Jakým přesným mechanismem poškození MLL genu přispívá k leukemogenezi není ani zde zcela objasněno, ale bylo prokázáno, že u těchto leukémií dochází k významným změnám v expresi homeoboxových (HOX) genů, které jsou zodpovědné za diferenciaci buněk(9,10). Zdá se, že svou důležitou úlohu hrají i reciproké translokační produkty genu MLL, tedy nejen chiméry MLL/"translokační partner", ale i "translokační partner"/MLL. Vysvětlení krátké latence a vysoké agresivity MLL pozitivních leukémií pak bylo cílem nedávno publikované studie, která ukázala, že exprese fúzního genu MLL/ENL v myších progenitorech vede k poruchám opravných mechanismů po poškození DNA a tím k dramatickému zvýšení incidence dalších chromosomálních

abnormalit v proliferujících buňkách. Tento fenotyp je spojen s alterací schopnosti zástavy buněčného cyklu a/nebo apoptózy(11,12).

TEL/AML1 pozitivní ALL pacienti

Nejčastější chromosomální aberací u dětí s ALL je translokace t(12;21)(p13;q22). Tato chromosomální změna je přítomna přibližně u 25% pacientů s prekurzorovou ALL z B řady (BCP-ALL)(1,7). Translokace zahrnuje gen TEL (také označovaný ETV6) ležící na lokusu 12p13 a gen AML1 (také označovaný CBFA2 anebo RUNX1) na lokusu 21q22. Tato translokace spojuje 5' konec genu TEL (aminokyseliny 1-336) „in frame“ s téměř celým genem AML1 (aminokyseliny 21-480). Zlomová místa se objevují v intronu 5 genu TEL a v intronu 1 genu AML1. Druhá častá varianta je výsledkem fúze mezi intronem 5 na TEL a intronem 2 na AML1. Translokace t(12;21) tvoří fúzní gen TEL/AML1 a jeho reciprokou variantu AML1/TEL. Přibližně 70% TEL/AML1 pozitivních pacientů má také delecii netranslokovaného genu TEL(13-16). U těchto pacientů byly také popsány přidatné chromosomální změny jako je trisomie 21 a duplikace der(12)(12;21) a to hlavně u relapsů onemocnění(17-19). Pacienti s tímto genotypem tvoří homogenní skupinu vyznačující se diploidním obsahem DNA a přítomností typických povrchových antigenů jako je hyperexprese CD10, pozitivita CD19 a negativita CD20, což je řadí výhradně mezi B-prekurzorové leukémie. Byla u nich popsána také aberantní exprese myeloidních znaků – CD15 a CD33(20). Kumulace incidence leukémie s touto abnormalitou je u dětí v předškolním věku, nenachází se u kojenců (dětí pod jeden rok života) a jen ve výjimečných případech se objevuje u dospělých (<3%)(21,22). TEL/AML1 pozitivní leukémie představují leukémie s dobrou časnou odpovědí na léčbu, což je řadí mezi leukémie s dobrou prognózou. Vyskytují se u nich hlavně pozdní relapsy, ale i u těch bývá odpověď na léčbu zpravidla velmi dobrá a to je řadí mezi jednu z prognosticky nejpříznivějších podskupin dětské ALL(23-25).



Obrázek č.1 Znárodnění reciproké translokace mezi 12. a 21. chromosomem za vzniku fúzního genu TEL/AML1

Gen TEL

Gen TEL (Translocation – ETS – Leukemia) lokalizovaný na lokusu 12p13 byl **původně identifikován** jako součást řady chromosomálních translokací včetně t(12;21), t(5;12) a t(9;12)(26,27). TEL patří do skupiny ETS faktorů, se kterými má homologii v evolučně konzervované ETS doméně (DNA-vazebná doména) a obsahuje také N-terminální „pointed“ doménu (PNT) se specifickým motivem HLH (Helix-Loop-Helix), homologní s Pointed proteinem drozofily podílejícím se na embryonálním vývoji(28). ETS faktory kontrolují expresi genů kritických pro celou řadu biologických procesů včetně buněčné proliferace, diferenciace, vývoje, transformace a apoptózy(29). Kromě interakce DNA-protein se doména ETS účastní interakcí protein-protein. PNT doména se zúčastňuje homo-oligomerizace, heterodimerizace, transkripční represe a nukleárního exportu proteinu TEL(30-32). TEL patří do malé podtřídy ETS transkripčních represorů, jejichž aktivita je kontrolována mitogenními signály a/nebo signály regulujícími buněčný cyklus. Tyto ETS proteiny jsou cílem signální dráhy MAPK(33). Represní doména je tvořena velkou centrální doménou proteinu TEL (kódovanou exonem 5) a další část se skládá z domény ETS a 50 aminokyselin „upstream“ od domény ETS(34). Represe mediovaná proteinem TEL je asociována s vazbou korepresorů mSin3A

a SMRT/N-CoR(31,35,36). Asociace SMRT/N-CoR a mSin3A navzájem a s deacetylázemi histonů (HDAC) zprostředkovává represi pomocí různých DNA-vazebných represorů transkripce(37,38). Vazba HDAC na cílové promotory způsobuje deacetylaci histonů, hlavně H3 a H4. Deacetylace histonů usnadňuje chromatinovou kondenzaci a promotor se stává hůře přístupným transkripční mašinérii(39). Homozygotní delece TEL u myši vede k defektům ve vývoji vaskulárního systému žloutkového váčku a následně k embryonální smrti. Pro fetální krvevobru nemá TEL klíčový význam a není pravděpodobně nutný k udržení fetální homeostázy v žloutkovém váčku a v játrech(40). U TEL-deficientních embryonálních kmenových buněk však nedochází k „homingu“ do kostní dřeně příjemce(41). Tyto výsledky charakterizují TEL jako první transkripční faktor potřebný k ustavení hematopoézy v kostní dřeni. TEL exprimovaný v RAS-transformovaných NIH3T3 buňkách inhibuje jejich růst a indukuje buněčnou agregaci(42,43). TEL navíc reprimuje expresi stromelyzínu-1, extracelulární matrixové metaloproteinázy (MMP), která remodeluje extracelulární matrix. MMP je potřebná pro angiogenezi, remodelaci tkáně a invazi nádorových buněk(44). V souvislosti s inhibicí stromelyzínu-1 nádory exprimující TEL nejsou schopné invaze do okolních svalů(42). Z těchto pozorování vyplývá, že TEL je potřebný pro buněčnou migraci a bude sehrávat úlohu v kontrole růstu a v buněčné adhezivitě. TEL zasahuje také do aktivity onkoproteinu FLI-1 a do apoptotických drah přes člena anti-apoptické rodiny BCL, Bcl- X_L(45).

Chromosomální přestavby, ve kterých je gen TEL přítomen, vedou ke vzniku myeloidních anebo lymfoidních leukémií a solidních tumorů. Fúzní partneři proteinu TEL mohou být rozděleni do dvou skupin: tyrozínové kinázy a transkripční faktory. Translokace genu TEL s tyrozín kinázou je přítomna například v t(5;12) (TEL/PDGFRB) u chronické myelomonocytární leukémie, v t(9;12)(q34;p13) (TEL/ABL) u akutní myeloidní leukémie, chronické myeloidní leukémie (CML) a ALL, v t(9;12)(q24;13) (TEL/JAK2) u ALL a CML(46-49). V těchto případech aberantní regulace kinázové aktivity přispívá k leukemogenezi. Fúze TEL s transkripčními faktory mohou zachovat anebo eliminovat DNA-vazebnou aktivitu proteinu TEL. MN1/TEL u myeloproliferativního onemocnění zachovává doménu ETS a konvertuje TEL z represoru na aktivátor(50,51). U

t(12;21) (TEL/AML1) u ALL dochází ke ztrátě domény ETS a TEL funguje jako konstitutivní inhibitor transkripce cílových genů proteinu AML1(52).

Gen AML1

Gen AML1 leží na lokusu 21q22 a jeho proteinový produkt je součástí komplexu CBF - Core Binding Factor(53,54). CBF je heterodimerický transkripční faktor patřící do rodiny „runt-domain“, obsahuje podjednotku CBF β a jednu z podjednotek CBF α . Do skupiny α podjednotek zařazujeme transkripční faktory: AML1, AML2 (RUNX3 nebo CBFA3) a AML3 (RUNX2 nebo CBFA1). AML2 a AML3 jsou lokalizovány na lokusech 6p21 a 1p26. Jsou exprimovány v odlišných tkáních, AML3 je transkribován v osteoblastech a je nezbytný pro jejich diferenciaci a AML1 je exprimován takřka výlučně v hematopoetických buňkách a gangliových buňkách nervového systému(55). Všechny podjednotky CBF α nesou vysoce evolučně konzervovanou doménu o 128 aminokyselinách nazývanou „runt homology domain“ (RHD), zodpovědnou za heterodimerizaci s CBF β podjednotkou a zároveň za vazbu s DNA(55-57). Transkripční aktivace probíhá přes C-terminální transaktivační doménu (TA). AML1 je fyziologicky exprimován u všech hematopoetických linií, reguluje transkripci myeloidně a lymfoidně specifických genů, včetně povrchových receptorů jako je podjednotka T-buněčného receptoru a receptoru pro M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), myeloperoxidázu, neutrofilní elastázu, granzym B a cytokiny jako interleukin-3 a GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)(58-62). Myši postrádající AML1 a/nebo CBF β nevytvářejí fetální hematopoézu v játrech, což poukazuje na nezbytnou přítomnost heterodimerického komplexu CBF pro definitivní hematopoézu všech linií.

Některé práce také naznačují, že CBF reguluje expresi některých členů rodiny genů HOX (63,64). Transkripční faktory HOX se váží na DNA a regulují geny účastníci se diferenciaci embryonálních a také hematopoetických kmenových buněk. Geny HOX jsou navíc důležité pro sebeobnovování a proliferaci hematopoetických kmenových buněk.

AML1 je jeden z nejčastěji deregulovaných genů u leukémií; je součástí mnoha translokací. Translokace zahrnující gen AML1 se objevují u různých

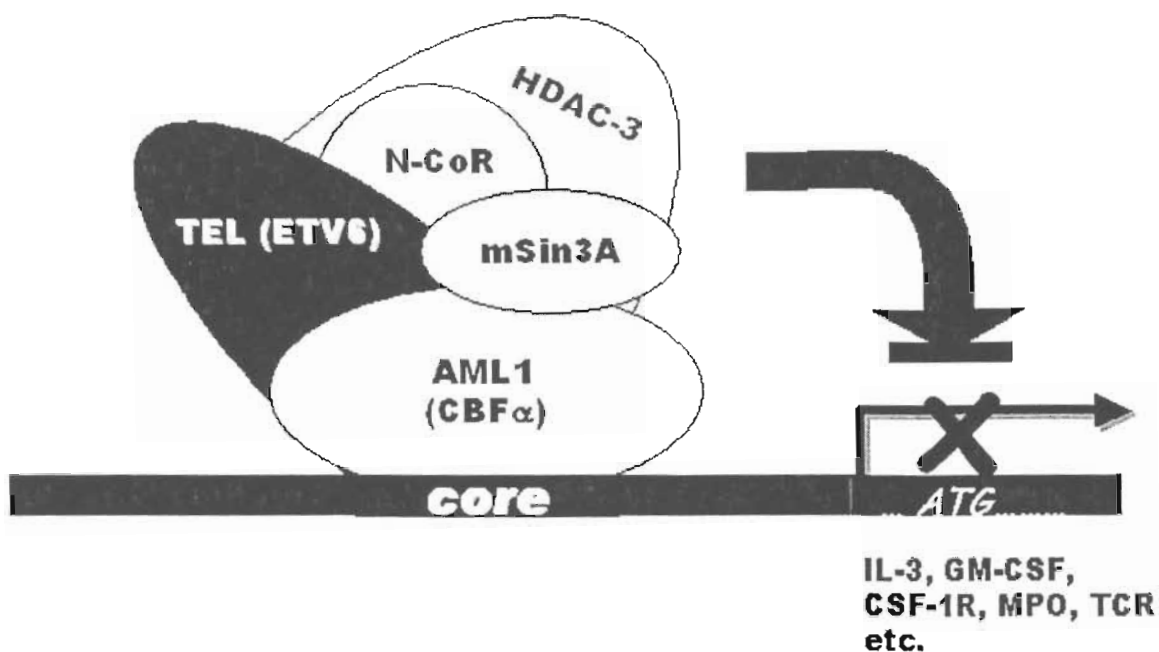
podtypů leukémií s tvorbou fúzních genů kódujících chimérické proteiny jako například AML1/ETO u t(8;21) pozitivní AML, TEL/AML1 u t(12;21) pozitivní ALL, zřídka AML1/MDS1 u t(3;21) pozitivního myelodysplastického syndromu a CML anebo jiné translokace(65-67). Funkce AML1 je narušená také nepřímo, příkladem je inv(16), kde je gen pro CBF β fúzován ke genu pro myozinový řetězec hladkého svalstva(68). V nedávné době byly popsány i jiné mechanismy poruchy funkce AML1 jako je bodová mutace anebo amplifikace genu AML1 u ALL(69). Overexprese CBF u inv(16) působí represivně a inhibuje progresi buněčného cyklu, na základě čehož se předpokládá úloha AML1 resp.CBF v G1 fázi buněčného cyklu. Některé práce zas naznačují, že exprese AML1 reguluje přechod mezi G1 a S fází(70,71).

CBF má sám o sobě poměrně slabý transaktivační potenciál pro expresi cílových genů. Exprese těchto genů je závislá na přítomnosti dalších vazebných míst pro ostatní „lineage restricted“ transkripční faktory jako je c-Myb, C/EBP α a členové rodiny ETS. CBF vystupuje ve funkci vazebného organizátora, který váže další tkáňově specifické transkripční faktory do nukleoproteinových komplexů anebo enhanceosomů, které stimulují tkáňově specifickou transkripci(72,73). AML1 se váže na specifické regulační místo TGTGGT(74). Tento komplex zahrnuje transkripční aktivátory p300 a CBP (CREB-binding protein), které mají vlastní histon-acetyltransferázovou aktivitu a přidávají acetylovou skupinu k histonům vážícím DNA, čímž způsobují konformační změnu chromatinu zvyšující transkripci cílových genů. Na druhé straně, AML1 způsobuje inhibici transkripce vazbou s komplexem mSin3A a/nebo groucho/TLE proteiny a HDAC, které chromatin uzavírají. Z toho vyplývá, že AML1 může fungovat nejen jako aktivátor, ale také jako transkripční represor. AML1 hraje v transkripci genů potřebných pro proliferaci a diferenciaci normálních hematopoetických buněk ústřední roli, proto abnormality tohoto proteinu přispívají různými cestami k leukemogenezi.

Funkce fúzního proteinu TEL/AML1

Základní hypotéza funkce TEL/AML1 vychází z předpokladu, že tento chimérický protein slouží jako aberantní transkripční faktor s represní aktivitou. Existují však různé teorie o mechanismu této represivní funkce TEL/AML1. V této

kapitole načrtneme ty základní. První studie vychází ze sledování promotorové aktivity genu Cr1 (komplementový receptor 1). Z analýzy vyplývá, že AML1 zvyšuje jeho aktivitu, přičemž TEL jeho bazální aktivitu reprimuje. Zvýšená aktivita promotoru genu Cr1 způsobená proteinem AML1 byla potlačena přítomností proteinu TEL, a to v závislosti na koncentraci. Když jsou TEL/AML1 a AML1 přítomny v buňce současně, protein TEL/AML1 inhibuje transkripční aktivitu proteinu AML1 bez ohledu na to, že TEL/AML1 si zachovává transkripční doménu proteinu AML1(75). Další studie hovoří o tom, že TEL/AML1 heterodimerizuje s proteinem TEL a zabraňuje tak jeho represní aktivitě(76). Druhá teorie vysvětluje dominantně negativní efekt TEL/AML1 přes vazbu na jaderné koaktivátory, které izoluje do komplexu lokalizovaného v cytoplazmě. Jedním z koaktivátorů je p300, který se váže na transkripční doménu AML1 a jeho izolace tak zabraňuje transkripční aktivitě proteinu AML1(76,77). Další práce ukazuje, že následkem sumoylace - posttranslační modifikace – proteiny TEL a TEL/AML1 mění svou lokalizaci v rámci buňky a to může také přispívat k procesu neoplastické transformace(78). Posledním navrženým mechanismem je „recruitment“ korepresorů (mSin3A, N-CoR) k fúznímu proteinu TEL/AML1 vazbou přes vazebná místa umístěná v částech odpovídajících původním proteinům TEL a AML1. N-CoR a SMRT se vážou na protein TEL, mSin3A na oba transkripční faktory. Navíc je vazba mSin3A k proteinu TEL/AML1 pevnější než k samotnému TEL nebo AML1 proteinu, což naznačuje, že tento korepresor je klíčovým stabilizátorem celého komplexu(31,58). Tento korepresorový komplex pak na sebe váže HDAC, konkrétně histon deacetylázu – 3 (HDAC-3)(79), která mění chromatinový vzorec promotorů cílových genů faktoru AML1. (Viz Obr.2)



Etiologie TEL/AML1 pozitivní ALL

Tak jako několik jiných podskupin pediatrických ALL, t(12;21) pozitivní ALL je iniciována *in utero*(80). Studované modely fúzního proteinu TEL/AML1 jsou heterogenní. Studie na myších modelech ukazují, že přestože samotná přítomnost TEL/AML1 není dostatečná pro vznik leukémie, fúzní gen může mít za následek její vznik, pokud jsou přítomny přídatné mutace. Příkladem takového modelu *in vivo* jsou p16/p19-deficientní myši s buňkami kostní dřeně transdukovány retrovirálním vektorem exprimujícím TEL/AML1, které vyvinuly leukémii ve vysoké frekvenci ve srovnání s myši transplantovanými identickými buňkami bez deficitu genů p16/p19(81). U modelu TEL/AML1 popsaného Fisherem a kol. nebyl navzdory akumulaci jak multipotentních tak B-buněčných progenitorů pozorován vznik leukémie v průběhu období jednoho roku(82). Další práce ukazují, že TEL/AML1 dramaticky mění diferenciaci hematopoetických progenitorů *in vitro*, preferenčně vývoj B lymfocytů zvýšením samoobnovovací schopnosti B prekurzorů a založením trvalé pre-B buněčné linie závislé na růstovém faktoru(83). V myším modelu Tsuzukiho a kol. s kmenovými buňkami transdukovány genem TEL/AML1 exprese TEL/AML1 inhibovala diferenciaci B

buněk, což vedlo ke kumulaci časných B-buněčných progenitorů. To by mohlo nasvědčovat potenciálnímu mechanismu prodlouženého preleukemického stavu, který často předchází ALL(84). Ani v tranzientním myším modelu, kdy myši v lymfoidních buňkách exprimovaly protein TEL/AML1, nedošlo k žádné maligní hematologické poruše ani žádné histopatologické nebo imunofenotypické změně(85). V souladu s těmito pozorováními se zdá, že pro plnohodnotnou maligní transformaci je zapotřebí přídatné události(86-89). Vznik vlastní leukémie pak vyvolá až druhý (postnatální) zásah, analogicky s tzv. dvouzásahovou teorií popsanou Knudsonem(90). Delece druhé alely genu TEL přítomná u 70% pacientů je považována za takový možný druhý zásah v leukemogenezi TEL/AML1 pozitivní ALL(26,91). Jedním z důležitých objevů posledního desetiletí je nález buněk (pre)leukemického klonu ve vzorcích pupečnickové krve některých dětí s AL, dokládající *in utero* původ leukémií. Jiné práce potvrdily původ preleukemického klonu z Guthrieho kartiček - kapek zaschlé novorozenecké krve - pomocí detekce charakteristických fúzních genů(87,92). Dále Taub a kol. prezentovali, že u 70% případů hyperdiploidní leukémie byla pomocí detekce leukemo - specifického genu pro těžký imunoglobulinový řetězec prokázána přítomnost preleukemických buněk již v pupečnickové krvi pacientů(93). Fúzní gen TEL/AML1 byl detekován u 1% všech vyšetřených pupečnickových kreví zdravých novorozenců, což je 100 násobně vyšší frekvence než je incidence onemocnění. To se shoduje s tzv. infekční teorií vzniku dětské ALL popsanou Greavesem a kol., která poukazuje na velké rozdíly v incidenci onemocnění v industriální a méně industriální části světa(94,95). Tato teorie hovoří o tom, že dětská ALL vzniká důsledkem nedostatečného vystavení antigenním podnětům a selháním modulace imunitního systému v kojeneckém a časném batolícím věku. Efektivní přechod z Th2 odpovědi při narození na pozdější Th1 odpověď buněčné imunity může být kritický pro interferonem γ zprostředkovanou eliminaci aberantních klonů a/nebo jejich eliminaci pomocí přirozených zabijců – NK buněk. Zajímavým se zdá být pozorování, že některé leukémie (např. TEL/AML1) zvýšeně exprimují kostimulační molekuly a tak umožňují být lépe rozeznané NK buňkami a/nebo cytotoxickými T lymfocyty(96).

Prognóza TEL/AML1 pozitivní ALL

Dlouhodobé přežití dětí s ALL stoupl v průběhu 40 let z nulové šance na přežití počátkem 60. let 20. století na 80% počátkem 21. století. V České republice EFS (přežití bez události; event free survival) dětí s ALL po léčbě protokolem BFM 95 bylo 72,9% (OS (celkové přežití; overall survival) 80,2%). Po léčebném protokolu ALL IC-BFM 2002 po dobu sledování 3 let je EFS 81% pro dívky a 80% pro chlapce. Vývoj úspěšné terapie slouží jako příklad pro rozvoj léčebné strategie zhoubných nádorů všech typů. Laboratorní výzkum zásadně prohloubil naše znalosti o biologii buňky. Úspěchy v léčbě byly dosaženy především intenzifikací chemoterapeutické léčby a stratifikací pacientů do skupin standardního, středního a vysokého rizika selhání terapie. Toto dělení probíhá na základě určení počtu leukocytů při diagnóze, věku pacientů, odpovědi na prednison a identifikací genotypických změn leukemických buněk pacientů. Do skupiny s vysokým rizikem jsou zařazováni například pacienti s Ph chromosomem (BCR/ABL). Pacienti s dobrou prognózou, jako jsou ti s hyperdiploidním obsahem DNA v leukemických buňkách, jsou stratifikováni do skupiny standardního rizika. Fúzní gen TEL/AML1 je považován za dobrý prognostický znak(24). Existuje však kontroverze mezi tímto tvrzením a vysokým počtem pozdních relapsů u této skupiny pacientů léčených podle protokolu BFM. Na rozdíl od těchto výsledků, studie Dana Farber Cancer Institute dobrou prognózu pacientů s TEL/AML1 chimérickým genem potvrzují(25). Existují dvě vysvětlení, jedno vychází ze studií Guthrieho kartiček a tzv. lag periody, která předchází klinickou manifestací. Tato teorie předpokládá, že pozdní relapsy jsou vlastně jiné leukémie. Potvrzuje to studie, která srovnávala delece druhé alely TEL u diagnózy a pozdního relapsu. Tyto delece byly rozdílné, u relapsu byla delece o něco kratší, co nasvědčuje tomu, že se jednalo o nový leukemický klon, pravděpodobně pocházející z perzistujícího aberantního fetálního preleukemického klonu. Jednalo se tedy o novou leukémii(97). Druhým možným vysvětlením je, že TEL/AML1 pozitivní pacienti byli v protokolu BFM stratifikováni do skupiny s méně intenzivní léčbou ve srovnání s protokolem DFCI 95-01 (Dana-Farber Consortium Protocol) a proto se během iniciální chemoterapie nepodařilo eradikovat všechny preleukemické buňky(25). Na základě sledování citlivosti

pacientů s ALL na jednotlivá cytostatika používaná běžně v terapii byla u pacientů s fúzním genem TEL/AML1 popsána vyšší citlivost právě na L-Asp(98), což by vzhledem k jejímu velmi rozdílnému dávkování v různých protokolech mohlo být dalším podkladem pro vysvětlení lepších výsledků u této skupiny.

Vývoj terapie pacientů s AL

V pozdních 80. letech 20. století došlo k obrovskému posunu v pohledu na terapii AL. Molekulární a genetický přístup odhalil naprosto nové signální dráhy, které regulují buněčné aktivity jako je proliferace a přežívání. Mnoho z těchto drah je v nádorových buňkách pozměněných. Vědci se soustředili na možnou opravu těchto molekulárních defektů a to vedlo ke vzniku tzv. cílené terapie. Nové cíle zahrnují růstové faktory, signální molekuly, proteiny buněčného cyklu a modulátory apoptózy. Inovace v technologiích zvýšily úspěšnost v hledání inhibitorů pro specifické cíle. Kombinační chemie poskytla tisíce unikátních struktur pro in vitro skrínink inhibitorů. Molekuly vybrané pomocí „high-throughput“ skríninku mohou být dále optimalizovány pro další vlastnosti. Charakteristikou slibných protinádorových látek je metabolická stabilita s dlouhým poločasem rozpadu v modelových systémech a také u lidí. Za druhé je potřebná dostatečná absorpce po orálním podání. A v první řadě je důležitá nízká toxicita v biologicky účinných dávkách.

Koncem 90. let minulého století byl stejnou cestou vyvinut tyrozín-kinázový inhibitor STI571 dnes známý jako imatinib mesylát, od registrace v roce 2001 s komerčním názvem Glivec (v USA Gleevec). Tato látka se váže na aktivní místo kinázy ABL (rovněž c-kit a PDGFR) a kompetitivně tak snižuje její aktivitu. Zatímco inhibice funkce normální kinázy ABL může být v buňce nahrazena alternativními buněčnými drahami, inhibice BCR/ABL v leukemických blastech vede k zástavě proliferace maligního klonu. Tato cílená terapie je dnes využívána zejména u CML, ale účinku imatinib mesylátu se využívá i v léčbě akutních leukémií. V současné době je ve stádiu vývoje několik dalších tyrozín-kinázových inhibitorů, které by měly mít vyšší účinnost a případně účinkovat i na imatinib-rezistentní klon BCR/ABL pozitivních buněk, pro které jsou charakteristické zejména bodové mutace v kinázové části fúzního genu(6).

V této práci jsme se z hlediska léčby zabývali dvěma látkami, jedna je už dlouhou dobu používána v léčbě dětských pacientů s ALL a další nová potenciální skupina látek charakteristická svým specifickým účinkem patří do skupiny cílených terapeutik.

L-Asparagináza

V roce 1953 Kidd a kol. pozorovali, že u některých lymfomů myši a potkana došlo k supresi proliferace nádorových buněk po kultivaci se sérem morčete. V roce 1961 byla popsána L-Asp jako inhibiční faktor v séru a toto pozorování bylo potvrzeno několika laboratořemi. V roce 1964 Mashurn a Wriston izolovali L-Asp z *E.coli*. V roce 1967 Oettgen a kol. popsal potenciální účinek L-Asp proti leukémiím a lymfomům u člověka(99). *In vitro* studie na vzorcích pacientů s TEL/AML1 pozitivní a negativní ALL ukázaly, že jediný signifikantní rozdíl v senzitivitě na různá cytostatika je u L-Asp(98). Buňky TEL/AML1 pozitivních leukémií jsou výrazně citlivější na toto cytostatikum. Popsaným mechanismem účinku L-Asp je schopnost depletovat asparagin a glutamin z extracelulárního prostředí. Normální nelekemické buňky jsou rezistentní na účinek L-Asp, protože si asparagin syntetizují samy a nejsou závislé na jeho extracelulárním přísunu. Leukemické buňky využívají extracelulární asparagin pro proteosyntézu a jeho nedostatek se projevuje zástavou syntézy a proliferace buněk a přechodem do apoptózy. Asparagin a glutamin byly u lymfoidních buněk označeny za esenciální, protože při nadměrné proliferaci glutamin nahrazuje glukózu a stává se jediným zdrojem energie(100). Nedostatek asparaginu a glutaminu blokuje buňky v průchodu buněčným cyklem. Buňky jsou zastaveny v G1/G0 fázi a procházejí do apoptózy(101). Zároveň u nich dochází ke zvýšené expresi genu pro asparagin syntetázu (AsnS). Mechanismus účinku L-Asp v terapii byl tradičně vysvětlován nízkou aktivitou AsnS v leukemických buňkách(102). Zvýšení exprese AsnS bylo pozorováno v leukemických buňkách s uměle vyvolanou rezistencí na L-Asp(103). AsnS v buňce katalyzuje syntézu asparaginu a glutamátu z aspartátu a glutaminu v přítomnosti ATP. AsnS patří do třídy II glutamin amidotransferázové nadrodiny. Glutamin-utilizační doména leží na N konci přičemž C-konec zahrnuje aktivní část enzymu účastnící se aktivace aspartátu. Sekvence AsnS je vysoce konzervovaná

v rámci druhů(104). Gong a kol. identifikovali AsnS jako gen, který je schopný odstranit blok v G1 fázi buněčného cyklu v teplotně-citlivé mutantní buněčné linii(105). Dalším důkazem regulace buněčného cyklu závislé na AsnS je studie, kdy byl ke klidovým tyroidním buňkám přidán tyroidní stimulační hormon, který podpořil buňky v přechodu do S fáze a došlo zároveň ke zvýšení hladiny AsnS mRNA(106).

Gong a kol. dokumentovali indukci hladiny mRNA AsnS jako odpověď na deprivaci asparaginu, leucinu, izoleucinu a glutaminu(107). Později bylo zvýšení hladiny mRNA pro AsnS pozorováno jako odpověď na deprivaci všech aminokyselin společně a také samostatně(108). Na druhé straně zvýšení hladiny mRNA pro AsnS může být odstraněno přidáním jediné aminokyseliny do „amino acid-free“ média. Tento zdánlivý paradox bude zřejmě objasněn tehdy, až budou odhaleny detaily o časných signálních událostech cesty AAR (amino acid response). Bylo také popsáno, že stupeň represe se liší podle typu deprivované aminokyseliny: glutamin, asparagin, histidin a leucin mají největší efekt, ale aspartát, glycin a glutamát jsou nejslabší represori(108). Shrnutí, výsledky naznačují, že kontrola exprese AsnS není závislá na samotném asparaginu. Guerrini a kol. dokázali, že regulace AsnS po deprivaci aminokyselinami se odehrává na transkripční úrovni(109). Deleční analýzy genu AsnS ukázaly, že po deprivaci aminokyselin je pro indukci AsnS potřebný celý fragment -164 do +44. Mutační studie detekovala v oblasti -70 až -64 místo AARE (amino acid response element) na genu AsnS. Barbosa-Tessman a kol. popsali indukci genu AsnS také po deprivaci glukózy přes cestu ERSR (Endoplasmic Reticulum Stress Response)(100,110). Ukázali, že aktivace genu AsnS oběma AAR a ERSR cestami je zprostředkována stejnými elementy(111).

V současné době je L-Asp používána ve většině protokolů pro léčbu dětských akutních lymfoblastických leukémií a některé studie naznačují její možné použití v léčbě dětských akutních myeloidních leukémií(102). Při samostatném podání vede ke kompletní remisi u 40-60% všech ALL dětských pacientů(112-114). V jednotlivých léčebných protokolech pacientů s ALL se dávky a počet podání liší, ale výsledky naznačují, že pozitivní výsledky léčby, tzn. EFS, koreluje s vyššími dávkami L-Asp. Léčebný protokol DFCl 91-01 prokázal signifikantně lepší výsledek léčby dětských pacientů s ALL pravděpodobně díky prodloužené

intenzifikaci L-Asp. Konkrétně, pacienti kteří tolerovali 25 a méně týdnů L-Asp měli horší výsledky než ti, kteří dostávali L-Asp nejméně 26 týdnů(115). V další studii byly srovnávány výsledky dvou protokolů – COALL (německá pracovní skupina) a DCOG (Dutch Childhood Oncology Group). COALL používá vyšší kumulativní dávku L-Asp. To možná vysvětluje lepší EFS u TEL/AML1 pozitivních pacientů léčených COALL (5-leté EFS - 80%) ve srovnání s TEL/AML1 pozitivními pacienty léčenými DCOG protokolem (5-leté EFS 73%)(116).

Přesný mechanismus nedostatečné aktivity AsnS v leukemických buňkách, regulace exprese genu AsnS v leukemických buňkách, možné interakce s produkty fúzních genů a mechanismus vzniku buněk rezistentních na L-Asp nejsou v současné době detailně prostudovány.

Inhibitory deacetyláz histonů

Transkripční regulace je hlavním mechanismem v zástavě buněčného cyklu, diferenciaci a/nebo buněčné smrti buněk *in vivo* a *in vitro*. Jedním z regulačních mechanismů zapojených do ovlivnění transkripce je změna v terciární struktuře DNA, která ovlivňuje přístup transkripčních faktorů k cílovým segmentům DNA.

V eukaryotickém jádře je DNA sbalena do nukleoproteinového komplexu nazývaného chromatin(117). Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom, který obsahuje DNA, histony (2A, 2B, 3 a 4) tvořený oktamer a molekuly histonu 1 (H1) sloužící jako linker. Nukleosom obsahuje DNA o délce 147bp (párů bází), která se obtáčí přibližně 1,7krát okolo těla oktameru. Nukleosomy jsou navzájem propojeny linkerovou DNA. H1 interaguje s nukleosomem a s linkerovou DNA a podporuje vyšší organizaci a kompaktnost chromatinu. Struktura a kompozice chromatinu jsou rozhodující pro procesy probíhající na úrovni DNA, například přístupnost pro ATP-závislé chromatin-remodelující faktory, reparaci DNA, DNA replikaci a homologickou rekombinaci(118-121). Chromatin-remodelující faktory jsou zodpovědné za aktivitu skládání a rozkládání nukleosomů a také mobilizaci (tzv.sliding) nukleosomů. Navíc jsou histony vystaveny široké škále posttranslačních modifikací jako je acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace, jež mění jejich biofyzikální vlastnosti a působí jako signál pro specifické interakce regulačních faktorů

s chromatinem(122-124). Acetylace (hlavně na H3 a H4) je téměř výlučně spjata s transkripčně aktivním stadiem chromatinu. Proto je funkce acetyltransferázy histonů (HAT) spojována s aktivací a deacetylázy histonů (HDAC) s represí.

Deacetylázy histonů jsou charakterizovány svou schopností odstranit acetylovou skupinu z lyzinového zbytku lokalizovaného na histonu a na transkripčních faktorech jako jsou YY1, PLZF a p53(125,126). Konec histonu vystupuje přes DNA na povrch nukleosomu, kde může být enzymaticky modifikován a interagovat s jinými proteiny a sousedními nukleosomy. Deacetylací histonů na aminokyselinových zbytcích vzniká kladný náboj, tím dochází k těsnější vazbě mezi nukleosomy a vytváří se nevhodné prostředí pro transkripci. Naopak po acetylaci zabezpečované HAT dochází k volnější vazbě DNA a histonů a daná oblast se zpřístupní pro transkripční komplex. Acetylace a deacetylace chromatinu je fundamentální životní funkcí všech organismů tvořených jadernými buňkami. Enzymy tohoto procesu zabezpečují rovnováhu v aktivitě chromatinu, která je důležitá pro normální vývoj buněk. Narušení této rovnováhy může vést k malignímu zvratu.

HDAC se řadí do tří hlavních tříd na základě homologie s kvasinkovými proteiny rpd1, hda1 a SIR2(127). HDAC se liší ve vzorci exprese, ve schopnosti spojovat se s korepresory a rovněž v molekulární struktuře. Některé HDAC jsou schopné heterodimerizace nebo existují v různých komplexech - tvoří například větší komplexy s korepresory jako jsou mSin3A, retinoblastomový protein anebo N-CoR/SMRT(128,129). HDAC rovněž zprostředkují „silencing“ efekt DNA metylace vazbou metyl CpG-vazebných proteinů (MeCP2) a DNA metyltransferasy 1 a 3a. HDAC jsou rozhodujícími členy korepresorových komplexů vytvářených transkripčními faktory účastnícími se leukemogeneze, jako jsou Bcl-6 a MLL a také fúzní geny AML1/ETO, PML/RARA a TEL/AML1(130-132). Tabulka s přehledem jednotlivých tříd HDAC je převzata z review Melnicka a Lichta (2002)(133).

Table 1. The human histone deacetylase families

Family	Enzyme	Corepressors	Transcription factors	Comment
Class I	HDAC 1	Sin3, NuRD, MeCP2, Subtype of NCoR complex, SET proteins, DNMTs, Rb, Groucho, Sharp, topo II, CoREST, WNT pathway, TAL	p53, Bcl-6, PLZF, NFκB, MAD/MAX, ETO, BRCA1	Critical target in most leukemias
	HDAC 2	Sin3, NuRD, MeCP2, Subtype of NCoR complex, SET proteins, DNMTs, Rb, Groucho, Sharp, CoREST	p53, Bcl-6, PLZF, NFκB, MAD/MAX, ETO, BRCA1	Critical target in most leukemias
	HDAC 3	NCoR, SMRT	Potentially any NCoR and SMRT partner, GATA, NFκB, Class II HDACs	Critical target in leukemias. Deacetylates transcription factors.
	HDAC 8		In contrast to other HDACs, appears active in the absence of cofactors	
Class II	HDAC 4	NCoR, SMRT	MEF2	Nuclear shuttling controlled by 14-3-3, ERK1/2, CaMK
	HDAC 5	NCoR, SMRT	MEF2, GATA2	Nuclear shuttling controlled by 14-3-3, CaMK
	HDAC 6		Two catalytic domains. Insensitive to trapoxin, CHAP and butyrate	
	HDAC 7	NCoR, SMRT	MEF2	Nuclear shuttling controlled by 14-3-3, CaMK
	HDAC 9 HDAC 10	N/A N/A	MEF2 HDAC3	B-Cell Malignancies N/A
Class III	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7	SIR complex	F53	Aging, heterochromatin functions
			N/A	

Před 25 lety byla objevena schopnost butyrátu sodného reverzibilně inhibovat HDAC(134). V současnosti je známo již několik tříd inhibitorů deacetyláz histonů (HDACi) s různou chemickou strukturou, účinkem a specifitou(135,136). HDACi indukují zástavu růstu, diferenciaci a apoptózu v různém rozsahu. Byly derivovány z přírodních i syntetických zdrojů, některé produkty byly vybrány na základě skrininku malých molekul s účinkem inhibitorů HDAC(137,138). Až na výjimky mohou být rozděleny do skupiny derivátů kyseliny hydroxamové, karboxylátů, benzamidů, elektrofilních ketonů a cyklických peptidů. Některé z nich mají polární konec, kterým se váží ke kritickému zinkovému iontu v katalytickém pouzdře HDAC, zatímco další část těchto látek blokuje kanály vedoucí k aktivní části, jak bylo prokázáno krystalografickou metodou u SAHA - suberoylanilidu kyseliny hydroxamové(139). Nejčastěji klinicky testované látky z této skupiny byly butyráty – jednak díky snadné syntéze a také proto, že byly už léčebně podávány. Butyrát sodný je nespecifický a již v malých dávkách značně toxický. Do nové generace látek jsou zařazeny SAHA, pyroxamid, depsipeptid a MS-275, které jsou méně toxické v dávkách potřebných pro inhibici HDAC. V nedávných studiích byl popsán účinek dalšího inhibitoru HDAC, valproové kyseliny (VPA), která se používá běžně u pacientů s epilepsií; její účinek u této diagnózy však nesouvisí s inhibicí HDAC(140). Publikovaná data ukazují, že VPA je účinnější spíše u HDAC I.třídy než u HDAC II.třídy(140).

Mohlo by se zdát, že HDAC nejsou vhodným cílem pro terapii, protože jejich inhibicí může dojít k nespécifickým zásahům do klíčových buněčných funkcí nemaligních buněk. Studie monitorující pomocí expresního profilování procento genů ovlivněných v eukaryotickém organismu působením HDACi se výrazně liší, udávají se hodnoty >5-20%(141,142). Funkční in vitro analýzy potvrdily, že HDACi růst a přežívání normálních buněk neovlivňují. Při studiu indukce apoptózy bylo popsáno, že nádorové buňky na rozdíl od buněk normálních po podání HDACi nepřežívají. Klíčovou roli pravděpodobně sehrávají reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou v normálních buňkách vychytávány thioredoxinem (TXN). Jeho exprese je v těchto buňkách po podání HDACi zvýšena. Protože v nádorových buňkách není TXN exprimován, ROS se v nich akumuluje a dochází ke zvýšení procenta buněk podléhajících buněčné smrti(143). Tabulka s přehledem jednotlivých HDACi je převzata z review Melnicka a Lichta (2002)(133).

Table 2. Histone deacetylase inhibitors

Drugs	Potency	Clinical use in heme malignancies	Comments
Butyrate	nmol/L	Phase I in heme malignancies with azacytidine Phase I in heme malignancies with ATRA Phase I in EBV-induced LPD with gancyclovir Phase II in AML, NHL, MM with azacytidine Phase II with GM-CSF and dexamethasone for relapsed t(8;21) AML	CNS toxicity, non-specific HDAC6 resistant
Valproic acid	nmol/L	Phase III combined with ATRA in AML	FDA approved for epilepsy
Trichostatin A	nmol/L	None in U.S.	Questions about toxicity
Trapoxin	nmol/L	None in U.S.	Irreversible HDAC6 resistant
CHAP	nmol/L	None in U.S.	Irreversible HDAC6 resistant
MS-275	μmol/L	Phase I heme malignancies Phase II solid tumors (incl. NHL)	
Oxamflatin	μmol/L	None in U.S.	
Apidicin	nmol/L	None in U.S.	
Depudicin	μmol/L	None in U.S.	Irreversible
Scraplaid	nmol/L	None in U.S.	
Depsipeptide (FK228)	μmol/L	Phase I AML, CLL, ALL, MM	
N-acetyldinaline	μmol/L	None in heme malignancies	
SAHA	μmol/L	Phase I hematologic malignancies	
Pyroxamide	μmol/L	None in U.S.	
Splitomicin	μmol/L	No	Class III
Sirtinol	μmol/L	No	Class III
Nicotinamide	μmol/L	No	Class III

Významným průlomem při studiu HDACi bylo objevení jejich schopnosti obejít (v kooperaci s retinocydy) aberantní transkripční represi u akutní promyelocytární leukémie (APL) s translokací t(11;17)(132,144). APL sloužila jako první modelové onemocnění, na němž má HDAC podíl. Tato forma leukémie je charakterizována zástavou myeloidní diferenciace leukemických buněk v promyelocytárním stadiu a je způsobena vznikem fúzních proteinů složených z části receptoru pro retinovou kyselinu (RAR) a z části některého z dalších proteinů: PML (>95% případů) nebo PLZF (~5% případů). Pacienti s APL odpovídají na léčbu ligandem RAR, retinovou kyselinou (RA). Na buněčné úrovni dochází k re-inicializaci programu diferenciace leukemických buněk, který

prochází do finální neutrofilní diferenciaci a pak do fyziologické buněčné smrti(145). RAR je transkripční faktor, který v nepřítomnosti RA asociuje s komplexem obsahujícím HDAC a to vede k umlčení RA-cílových genů. Koncentrace RA v buňkách uvolňuje HDAC-komplexy a umožní navázat na cílové geny HAT. V případě APL udržují fúzní proteiny vazbu HDAC-komplexů na RA-cílové geny, přičemž fyziologické koncentrace RA nejsou schopny tuto vazbu odstranit. Vyšší, terapeutické dávky RA disociují HDAC z RAR, fúzní proteiny jsou degradovány a dochází k reaktivaci transkripce RA cílových genů. PLZF/RAR neodpovídá na léčbu RA, ale v kombinaci s HDACi dochází i u tohoto chimérického proteinu k efektivní reaktivaci RA-cílových genů a k buněčné odpovědi(146).

Fúzní proteiny přítomné u jiných typů leukémií mají také schopnost vytvářet komplexy s HDAC. Příkladem je AML1/ETO u AML-M2, který se váže na cílové geny transkripčního faktoru AML1 a předpokládá se, že mění jejich acetylační vzorec. Tato translokace je tvořena všemi čtyřmi doménami původního proteinu ETO a DNA-vazebnou doménou transkripčního faktoru AML1. Fúzní partner ETO je schopen na sebe vázat korepresorové proteiny N-CoR, mSin3A a HDAC-1 a -3(147). Možným mechanismem funkce AML1/ETO v leukemických buňkách je tedy zástava transkripce genů a blok v diferenciaci myeloidních buněk způsobený právě přítomností tohoto represorového komplexu(148). Podobný mechanismus je hypoteticky předpokládán také u aberantního transkripčního faktoru TEL/AML1, neboť TEL má vazebná místa pro N-CoR/SMRT a mSin3A a ty jsou schopny vázat HDAC-3(131).

Výsledky prvních klinických studií použití HDACi u hematologických i nehematologických malignit ve fázi I/II testování byly publikovány nedávno(135,149). Výsledky těchto studií jsou velmi nadějně a potvrzují nízkou toxicitu HDACi v porovnání s momentálně používanými protinádorovými léky.

Cíle dizertační práce

Dizertační práce se zabývá různými pohledy a přístupy k léčbě genotypicky definované podskupiny ALL - TEL/AML1 pozitivní ALL. V první části jsme sledovali mechanismus účinku běžně používaného cytostatika - L-Asp - který se zdá být vzhledem ke zvýšené účinnosti u této skupiny pacientů odlišný. V další části jsme testovali účinek nových látek potenciálně využitelných v terapii – inhibitorů deacetyláz histonů.

Část I

Vycházeli jsme z prokázaného vztahu mezi přítomností hybridního genu TEL/AML1 v leukemických lymfoidních buňkách a vyšší citlivostí na L-Asp, která byla dokázána pomocí MTT cytotoxického testu. Předpoklad byl, že gen TEL/AML1 se podílí na negativní regulaci exprese funkčního antagonisty L-Asp, genu pro AsnS. Dále jsme předpokládali, že mechanismus rezistence na L-Asp, která může souviset s relapsem TEL/AML1 pozitivní leukémie u části pacientů, souvisí se zvýšenou expresí nebo změnou její regulace u genu pro AsnS.

Cílem této studie bylo přispět k objasnění mechanismu regulace exprese genu pro AsnS a jeho vztahu k hybridnímu genu TEL/AML1.

Projekt pro splnění cíle zahrnoval následující body:

- Sledování rozdílu exprese AsnS mezi blasty akutních leukémií a zdravými leukocyty
- Sledování změn regulace exprese AsnS u buněk akutních leukémií s genotypem souvisejícím s vyšší citlivostí na L-Asp a u buněk s nižší citlivostí
- Sledování dynamiky indukované exprese AsnS po podání L-Asp u TEL/AML1 pozitivních vs TEL/AML1 negativních leukemických a normálních buněk
- Sledování vlivu deprivace aminokyselin (asparagin, glutamin) na růst jednotlivých typů buněk a na expresi AsnS (v normálních, leukemických, TEL/AML1 pozitivních buňkách)
- Studium změny regulace exprese AsnS u buněk s *in vitro* vyvolanou rezistencí na L-Asp

- Hlubší studium dráhy zodpovědné za syntézu asparaginu a glutaminu v buňkách meta-analýzou dat expresního profilování dětských pacientů s ALL

Část II

I když leukémie s t(12;21) tvoří 20 – 25% všech dětských ALL, biologický mechanismus transformace lymfoblastů onkogenem TEL/AML1 není zatím ještě zcela objasněn. Tyto leukémie představují skupinu s dobrou prognózou, což je důvodem relativně malého zájmu na dalším zlepšování již tak dobrých výsledků terapie. Avšak v současnosti se ukazuje, že i v této skupině leukémií dochází k relapsům, a to zejména pozdním. Tyto relapsy pak při dostatečně dlouhé době sledování výsledky léčby zhoršují. Je tedy třeba dále zlepšovat léčbu i těchto leukémií novými přístupy.

Předpokládaným cílem této práce byla terapie pomocí VPA, která má vlastnosti inhibitoru deacetyláz histonů a jejíž účinek by měl vést k potlačení represivního vlivu proteinů TEL/AML1 na expresi cílových genů. Předpokládali jsme také zvrácení patologického diferenciačního bloku způsobeného přítomností proteinu TEL/AML1. Tímto přístupem jsme chtěli ověřit možný mechanismus funkce aberantního transkripčního faktoru TEL/AML1 a jeho dominantně negativní účinek. Vlastní komplexní analýzou dat expresního profilování jsme identifikovali cílové geny (TEL/AML1) u lymfoidních buněk, protože tímto přístupem bychom mohli odhalit úlohu AML1 v lymfopoéze.

Cíle jsme rozdělili do těchto bodů:

- Ověření efektu HDACi na TEL/AML1 pozitivní buňky sledováním změn exprese diferenciačních znaků B buněk pomocí průtokové cytometrie a kvantitativní PCR v porovnání s jinými podtypy leukémií (BCR/ABL; TEL/PDGFRB) a kontrolními zralými lymfocyty
 - Analýza buněčného cyklu po ovlivnění buněk inhibitory deacetyláz histonů
 - Přímý důkaz regulace genu pro granzym B (nesoucího vazebné místo pro transkripční faktor AML1) fúzním proteinem TEL/AML1
 - Identifikace cílových genů transkripčního faktoru TEL/AML1 využitím expresního profilování

Metody I

Pacienti

Byly použity výhradně vzorky kostní dřeně dětských pacientů s ALL. Celkový počet TEL/AML1 pozitivních pacientů ve věku 2-6 let byl 20. Ve stejném věkovém rozmezí byly vybrány další 23 vzorky pacientů s BCP-ALL bez fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL a MLL/AF4. Na analýzu rizika relapsu bylo sledováno dalších 10 TEL/AML1 pozitivních a 17 TEL/AML1 negativních pacientů s následným relapsem. Jako kontrola byla použita periferní krev (PB, n=30) zdravých dobrovolníků a neleukemické kostní dřeně (n=2). Podrobněji je metodika shrnuta v článku v časopisu *Leukemia* 2004;18(3):434-41 (viz příloha 1).

Buněčné linie

Buněčná linie REH (TEL/AML1 pozitivní buňky, B- prekurzorová leukemická buněčná linie s translokací (12;21)) byla získána od R. Pieterse (Erasmus Medical Center Rotterdam), Nalm-6 (TEL/AML1 negativní buňky, B-prekurzorová leukemická buněčná linie s TEL/PDGFRB) byla zakoupena z DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Německo. Každých 24h jsme značili buňky trypanovou modří pro detekci viability, analyzovali buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie a zamrazovali pelety buněk na extrakci RNA. Při sledování dynamiky růstu a genové exprese AsnS byly buňky inkubovány s L-Asp (Kidrolase, Rhone-Poulenc Bellon, Francie) v koncentraci 0,4 anebo 4U/ml. Všechny experimenty byly dělány v triplicátech. Podrobněji je metodika shrnuta v článku v časopisu *Leukemia* 2004;18(3):434-41 (viz příloha 1).

Izolace buněk

Mononukleární buňky kostní dřeně a/nebo periferní krve byly izolovány pomocí denzitocentrifugace s Ficoll-Paque (hustota 1,077g/ml, Pharmacia, Uppsala, Švédsko) a uskladněny v -80°C na extrakci RNA.

Izolace RNA a přepis do cDNA

Celková RNA byla extrahována ze standardní koncentrace mononukleárních buněk izolovaných z patientských vzorků nebo buněčných linií

podle modifikované metody Chomczynského a Sacchi(150). Celková RNA byla rozpuštěna v odpovídajícím objemu podle výchozího množství buněk a konvertována na cDNA použitím MoMLV reverzní transkriptázy (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) podle návodu výrobce.

qRT-PCR

Kvantitativní reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce(qRT-PCR) v reálním čase byla prováděna na přístroji LightCyclerTM (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Německo). Pro kvantifikaci jednotlivých genů jsme použili oligonukleotidové hybridizační sondy nebo fluorescenční DNA-vážíci barvivo SYBRGreen. Normalizovaná exprese AsnS a glutamát dehydrogenázy (GDH) (AsnS_N a GDH_N) byla vypočtena jako poměr mezi hladinami exprese AsnS resp. GDH a β -2-mikroglobulinu (β 2m) získanými qRT-PCR.

Složení reakčního pufru, sekvence primerů a sond a teplotní podmínky jsou podrobně shrnuty v článku v časopisu Leukemia 2004;18(3):434-41 (viz příloha 1).

Průtoková cytometrie

Analýza buněčného cyklu byla prováděna z buněčné suspenze pomocí průtokové cytometrie. Vyhodnocování a princip metody je podrobněji shrnutý v článku v časopisu Leukemia 2004;18(3):434-41 (viz příloha 1).

Statistická analýza

Mann-Whitney nepárový neparametrický test byl použit při analýze hladin AsnS_N u patientských a kontrolních vzorků. Celková distribuce AsnS_N hladiny byla testována pomocí metody Kruskal-Wallise. Analýza přežití byla provedena Kaplan-Meierovým testem.

REH linie rezistentní na L-Asp

Pro vytvoření modelu buněčné linie s vysokou rezistencí na L-Asp bylo potřebné selektovat subpopulaci REH buněk inkubací parentální REH buněčné linie při koncentraci L-Asp LC50, kterou jsme stanovili pomocí MTT cytotoxického testu. Buňky byly pěstované v RPMI 1640 s L-Asp až do dosažení exponenciálního růstu. Pak byly buňky přeneseny do čerstvého média bez L-Asp

a kultivovány další týden. Pak byly provedeny experimenty analyzující dynamiku exprese AsnS.

Statistická analýza dat expresního profilování

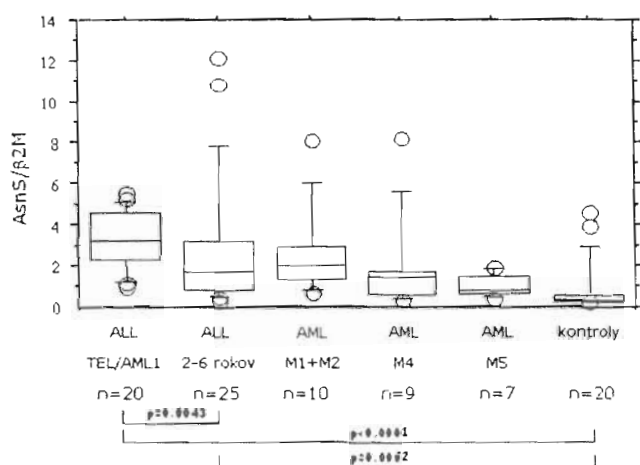
V původních datech expresního profilování pacientů s ALL jsme selektivně hledali geny účastnící se syntézy asparaginu a glutaminu. Na základě této reanalýzy byl vybrán gen pro GDH. Rozdíl v expresních datech genu pro GDH detekovaný pomocí tří různých sad sond (31690-at, 31691-g-at, 37341-at) u TEL/AML1 pozitivních a TEL/AML1 negativních pacientů byl vypočten pomocí Mann-Whitneyho nepárového neparametrického testu. Při analýze výsledků kvantitativní detekce normalizované exprese genu u sledovaných pacientů byl použit tentýž test.

Výsledky I

Porovnání exprese genu pro AsnS v TEL/AML1 pozitivních vs TEL/AML1 negativních leukemických buňkách a ve vzorcích zdravých jedinců

Pro sledování exprese genů AsnS a TEL/AML1 jsme navrhli systémy pro kvantifikaci mRNA pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, qRT-PCR. Jako referenční gen („house-keeping“) pro eliminaci chyb způsobených nestejným počtem buněk a rozdíly v izolaci mRNA sloužil gen pro β -2-mikroglobulin (β 2M), který vykazuje v hematopoetických buňkách stabilní expresi. V první části studie jsme se zabývali expresí genu AsnS při diagnóze u dětí s akutní leukémií (n=66) v porovnání s kontrolní skupinou zdravých osob (n=20) a porovnáním jednotlivých subtypů akutní lymfoblastické a akutní myeloidní leukémie při diagnóze. Sledovali jsme rozdíl exprese AsnS ve vzorcích pacientů TEL/AML1 pozitivních a pacientů s B-prekursorovou leukémií bez fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4(n=23). Všichni pacienti byli diagnostikováni mezi 2.-6. rokem života. TEL/AML1 pozitivní pacienti měli signifikantně vyšší $AsnS_N$ (normalizovaná exprese; medián=0,823) v porovnání s TEL/AML1 negativními pacienty (medián=0,416; p=0,008). Obě tyto skupiny mají v porovnání s buňkami periferní krve zdravých jedinců (medián=0,087) výrazně vyšší expresi AsnS (p<0,0001). Celková distribuce $AsnS_N$ nebyla náhodná (p<0,0001). Analyzovali jsme také

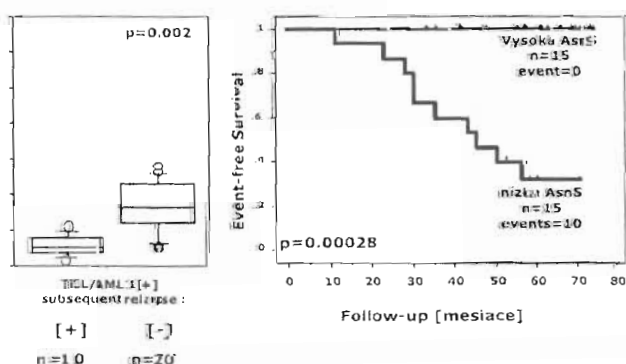
expresi AsnS v blastech pacientů s AML FAB M1 a M2 (n=10), pacientů s AML FAB M4 (n=9) a pacientů s AML FAB M5 (n=7). Na rozdíl od pacientů s ALL, u pacientů s AML FAB M5 (medián=0,215), kteří mají zvýšenou citlivost na podání L-Asp, byla prokázána nižší hladina exprese AsnS v porovnání s ostatními subtypy (medián=0,503; p=0,04). (Viz Obr.3)



Obrázek č.3 Srovnání exprese genu pro AsnS mezi TEL/AML1 pozitivními a ostatními ALL, podskupinami AML a zdravými jedinci

Hladina exprese genu pro AsnS jako prognostický znak

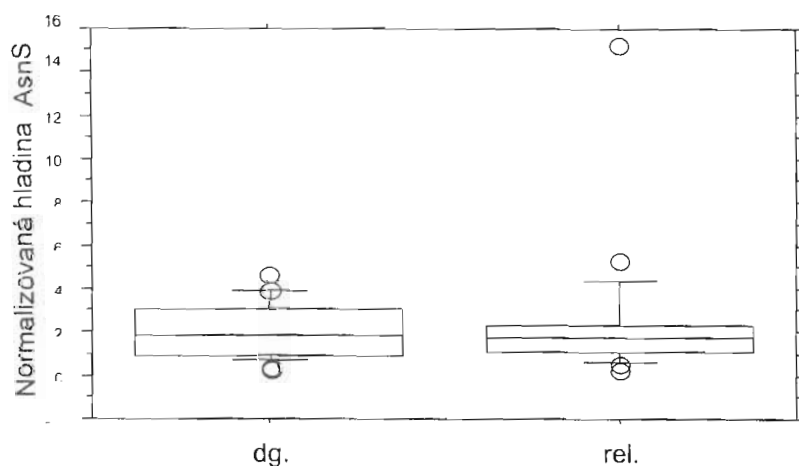
Přestože TEL/AML1 pozitivní pacienti mají obecně lepší prognózu, i u nich se mohou vyskytnout relapsy. My jsme sledovali AsnS_N v diagnostických vzorcích pacientů, kteří dlouhodobě přežívali v první kompletní remisi (CR1) (medián=0,823), a pacientů, kteří prodělali relaps (medián=0,261). Prokázali jsme mezi těmito dvěma skupinami signifikantní rozdíl (p=0,002), který by mohl sloužit jako dobrý prognostický znak (viz Obr. 4). U TEL/AML1 negativních pacientů jsme tento rozdíl v expresi mezi pacienty v dlouhodobé remisi a s relapsem nezaznamenali. Medián doby sledování ve skupině s relapsem byl 33,5 měsíce a ve skupině s CR1 62 měsíce.



Obrázek č.4 Predikce relapsu u TEL/AML1 pozitivních pacientů detekcí exprese genu pro AsnS

Porovnání exprese *AsnS* u diagnostických a relapsových vzorků pacientů s ALL

Při dalším studiu jsme sledovali vztah mezi expresí *AsnS* a mechanismem vzniku rezistentních buněk, ze kterých se může vyvinout relaps. Na základě předchozích prací jsme předpokládali, že vzorky rezistentní na L-Asp budou mít zvýšenou hladinu genu pro *AsnS*. Při testování hypotézy, že relapsový klon u dětí s ALL může vycházet z buněk rezistentních na L-Asp, jsme porovnávali expresi *AsnS_N* u skupiny dětí s ALL (n=23) při diagnóze onemocnění a při relapsu. Sledovali jsme 16 pacientů s B-prekurzorovou leukémií a 7 pacientů s T leukémií. Celkově jsme testovali 47 vzorků, přičemž jeden pacient měl 2 relapsy. Výsledky hypotézu o rezistenci relapsového klonu na L-Asp nepotvrdily. (Viz Obr.5)

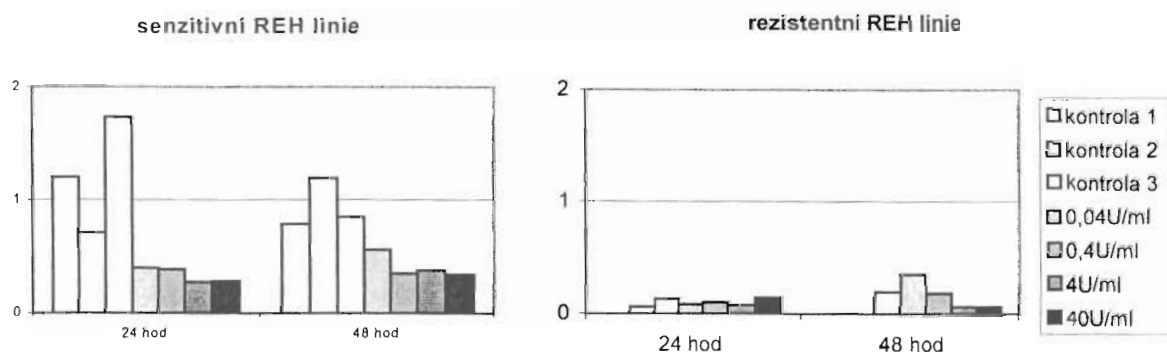


Obrázek č.5 Srovnání mezi hladinou exprese *AsnS_N* u diagnostických a relapsových vzorků pacientů s ALL

TEL/AML1 pozitivní linie rezistentní na L-Asp

V další části našeho projektu jsme sledovali změny exprese *AsnS* při rezistenci vyvolané *in vitro* u TEL/AML1 pozitivních buněk. Podařilo se nám selektovat klon buněk rezistentních na L-Asp. Vycházeli jsme z buněčné linie REH, která byla kontinuálně kultivována v přítomnosti L-Asp po 12 týdnů a růst buněk byl monitorován. Rezistence leukemických buněk byla potvrzena cytotoxickým MTT testem založeným na měření absorbance formasanu, který se tvoří jenom v živých buňkách. K detekci vlivu L-Asp na expresi fúzního genu

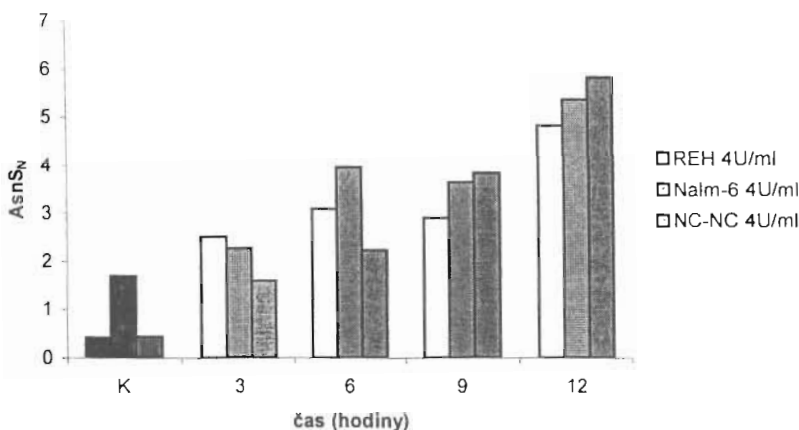
TEL/AML1 u rezistentních buněk REH jsme opět použili qRT-PCR. REH buňky senzitivní k cytostatiku a buňky rezistentní jsme kultivovali s L-Asp v koncentracích 0,04 U/ml; 0,4 U/ml; 4 U/ml a 40 U/ml po 24 a 48 hodin. TEL/AML1_N je signifikantně nižší u rezistentní skupiny buněk (medián=0,296) než u původní senzitivní buněčné linie (medián=0,841; p<0,0001) bez závislosti na koncentraci cytostatika v médiu. Detekovali jsme zvýšenou expresi AsnS_N u rezistentních buněk, což potvrzuje už dříve publikované výsledky. (Viz Obr.6)



Obrázek č.6 Snížená exprese genu TEL/AML1 u buněk rezistentních na L-Asp. Po podání L-Asp v jednotlivých koncentracích se hladina exprese TEL/AML1 dále nemění

Dynamika exprese AsnS v krátkodobém experimentu po podání L-Asp

Pro vyšetření účinku L-Asp na expresi genu pro AsnS jsme v *in vitro* podmínkách sledovali změny exprese genu AsnS u TEL/AML1 pozitivní buněčné linie (REH), TEL/AML1 negativní buněčné linie (Nalm-6) a normální lymfoblastoidní linie (NC-NC) kultivovaných bez (kontrolní skupina) nebo s L-Asp. Experiment byl navržen tak, aby poskytl detailnější pohled na dynamiku exprese genu pro AsnS v krátkodobém sledování po podání L-Asp. Bazální a indukovanou expresi AsnS jsme detekovali pomocí qRT-PCR v časových intervalech 3, 6, 9, 12 hodin bez/s L-Asp [4U/ml]. Výsledné hodnoty exprese AsnS byly závislé jen na bazální hladině, indukce po podání L-Asp byla shodná u všech linií. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že neexistuje přímý vztah mezi indukovanou expresí AsnS a zvýšenou citlivostí TEL/AML1 pozitivních buněk na L-Asp. (Viz Obr.7)

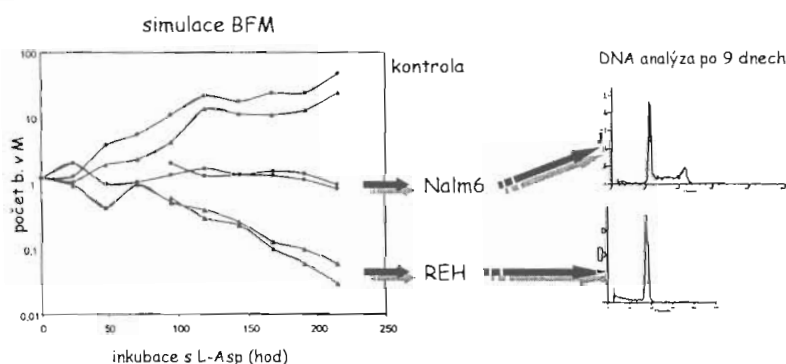


Obrázek č.7 Dynamika indukované exprese genu pro Asn_N v různých buněčných liniích po podání L-Asp

In vitro experiment simulující terapeutický protokol ALL-BFM 95

Dále jsme simulovali terapeutický protokol ALL-BFM 95 (Berlin-Franfurt-Münster) na leukemické linii REH (TEL/AML1 pozitivní) a Nalm-6 (TEL/AML1 negativní). Zajímal nás terapeutický efekt opakovaného podání L-Asp, který jsme hodnotili sledováním viability buněk, apoptózy a rozdělení buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu. Také jsme detekovali změny exprese genu pro AsnS. L-Asp je v indukční fázi protokolu BFM podávána každý třetí den. Pěstovali jsme buňky v médiu RPMI 1640 s L-Asp v koncentraci 4U/ml, vybrané podle sérové koncentrace naměřené ve farmakokinetické studii. Experimentální procedury musely být modifikovány, aby bylo možné porovnat navzájem buňky REH a Nalm-6. Nalm-6 buňky mají kratší čas dělení (36h) a rychlá spotřeba média nedovoluje dlouhotrvající kultivaci v neměnném médiu. Aby byl dosažen potřebný přísun živin, každé tři dny byly buňky přeneseny do čerstvého média s náležitou koncentrací L-Asp. Během první části experimentů (trvajících 9 dní), byly buňky vysazeny v koncentraci 0.3×10^5 buněk/ml a kultivovány v médiu s L-Asp. Kontrolní buňky byly pěstovány v médiu bez L-Asp. Paralelně byly kultivovány buňky s jednorázovým podáním (0h) a opakovaným podáním (0, 72, 144h) cytostatika. Po 9 dnech bylo 10^5 buněk přeneseno do čerstvého média RPMI 1640 bez L-Asp a kultivováno dalších 8 dní. Pak byly buňky sesbírány a pasážovány opět do čerstvého média bez L-Asp a pěstovány dalších 11 dní. Každých 24h byla sledována viabilita buněk, analyzován buněčný cyklus a připravena peleta buněk

na izolaci RNA. Růst buněk obou buněčných linií byl vysoce potlačen při jednorázovém a také opakovaném podání v porovnání s kontrolními buňkami, jejichž počet exponenciálně narůstal. Celkově byla inhibice buněčného růstu významnější u buněk REH. U buněk předkultivovaných v médiu s jednorázovým podáním L-Asp došlo k obnovení růstu po 19 dnech v médiu bez L-Asp u obou buněčných linií. REH buňky kultivované předtím s opakovanou dávkou L-Asp si však zachovaly zástavu růstu i po přenesení do média bez L-Asp. U buněk Nalm-6 nebyl naproti tomu zaznamenán žádný rozdíl v prolongaci inhibice růstu po pasáži buněk v médiu bez L-Asp. (Viz Obr. 8)

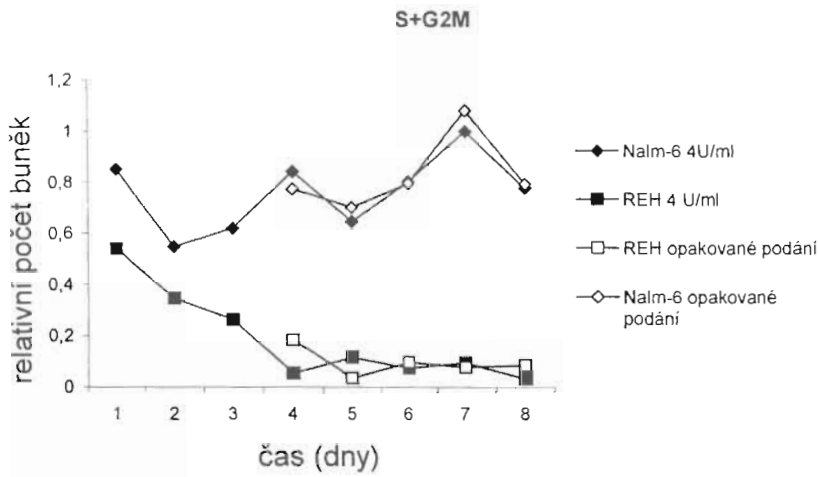


Obrázek č.8 Přežívání buněk TEL/AML1 pozitivních vs negativních po podání L-Asp jednorázově anebo opakovaně

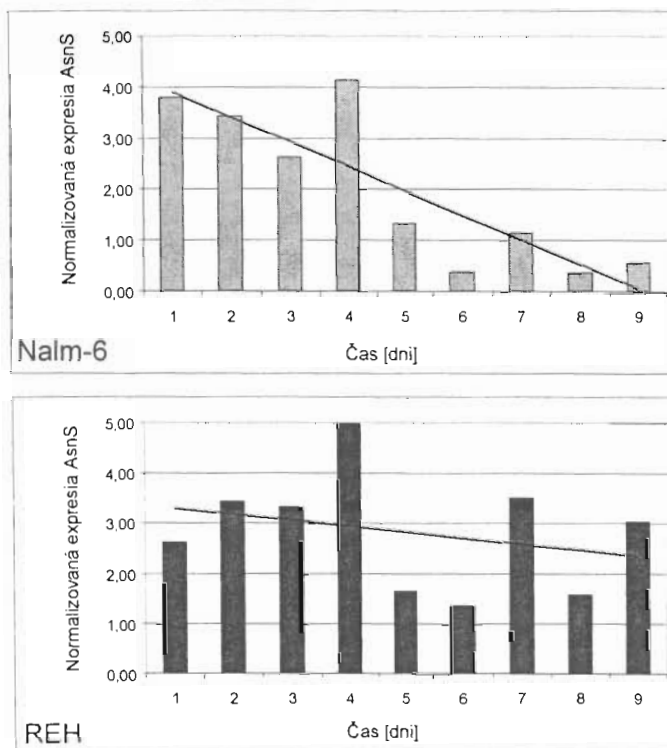
Následně jsme analyzovali buněčný cyklus, opět každých 24 hodin. Pozorovali jsme signifikantní rozdíl mezi buňkami REH a Nalm-6. Došlo k zástavě buněk REH v G1/G0 fázi. Procenta buněk v S a G2/M fázi po jednoduchém a opakovaném podání L-Asp jsou prezentována na obr.9. Většina REH buněk byla kumulována v G1/G0 fázi: 81-98% při jednorázovém podání, 91-98% při opakovaných dávkách. Růst Nalm-6 buněk byl po celou dobu experimentu neovlivněn podáním L-Asp. Průměrně, pouze 51-60% buněk při jednorázovém podání a 47-57% buněk při opakovaném podání jsme detekovali v G1/G0 fázi.

Sledovali jsme také vliv L-Asp na expresi genu pro AsnS. Po 24h inkubaci v médiu s L-Asp došlo k významnému zvýšení hladiny exprese genu pro AsnS u buněk REH i Nalm-6. Absolutní hladina exprese genu byla závislá na bazální hladině AsnS u jednotlivých buněčných linií. V dalších časových bodech byla dynamika AsnS_N rozdílná. U buněk Nalm-6 klesala až na hladinu shodnou

s hladinou exprese u kontrolní skupiny. U buněk REH si exprese AsnS udržela téměř shodnou hodnotu po celých 9 dní jejího sledování. (Viz Obr.10)



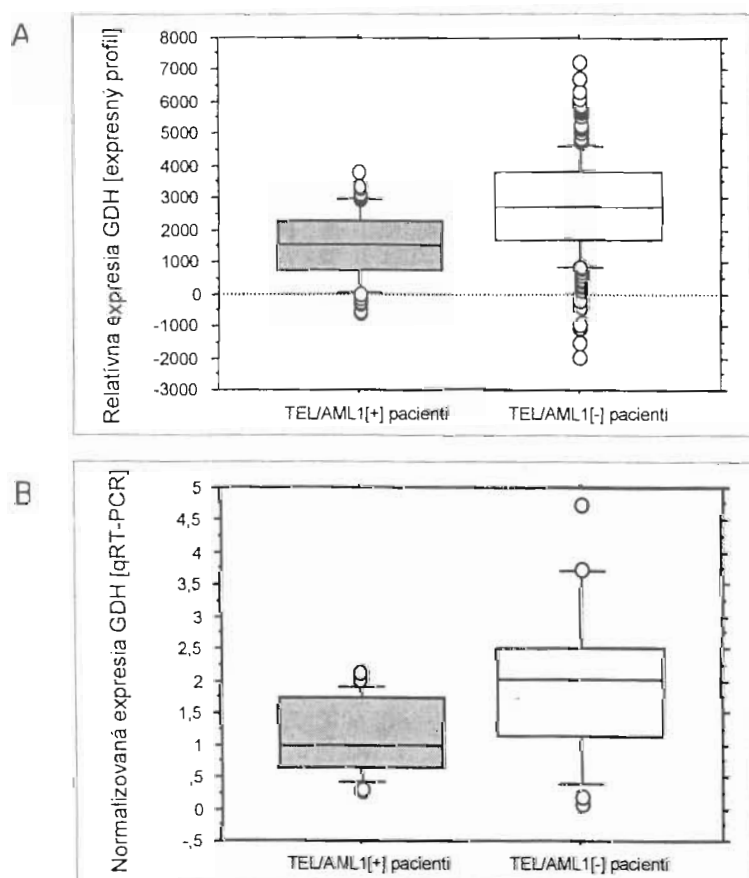
Obrázek č.9 Relativní počet buněk ve frakci S+G2/M buněčného cyklu detekovaných 8 dní po ovlivnění REH a Nalm-6 buněk L-Asp podána jednou anebo opakovaně



Obrázek č.10 Normalizovaná exprese genu pro AsnS detekovaná 9 dní po podání L-Asp u buněčné linie Nalm-6 a REH

Meta-analýza dat expresního profilování – role glutamát dehydrogenázy

Výše popsané výsledky naznačují, že v účinku L-Asp budou hrát úlohu také jiné proteiny přítomné v kaskádě syntézy asparaginu. Při meta-analýze expresních dat publikovaných Yeohem a kol. jsme identifikovali gen pro GDH, který byl rozdílně exprimován u TEL/AML1 pozitivních pacientů oproti ostatním pacientům s ALL. Tento jev jsme potvrdili pomocí qRT-PCR. Použili jsme diagnostické vzorky 22 TEL/AML1 pozitivních pacientů a 20 TEL/AML1 negativních pacientů, jednotlivé hodnoty GDH_N porovnali a rozdíl statisticky vyhodnotili. U TEL/AML1 pozitivních pacientů byla exprese GDH_N signifikantně nižší v porovnání s ostatními ALL pacienty ($p=0,013$). Jak známo, GDH nepřímo reguluje tvorbu glutaminu. AsnS je v eukaryotických buňkách glutamin-dependentní a proto předpokládáme, že změna hladiny exprese genu pro GDH v TEL/AML1 pozitivních buňkách bude mít vliv na citlivost buněk na L-Asp. (Viz Obr.11)



Obrázek č.11 Srovnání hladiny exprese genu pro GDH mezi TEL/AML1 pozitivními a negativními pacienty v datech expresního profilování podle Yeoh a kol. a výsledků qPCR našich pacientů

Metody II

Buněčné linie

Buněčná linie REH (TEL/AML1 pozitivní buňky, B-prekurzorová leukemická buněčná linie s translokací t(12;21)) byla získána od R.Pieterse (Erasmus Medical Center Rotterdam), Nalm-6 (TEL/PDGFRB; B-prekurzorová leukemická buněčná linie), byla zakoupená v DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Německo a Nalm-24 (BCR/ABL; B-prekurzorová leukemická bunková linie) byla zakoupená z Fujisaki Cell Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama. Buňky byly kultivovány v 6-jamkových destičkách 24 a 48 hodin s VPA o koncentraci 0,5mM a 1,0mM a s TSA o koncentraci 120nM a 240nM. Dávky VPA byly vybrány na základě optimální sérové koncentrace u neurologických pacientů (0,35-0,7mM). Podrobněji je metodika popsána v rukopisu zaslaném k publikaci (viz příloha 2).

Izolace buněk

Mononukleární buňky kostní dřeně a/nebo periferní krve byly izolované pomocí **Ficoll-Paque** (hustota 1,077g/ml, Pharmacia, Uppsala, Švédsko) denzitocentrifugace a uskladněny v -80°C na RNA extrakci.

Izolace RNA a přepis do cDNA

Celková RNA byla extrahována ze standardní koncentrace mononukleárů izolovaných z patientských vzorků nebo buněčných linií podle modifikované metody Chomczynski a Sacchi(150). Celková RNA byla rozpuštěna v odpovídajícím objemu podle výchozího množství buněk a konvertována na cDNA použitím MoMLV reverzní transkriptázy (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) podle návodu výrobce.

Průtoková cytometrie

Změny imunofenotypu buněk ovlivněných HDACi byly detekovány kombinací fluorescentních monoklonálních protilátek. Protilátky byly vybrány tak, aby pokryly jednotlivá stádia vývoje B buněk. Vybrané znaky byly měřeny multibarevnou kombinací: povrchové antigeny - CD10 FITC / CD20 PE / CD71 A1633 / DAPI; intracelulární antigeny - iTdT FITC / IgM PE / CD20 PC5 and

iRAG-1 A1633. Pro měření jsme použili průtokový cytometr BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a data byla analyzována pomocí softwaru FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA) a CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson; San Jose, CA, USA) byl použit pro analýzu DNA. Všechny jednotlivé kultivace a měření byly prováděny v nezávislých triplikátech.

Plazmidy

Plazmid pcDNA3.1-TEL/AML1Myc pro tranzientní TEL/AML1 model a pGZMB-luc pro luciferázovou esej byly poskytnuty A. Fordem (Institute of Cancer Research, LRF London). Kontrolní vektor pcDNA3.1-prázdný byl připraven restrikcí EcoRI a pGL3-basic a pRL-CMV byly získány od Promega, Madison, WI, USA.

Luciferázová esej

Luciferázová aktivita byla měřena luminometrem Microplate TLX2 použitím Dual-Luciferase® Reporter Assay systému (Promega, Madison, WI, USA). Data byla převedena na relativní luciferázovou aktivitu (RLU). V první řadě byl připraven tranzientní TEL/AML1 model a dále byly buňky transfekovány konstruktem pGZMB-luc, v kterém je před gen pro Luc vložena oblast promotoru granzymu B. Pro ověření přímého efektu HDACi na TEL/AML1 byl tento buněčný model kultivován s VPA (1mM) a TSA (240nM) a byla měřena změněná luciferázová aktivita. Podrobněji je luciferázová esej popsána v rukopisu zaslaném k publikaci (viz příloha 2).

qRT-PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálním čase byla prováděna na přístroji LightCycler™ (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Německo). Na kvantifikaci jednotlivých genů vybraných z analýzy dat expresního profilování jsme použili hydrolyzační sondy, pro detekci TdT a RAG-1 genu jsem použili fluorescenční DNA-vážící barvivo SYBRGreen. Normalizovaná exprese jednotlivých genů byla vypočtena jako jejich poměr k hladinám exprese genu $\beta 2m$.

Složení reakčního pufru, sekvence primerů a sond a teplotní podmínky jsou podrobně shrnuty v rukopisu zasláném k publikaci (viz příloha 2).

Měření genové exprese a analýza

Pro expresní profilování byly použity tzv. spotted cDNA microarrays obsahující 43000 sond, které reprezentují asi 30000 genů (Stanford Functional Genomics Facility, Stanford, CA, USA). Označili jsme vzorky RNA a referenční RNA rozdílnými fluorescenčními barvičkami (Cy5-dUTP a Cy3-dUTP, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany) a komparativně je hybridizovali na array.

Intenzity fluorescence Cy5 a Cy3 byly měřeny pomocí Genepix 4000 scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) a analyzovány pomocí GenePix Pro 4.1 softwaru (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Následná analýza a normalizace dat byla provedena na základě předchozích prací (151,152).

Statistická analýza

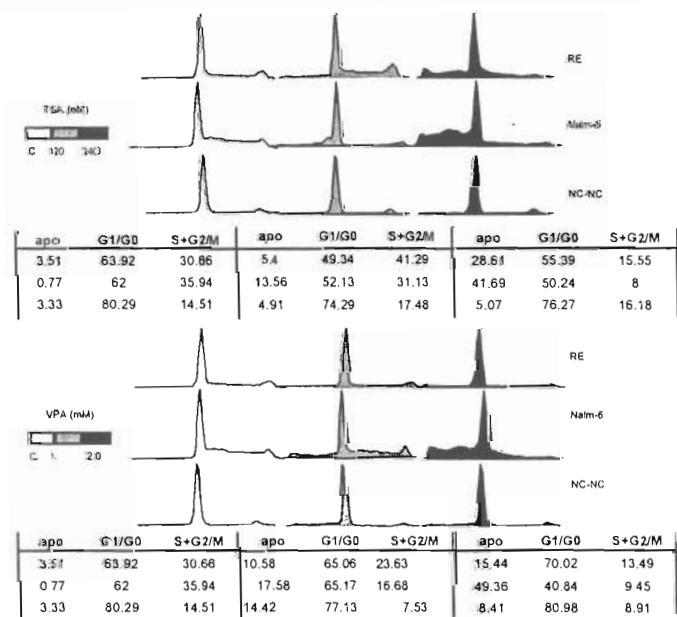
Pro analýzu dat vzorků buněčné linie REH ovlivněných HDACi v supervizované analýze jsme použili Significance Analysis of Microarrays (SAM)(153). Signifikantně rozdílnou expresi genů jsme zjišťovali permutačním testem s ohledem na FDR (false discover rate) 5% a „fold change“ >2.

Rekalkulace dat expresního profilování pacientů s ALL byla prováděna z dat publikovaných Fine a kol.(151,152), která jsou přístupná ve Stanford Microarray Database (<http://genome-www.stanford.edu/microarray>) jak již bylo dříve popsáno(154). Změny mezi genotypickými podskupinami byly vypočteny z dat pacientů s BCP-ALL. V zájmu názorného srovnání prediktivní hodnoty genů korelujících s genotypem určeným různými metodami byla stanovena optimální hraniční hodnota (cut-off) pro daný gen (gen může být na čipu reprezentován více než jedním oligonukleotidem, tzv. probe set) za použití statistického softwaru R (<http://www.r-project.org>). Pro každý „probe set“ byla vypočítána hraniční hodnota na základě nejdelší vzdálenosti od diagonály. Na základě této hodnoty byla identifikována skupina genů, která nejlépe oddělila dvě srovnávané skupiny pacientů(154).

Výsledky II

Vliv HDACi na proliferaci a apoptózu leukemických buněk

Studovali jsme průběh buněčného cyklu – proliferační aktivitu a apoptózu buněk po podání HDACi. Apoptózu jsme hodnotili jako poměr mezi buňkami ovlivněnými a neovlivněnými HDACi. U TEL/AML1 pozitivní buněčné linie REH byl podíl mrtvých buněk 8% po podání 1mM VPA a 26% po podání 240nM TSA v porovnání s 3,7% a 1,7% v kontrolních lymfocytech (buněčná linie NC-NC). Podobně tomu bylo u buněčné linie Nalm-6 (TEL/AML1 negativní) - 17% s VPA a 41% s TSA. Buňky Nalm-6 redukovaly svoji proliferační aktivitu (S+G2/M) o 19% (VPA), 28% (TSA) a REH buňky o 7% (VPA), resp.15% (TSA). Tato analýza prokázala, že u TEL/AML1 pozitivní linie po podání TSA buňky přecházejí do apoptózy a po podání VPA dochází na rozdíl od TEL/AML1 negativních buněk ke kumulaci buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu. U NC-NC buněk jsme na rozdíl od ostatních nezaznamenali žádný výrazný posun v buněčném cyklu.



Obrázek č. 12 Histogramy zobrazující jednotlivé fáze buněčného cyklu buněk REH, Nalm-6 a NC-NC po podání VPA a TSA. Tabulky s procenty buněk v jednotlivých frakcích buněčného cyklu

Detekce diferenciačního posunu

Pro monitorování diferenciace byly vybrány tři leukemické linie se známými fúzními geny: REH (TEL/AML1), Nalm-24 (BCR/ABL) a Nalm-6 (TEL/PDGFRB). TEL/AML1 pozitivní buňky přešly po podání HDACi do vyššího vývojového stádia na rozdíl od TEL/AML1 negativních leukemických buněk. V prvním kroku byly detekovány znaky CD10, CD20 a CD19 ve dvou časových bodech – 24 a 48 hodin po podání HDACi (VPA, TSA). Výsledky byly prezentovány jako průměr intenzity fluorescence, což umožnilo sledovat posun v diferenciačním vzorci. Původní expresní vzorec REH buněk je CD10⁺⁺/CD20⁻/CD19⁺. Po kultivaci s HDACi se hyperexprese CD10 (CD10⁺⁺) snížila na CD10⁺, CD20 negativita se změnila na slabou pozitivitu (CD20^{dim}/+) a hladina CD19 se snížila, ale zůstala pozitivní. Původní Nalm-24 buňky exprimují CD10⁺/CD20⁺/CD19⁺. Po kultivaci došlo ke snížení exprese všech sledovaných znaků, což je možné vysvětlit přechodem buněk do apoptózy. Původní Nalm-6 buňky mají expresní vzorec CD10⁺⁺/CD20⁻/CD19⁺. Exprese CD10 byla dysregulována v závislosti na dávce a typu HDACi. Povrchový antigen CD20 si zachoval iniciální negativitu. Ačkoliv buňky Nalm-24 a Nalm-6 neprocházejí diferenciačním posunem, buněčná linie REH exprimuje CD10, CD20 ve směru zralejších lymfoidních buněk. Pro důkaz vyžívání buněk REH jsme použili ještě další znaky B buněčné diferenciace, TdT a RAG-1. Po podání HDACi došlo u REH ke snížení exprese TdT o více než polovinu, u buněk Nalm-24 snížení tak evidentní nebylo. Exprese RAG-1 byla paralelní s TdT. Nižší dávky (0,5mM VPA, 120nM TSA) VPA a TSA byly méně efektivní avšak změny si zachovaly shodný trend.

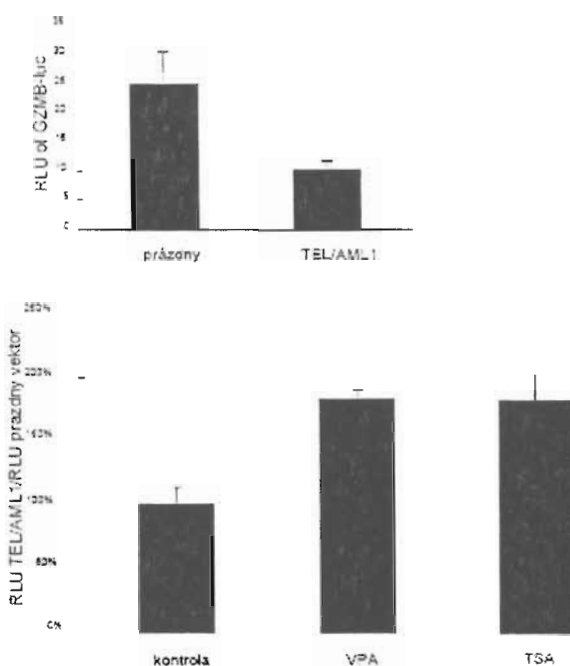
Snížení exprese RAG-1 a TdT bylo potvrzeno také na úrovni mRNA pomocí qRT-PCR. Množství transkriptu genu RAG-1 a TdT bylo normalizováno k expresi housekeeping genu, β 2-mikroglobulinu. Byla porovnána normalizovaná exprese ovlivněných a neovlivněných vzorků. Hladina mRNA genu RAG-1 rapidně poklesla (více než 3x) už po 24 hodin z iniciální hladiny $3,30 \pm 0,321$ na $1,004 \pm 0,053$ po podání VPA ($p=0.0002$) a $0,197 \pm 0,046$ po TSA ($p<0.0001$). Podobně tomu bylo i u genu TdT, jehož mRNA po 24 hodin poklesla z iniciální hladiny $1,767 \pm 0,178$ na $0,888 \pm 0,110$ po VPA ($p=0,01$) a $0,072 \pm 0,020$ po TSA ($p=0,0001$) (tabulka č.3).

buňky	čas	HDACi	antigeny				
			CD10	CD20	CD19	TdT	RAG1
REH	24 hod	Kont.	1,00±0,03	1,00±0,10	1,00±0,02	1,00±0,02	1,00±0,13
		VPA	0,76±0,07	1,47±0,1	0,77±0,04	0,43±0,09	0,7±0,06
		TSA	0,6±0,04	2,18±0,46	0,6±0,01	0,45±0,05	0,83±0,16
	48 hod	Kont.	1,00±0,02	1,00±0,05	1,00±0,02	1,00±0,01	1,00±0,00
		VPA	0,88±0,02	0,98±0,03	0,84±0,05	0,44±0,05	0,57±0,02
		TSA	0,63±0,09	0,85±0,04	0,28±0,02	0,25±0,08	0,38±0,02
Nalm-24	24 hod	Kont.	1,00±0,02	1,00±0,03	1,00±0,02	1,00±0,11	
		VPA	0,79±0,01	1,12±0,11	0,8±0,04	0,75±0,07	
		TSA	0,62±0,01	0,69±0,02	0,7±0,01	0,57±0,06	
	48 hod	Kont.	1,00±0,12	1,00±0,07	1,00±0,02	1,00±0,14	
		VPA	0,70±0,03	0,52±0,02	0,69±0,00	0,72±0,04	
		TSA	0,56±0,03	0,43±0,17	0,44±0,02	0,28±0,02	

Tabulka č.3 Změny exprese přepočtené k expresi kontrolních neovlivněných buněk (Kont.) jednotlivých diferenciačních znaků B-buněk v liniích REH a Nalm-24 po podání VPA nebo TSA

Funkční důkaz regulace aberantním transkripčním faktorem TEL/AML1

Transkripce granzymu B (GZMB) je regulována proteinem AML1(60). Abychom prokázali represní aktivitu TEL/AML1, použili jsme luciferázový konstrukt se zaklonovanou promotorovou oblastí GZMB s přítomností AML1 vazebného místa. Luciferázová aktivita byla měřena v HeLa buňkách transfekovaných pcDNA3.1-TEL/AML1Myc a porovnána s buňkami HeLa transfekovanými prázdným vektorem pcDNA3.1. Myší fragment promotoru GZMB (bp -324 až -43) obsahuje dvě AML1-vazebné místa (-278 až -273, -219 až -214). V této části promotoru existuje mezi myší a člověkem 84% sekvenční homologie. Všechny buňky byly transfekovány vektorem pGZMB-luc nebo pGL3-basic pro normalizaci luciferázové aktivity. Změna o 3 RLU (relativní luciferázová jednotka) v TEL/AML1 pozitivních vs kontrolních buňkách (prázdný vektor) naznačuje, že exprese GZMB je skutečně negativně regulována proteinem TEL/AML1. 24-hodinová kultivace s HDACi tento expresní blok uvolnila. Hodnoty byly propočítány jako RLU TEL/AML1 buněk / RLU kontrolních buněk. Poměr luciferázové aktivity neovlivněných buněk byl 0,436±0,13 a ovlivněných buněk 0,796±0,07 (VPA) a 0,789±0,21 (TSA). (Viz Obr.13)



Obrázek č.13 Funkční důkaz regulace exprese Granzymu B transkripčním faktorem TEL/AML1 a zvrácení tohoto efektu použitím HDACi

Strategie analýzy expresních dat pro identifikaci cílových genů

Pro identifikaci cílových genů (TEL)/AML1 v B lymfoidních buňkách jsme využili přímý efekt HDACi na TEL/AML1 pozitivní leukemické buňky. Hierarchická klastrovací analýza expresních profilů ovlivněných vs neovlivněných buněk REH ukázala, že tři skupiny vzorků (VPA-ovlivněné, TSA-ovlivněné a neovlivněné) jsou dobře oddělitelné. Zajímavé je, že VPA-ovlivněné buňky jsou klastrovány blíže ke kontrolním buňkám než TSA-ovlivněná skupina. Možné vysvětlení je, že VPA je méně toxické a více specifické, jak už jsme zmiňovali výše. V prvním kroku jsme identifikovali geny, které jsou odlišně exprimovány u TEL/AML1 pozitivních leukémií v porovnání s ostatními podtypy. Vypočítali jsme tzv. cut-off exprese všech genů, který spolehlivě oddělí TEL/AML1 pozitivní diagnostické leukemické vzorky od ostatních genotypicky definovaných podskupin ALL (BCR/ABL a MLL/F4). Na základě těchto propočtů jsme vybrali geny, které nás zajímaly, a to geny, které byly u TEL/AML1 pozitivních pacientů „downregulovány“. V dalším kroku jsme definovali tzv. „closeness“ („blížkost“) analyzovaných genů. „Blíže“ geny měli podobnou expresi u buněk REH a vzorků TEL/AML1 pozitivních pacientů. „Vzdálenější“ geny měli rozdílnou expresi v buňkách REH, resp.

vzorcích TEL/AML1 pozitivních pacientů ve srovnání s BCR/ABL a MLL/AF4 pacienty. Geny, které splnily tato pravidla, byly dále protnuty skupinou genů se významně změněnou expresí po podání VPA. Závěrem jsem vybrali 24 genů, které jsou zobrazeny v tabulce 4.

NAME	t _{tx}	t _{vy}	closeness	median C	median VPA	VPA-C	p(VPA/C)
BSPRY	9,09	92,86	0,60	-0,82	0,41	1,23	0,0074
ACK1	27,27	100,00	0,20	-0,79	0,25	1,04	0,0054
ANTXR2	10,00	81,25	0,32	-0,25	1,33	1,56	0,0140
ITM2C	0,00	69,75	0,57	-1,50	0,52	2,02	0,0141
CXXC5	16,19	81,25	0,12	-0,02	0,96	0,96	0,0063
AH1	9,09	71,43	0,13	-0,20	0,72	0,92	0,0057
ARD1	9,09	69,75	0,30	-0,49	0,25	0,74	0,0114
PAK1	0,00	56,25	0,36	-0,28	1,06	1,34	0,0012
NID67	16,19	73,33	0,49	-1,06	1,26	2,32	0,0019
PDGFRB	0,00	53,33	0,05	-0,81	1,58	2,39	0,0112
RNF144	10,00	62,50	0,06	-0,03	0,54	0,57	0,0079
FLJ00012	20,00	69,75	0,62	-1,32	0,62	1,94	0,0024
C14orf101	45,45	93,75	0,22	-0,60	0,01	0,61	0,0103
Similar to peptidylprolyl isomerase A (LOC402673)	54,55	100,00	0,10	-0,32	0,45	0,77	0,0017
AI302216	16,19	62,50	0,16	-0,24	0,49	0,67	0,0117
AA252394	50,00	93,33	0,24	-0,24	0,49	0,73	0,0054
CDNA FLJ10641 fis, clone NT2RP2005748	22,22	64,29	0,32	-0,42	0,65	1,07	0,0104
N24645	9,09	50,00	0,06	-0,26	0,47	0,73	0,0125
WDR7	45,45	84,62	0,43	-0,91	-0,16	0,75	0,0150
CDNA FLJ45905 fis, clone OCBBF3026576	45,45	84,62	0,06	-0,31	0,61	0,92	0,0103
HRMT1L1	36,36	75,00	0,47	-0,34	0,34	0,68	0,0032
TNFRSF5	20,00	53,33	0,28	-0,05	0,32	0,37	0,0079
MGMT	0,00	33,33	0,12	-0,36	0,70	1,06	0,0123
ATRX	45,45	73,33	0,08	-0,20	0,38	0,58	0,0022

Tabulka č.4 t_{tx} – cut-off pro jednotlivé geny u TEL/AML1 pozitivních pacientů; t_{vy} – cut-off pro jednotlivé geny u TEL/AML1 negativních pacientů (BCR/ABL, MLL/AF4); "closeness" je shoda genové exprese mezi TEL/AML1 pozitivními pacienty a TEL/AML1 pozitivními liniemi REH (podrobněji v textu); medián C je medián exprese genu u neovlivněných TEL/AML1 pozitivních buněk; medián VPA je medián exprese genu u ovlivněných TEL/AML1 pozitivních buněk; VPA-C je rozdíl mezi expresí genu u ovlivněných a neovlivněných TEL/AML1 pozitivních buněk; p(VPA/C) je hodnota změny vyjádřená na základě statistické významnosti

Expresní profilování vs qRT-PCR

Změněnou expresí čtyř vybraných genů jsme potvrdili pomocí qRT-PCR, tři z nich byli „downregulované“ a jeden „upregulován“ u TEL/AML1 pozitivních leukémií. První dva, ACK1 (alias TNK2, activated p21cdc42Hs kinase) a PDGFRB (platelet derived growth factor receptor β) byly vybrány z tabulky 24 genů, které nejlépe splňovaly výše popsaná kritéria. Navíc byla jejich rozdílná exprese u TEL/AML1 pozitivních a TEL/AML1 negativních pacientů potvrzena srovnáním s ostatními veřejně přístupnými daty expresních profilů publikovanými

Yeohem a kol. a Rossovou a kol. zveřejněnými na stránkách <http://www.stjudereseearch.org/ALL1>

[http://www.stjudereseearch.org/ALL3\(155,156\)](http://www.stjudereseearch.org/ALL3(155,156)).

Gen JunD (jun D proto-onkogen) byl vybrán z rozsáhlejší skupiny 70 genů splňujících kritéria a gen TCF4 (transcription factor 4) byl vybrán jako příklad „upregulovaného“ genu u TEL/AML1 pozitivních leukémií – tedy jakoby regulovaný opačným mechanismem. Expresse genů ACK1, JunD a PDGFRB byla u pacientů snížena a po podání VPA došlo k nárůstu její hladiny. Gen TCF4 měl expresi zvýšenou a po podání VPA došlo k jejímu poklesu. Potvrdili jsme změny hladiny exprese pomocí qRT-PCR mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami: JunD – TSA $p=0,013$, VPA $p=0,0008$; ACK1 – VPA $p=0,07$, TSA $p=0,5$; PDGFRB – TSA $p< 0,0001$, VPA $p=0,016$; TCF4 – TSA $p< 0,0001$, VPA $p=0,0002$ (tabulka č.5).

	<i>Kontrola exprese genu/β2M</i>	<i>VPA exprese genu/β2M</i>	<i>p</i>	<i>TSA exprese genu/β2M</i>	<i>p</i>
ACK1	0,08±0,02	0,19±0,03	0,07	0,16±0,04	0,5
PDGFRB	0,032±0,002	0,042±0,003	0,016	0,013±0,002	<0,0001
JunD	0,085±0,01	0,691±0,2	0,0008	0,510±0,1	0,01
TCF4	12,97±1,2	2,09±0,194	0,0002	1,03±0,118	<0,0001

Tabulka č.5: Potvrzení analýzy expresního profilování pomocí qRT-PCR u čtyř vybraných genů

Závěry a diskuse I

Pacienti s ALL s fúzním genem TEL/AML1 mají dobrou prognózu, ale relapsy se vyskytují stále u cca 17% dětí. Z mnohých studií vyplývá, že L-Asp sehrává v terapii dětské TEL/AML1 pozitivní ALL klíčovou roli. Dosavadní studie poukazují na významné rozdíly v úspěšnosti léčby způsobené odlišnými dávkami L-Asp používanými v porovnávaných léčebných protokolech. V tomto projektu jsme studovali vztah fúzního genu TEL/AML1 a vyšší citlivosti na L-Asp. Na základě pochopení tohoto mechanismu předpokládáme, že by bylo možné přistoupit k stratifikaci léčebného protokolu podle genotypově definovaných skupin, případně k výpočtu dávek L-Asp "na míru" pro jednotlivé pacienty nebo podskupiny pacientů.

Naše výsledky nepotvrdily vztah mezi sníženou aktivitou AsnS a vyšší citlivostí na L-Asp. Na základě sledování dynamiky exprese AsnS v různých buněčných liniích předpokládáme, že neexistuje přímý vztah mezi indukovanou expresí AsnS a zvýšenou citlivostí TEL/AML1 pozitivních buněk na L-Asp. V *in vitro* experimentech, kdy jsme porovnávali účinek L-Asp v TEL/AML1 pozitivních buňkách a TEL/AML1 negativních buňkách a simulovali léčebný protokol ALL-BFM 95, jsme prokázali prodloužený efekt L-Asp při opakovaném podání (celkem třikrát, každý 3.den) a to pouze u TEL/AML1 pozitivních buněk. TEL/AML1 pozitivní buňky byly po celou dobu experimentu zastaveny v G1/G0 fázi buněčného cyklu a hladina exprese AsnS byla zvýšena celých 9 dní experimentu. Naproti tomu, buňky TEL/AML1 negativní byly schopny přechodu do S fáze buněčného cyklu a hladina exprese AsnS se postupně vyrovnala bazálním hladinám. Z těchto pozorování vyplývá, že nutriční stres způsobený deplecí asparaginu a glutaminu nejsou TEL/AML1 pozitivní buňky schopny obejít, zatímco TEL/AML1 negativní buňky ano. Na základě analýzy dat expresního profilování předpokládáme, že za citlivost buněk na L-Asp budou zodpovědné i jiné proteiny v kaskádě syntézy asparaginu a glutaminu. GDH, u které jsme prokázali signifikantně nižší hladinu exprese u TEL/AML1 pozitivních vs TEL/AML1 negativních pacientů, je protein, který je důležitý pro syntézu glutaminu v buňkách a glutamin je zase nepostradatelný pro aktivitu AsnS. GDH je enzymem oxidační deaminace, při které se uvolňuje amoniak a následně je využíván glutamin

syntetázou. Předpokládáme, že právě nedostatečná funkce GDH (způsobená nízkou expresí) vede v konečném důsledku k nedostatečné tvorbě glutaminu v buňce a tento nedostatek zvyšuje expresi AsnS. Možnost buněčného metabolismu reagovat na omezení zevního přísunu asparaginu a glutaminu po podání L-Asp je tak oslabena. Tyto výsledky odhalily efekt regulačních mechanismů buněčného metabolismu asparaginu a glutaminu v leukemických buňkách. Potvrdili jsme také experimentálně empirickou zkušenost, která vedla k opakovanému podávání L-Asp v léčebných protokolech dětských ALL.

Závěry a diskuse II

Přítomnost fúzního genu TEL/AML1 u pacientů s ALL má zřejmý vliv na klinické projevy onemocnění, pokud se týká odpovědi na léčbu a krátkodobou prognózu. Z toho předpokládáme, že tento chimerický gen bude sehrávat v leukemogenezi pozitivních lymfoidních buněk důležitou úlohu. Z některých studií vyplývá jeho role jako dominantně negativního faktoru. Také se předpokládá, že v lymfoidních buňkách způsobuje patologický diferenciacní blok, jehož následkem buňky nedozrávají a jsou schopné neregulované proliferace. Jako nejpravděpodobnější mechanismus funkce TEL/AML1 se jeví vazba s komplexem, který obsahuje HDAC a způsobuje tak změnu chromatinového vzorce v promotorové oblasti genů s AML1-vazebným místem. Kultivovali jsme leukemické buňky s HDACi (VPA, TSA), které jsou schopné blokovat enzymatickou aktivitu HDAC. V první části jsme potvrdili částečný posun v diferenciaci TEL/AML1 pozitivních leukemických buněk v porovnání s leukemickými buňkami s odlišným mechanismem leukemogeneze (BCR/ABL, TEL/PDGFR). Analýzou buněčného cyklu jsme ukázali méně toxický a více specifický efekt VPA oproti TSA u TEL/AML1 pozitivních buněk. Pomocí luciferázové eseje jsme funkčně prokázali regulaci genu pro granzym B proteinem TEL/AML1. Tento represní účinek jsme odstranili využitím HDACi a následně jsme tento přístup využili pro identifikaci dalších cílových genů proteinu (TEL/AML1). Komplexní analýzou dat expresního profilování pacientů s ALL a ovlivněných (VPA nebo TSA) vs neovlivněných buněk REH jsme vybrali 24 geny, které jsou u buněk TEL/AML1 pozitivního fenotypu „downregulované“ a po podání VPA

dochází ke zvýšení jejich expresní hladiny. U čtyř vybraných genů z této analýzy jsme porovnali data z expresního profilování s kvantifikací exprese pomocí qRT-PCR. Tyto výsledky potvrdily správnost naší *in silico* analýzy. Vybrané geny jsou důležitou součástí kaskád zodpovědných za buněčnou proliferaci a průchod buněčným cyklem a proto předpokládáme také jejich úlohu v leukemogenezi.

HDAC jsou v současnosti jedním ze slibných cílů ve vývoji cílených léčiv pro nádorovou terapii a HDACi první generace již jsou v I/II fázi klinického testování(157). Předpokládáme, že HDACi by mohly být potenciálně použity u molekulárních relapsů nebo u TEL/AML1 pozitivních pacientů s minimální reziduální nemocí v pozdní fázi terapie. Dávky VPA testované v naší studii odpovídají sérovým koncentracím u pacientů léčených pro epilepsii. Užívání tohoto léku v humánní medicíně předurčuje VPA pro testování u TEL/AML1 pozitivních pacientů s vysokým rizikem.

Příloha 1:

Krejčí O¹, Starková J¹, Otová B, Madžo J, Kalinová M, Hrušák O, Trka J. (2004)
*Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-Asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. **Leukemia** Mar;18(3):434-41,*

¹oba jsou prvními autory

Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells

O Krejci^{1,2,5}, J Starkova^{1,2,5}, B Otova³, J Madzo^{1,2}, M Kalinova^{1,2}, O Hrusak^{1,4} and J Trka^{1,2}

¹CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague, Prague, Czech Republic; ²2nd Department of Paediatrics, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic; ³Institute of Biology and Department of Medical Genetics, Charles University 1st Medical School, Prague, Czech Republic; and ⁴Institute of Immunology, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic

L-Asparaginase is a standard component in chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Leukaemic cells carrying TEL/AML1 fusion gene are more sensitive to treatment with L-asparaginase compared to other subtypes of ALL. We demonstrate *in vitro* the prolonged growth suppression of TEL/AML1[+] cells compared to TEL/AML1[-] leukaemic cells after L-asparaginase treatment simulating treatment protocol. Cell cycle analysis revealed TEL/AML1[+] cells to accumulate in G1/G0 phase (81–98%) compared to TEL/AML1[-] cells (47–60%). Quantitative analysis of asparagine synthetase (AsnS) expression showed the ability of TEL/AML1[+] cells to increase AsnS mRNA levels after L-asparaginase treatment to the same extent as TEL/AML1[-] leukaemic and nonleukaemic lymphoid cells. We hypothesise that TEL/AML1[+] cells are unable to progress into the S phase of cell cycle under nutrition stress caused by L-asparaginase, despite the ability of AsnS upregulation. Significantly higher expression of AsnS was found in untreated leukaemic cells from children with TEL/AML1[+] ALL ($n=20$) in comparison with the group of age-matched children with ALL bearing no known fusion gene ($n=25$; $P=0.0043$). Interestingly, none of the TEL/AML1[+] patients with high AsnS level relapsed, whereas 10/15 patients with AsnS below median relapsed ($P=0.00028$). Therefore, high AsnS levels in TEL/AML1[+] patients correlate with better prognosis, possibly reflecting the stretched metabolic demand of the lymphoblast.

Leukemia (2004) 18, 434–441. doi:10.1038/sj.leu.2403259

Published online 15 January 2004

Keywords: asparaginase; asparagine synthetase; cell cycle; leukaemia; TEL/AML1

Introduction

In 1967, Oettingen *et al*¹ have shown a potent effect of L-asparaginase against leukaemia and lymphoma in man. At present, L-asparaginase is a standard component in the therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). When used alone, it causes complete remission in 40–60% of paediatric ALL cases.^{2–4} Besides the well-recognised effect of L-asparaginase in paediatric ALL, some authors now propose a benefit of L-asparaginase treatment also for patients with acute myeloid leukaemia (AML), particularly for the most sensitive AML type FAB M5.^{5–7}

The presumptive effect of L-asparaginase is based on decreased activity of asparagine synthetase (AsnS) in leukaemic cells.⁸ AsnS was described to be one of the genes related to

entering S phase of the cell cycle.⁹ Temperature-sensitive AsnS mutants were shown to be blocked in G₁ phase and to accumulate AsnS mRNA when incubated at nonpermissive temperature. This block could be bypassed by adding asparagine, the end product of AsnS-mediated enzymatic reaction.¹⁰ Addition of asparagine led to a dramatic decrease in AsnS mRNA levels and reverted accumulation in G₁ phase, thus indicating the end-product regulation of AsnS expression.¹⁰ Two different regulatory pathways converge in this regulation: unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress response.^{11–14} The expression of AsnS gene can be induced in response to both carbohydrate limitation and deprivation of various amino acids.^{11,13} *In vitro* experiments documented increased AsnS expression in treatment-resistant leukaemic cells.¹⁵ Concerted increase in AsnS mRNA, protein and enzymatic activity after amino-acid deprivation suggests transcriptional control of the AsnS.¹²

Several studies of sensitivity to L-asparaginase carried on patients' leukaemic cells published so far were based on the enzyme activity or the survival of the leukaemic cells during *in vitro* drug-resistance tests. The work carried by Ramakers-van Woerden *et al* identifies TEL/AML1[+] ALL (besides a more heterogeneous group of hyperdiploid patients) to be a genotypically defined subgroup with a higher sensitivity to L-asparaginase.¹⁶ TEL/AML1 fusion results from t(12;21)(p13;q22) that brings together the N repression domain of translocation-ets-leukaemia (TEL) transcription repressor and the N-terminus of acute-myeloid-leukaemia-1 (AML1) transcription factor.^{17,18} The fusion of the TEL repression domain to AML1 converts AML1 to an unregulated transcriptional repressor forming a more stable complex with mSin3 corepressor.¹⁹ Other co-repressors, N-Cor and SMRT, bind to the TEL/AML1 fusion protein together with histone deacetylase 3.^{17,20} The TEL/AML1 fusion is the most common genetic abnormality found in paediatric ALL, present in up to 25% cases.²¹ It is considered to be associated with a good prognosis, particularly in the protocols with intensive L-asparaginase treatment.^{22,23} Despite the excellent short-time event-free survival reported in this group of patients, relapses can occur.²² We and others recently described higher levels of AsnS mRNA in TEL/AML1[+] patients compared to the TEL/AML1[-] group (Krejci O *et al*, The Hematology Journal 2001, 1(1), 696 abstract).²⁴

We have studied cell proliferation and cell cycle of TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] cells under *in vitro* simulated therapeutic conditions. In contrast to the current hypothesis, our data indicate that leukaemic cells are able to upregulate AsnS gene expression under nutrient stress caused by L-asparaginase. Surprisingly, TEL/AML1[+] but not TEL/AML1[-] cells do not proceed into the S phase of the cell cycle when treated with L-asparaginase. Quantitative analysis of AsnS mRNA levels in diagnostic samples not only distinguishes between TEL/

Correspondence: Dr O Krejci, 2nd Department of Paediatrics, 2nd Medical School, Charles University Prague, V uvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic; Fax: +420-2-24432268; E-mail: ondrej.krejci@lfmotel.cuni.cz

⁵Both authors contributed equally to this work

Received 23 July 2003; accepted 20 November 2003; Published online 15 January 2004

AML1+] and TEL/AML1[-] leukaemias, but also identifies a group of TEL/AML1[+] patients with high risk of relapse. This work is the first to present a detailed study of AsnS gene expression dynamics and kinetics under the treatment with L-asparaginase with respect to TEL/AML1-positivity.

Materials and methods

Patients

A total of 20 TEL/AML1[+] patients aged 2–6 years, together with the age-matched group consisting of 23 B-cell precursor AML patients without any of TEL/AML1, BCR/ABL or MLL/AF4 fusion genes, were chosen for the analysis solely on the basis of the presentation bone marrow (BM) sample availability. For analyses regarding the risk of relapse, additional 10 TEL/AML1[+] and 17 B-cell precursor TEL/AML1[-] patients with subsequent relapse were appended. A total of 26 paediatric AML patients were also analysed.

Diagnosis as well as French–American–British (FAB) classification was made according to standard criteria. All samples were obtained with the informed consent of the children's parents or guardians. Immunophenotype and DNA ploidy was determined using a FACS-Calibur flow cytometer, as described elsewhere.²⁵ The presence of TEL/AML1, BCR/ABL and MLL/AF4 fusion genes was detected by two-round nested PCR, as described previously.^{25–27} The ALL patients were treated according to ALL BFM 90/95 protocols, the AML patients were treated according to AML BFM 93/98 protocols in one of the Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH) centres. All samples were transported to our institution and processed within 30 h after aspiration. The peripheral blood (PB, $n = 30$) of healthy volunteers as well as nonleukaemic BM ($n = 2$) samples were tested as controls.

Cell lines

REH (TEL/AML1[+] cells, B cell precursor leukaemia cell line with translocation (12;21)) was kindly provided by R. Pieters (University Hospital Rotterdam). Nalm-6 (TEL/AML1[-] cells - B-precursor leukaemia cell line without any identified translocation) and NC-NC (normal lymphoblastoid cells immortalised by Epstein-Barr virus) were purchased from the DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. Cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with 2 mM L-glutamine, 10% of fetal calf serum (FCS) and 100 U/ml antibiotic solution (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). All suspension cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂. Cells were collected by centrifugation for 10 min at 240 g and resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml in fresh medium 24 h before all experiments. For studying dynamics and AsnS gene expression, cells were cultured with L-asparaginase (Kidrolase, Rhone-Poulenc, Belgium, France) at concentrations 0.4 or 4 U/ml. Every 24 h we counted cells with trypan blue for the detection of the cell viability, analysed the cell cycle by flow cytometry and froze the cell pellets for RNA extraction. All experimental samples were run in triplicates.

Cell isolation

Cells of each cell line were collected in tubes, flasks were washed by phosphate-buffered saline (PBS; pH = 7.4) and centrifuged at 240 g/10 min.

Bone marrow or peripheral blood mononuclear cells were separated by Ficoll-Paque (density 1.077 g/mL, Pharmacia, Uppsala, Sweden) density centrifugation and stored at -80°C prior to the RNA extraction.

Extraction of RNA and cDNA conversion

Total RNA was extracted from a standardised amount of mononuclear cells isolated from patients or cell line using a modified method described by Chomczynski and Sacchi.²⁸ The total extraction volume of RNA was adjusted to the number of processed cells and converted into cDNA using MoMLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) according to manufacturers instructions.

RQ-RT-PCR

Real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR) was performed in the LightCycler™ rapid thermal cycler system (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide hybridisation probes were used in the system for quantification of $\beta 2$ microglobulin ($\beta 2m$) that served as a house-keeping gene, as described previously.²⁹ The AsnS transcript was detected by the set of primers from exon 4 overlapping intron to exon 5 with the SYBRGreen DNA-binding dye. The primer sequences (5'–3') were as follows: forward primer AAAGTGGAGCCTTTTCTTCCTG, reverse primer AGCCAATCCTTCTGTCTGTCATC. PCR amplification was carried out in 1 × reaction buffer (20 mmol/l Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/l KCl, 2.0 mmol MgCl₂) containing 200 µmol/l of each dNTP, 0.5 µmol/l of each primer, BSA 5 µg/reaction and 1 U of Platinum™ Taq DNA Polymerase (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA) and 5×10^{-5} diluted SYBRGreen dye (FMC BioProducts, Rockland, MA, USA) in a final reaction volume of 20 µl. For each PCR reaction, 1 µl of cDNA template was used. The cycling conditions were as follows: initial denaturation 94°C, 10 min, 45 cycles of denaturation 95°C 5 s, annealing 68°C 30 s and elongation 72°C 15 s. A melting curve analysis was performed after each run to find any possible nonspecific amplification or primer-dimers. The melting curve analysis was performed from 64°C.

Amplification and calibration curves were generated by affiliated software LightCycler 3 Data Analysis Software version 3.5.28 (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA). The calibration curve to assess the level of AsnS and $\beta 2m$ expression was achieved by dilution of REH cell line cDNA into buffered water for the experiments with cell lines. The calibration curve used for the analysis of patients' samples was prepared by a standard dilution of peripheral mononuclear cell (PBMC) cDNA obtained from healthy volunteer donors into buffered water.

For the *in vitro* experiments, the same aliquot of cDNA was used to prepare the dilution series in all tests. All samples were run in duplicates; the mean value was used. The normalised AsnS expression (AsnS_N) was determined as a ratio between AsnS and $\beta 2m$ expression levels, assessed by RQ-RT-PCR. In order to achieve highly precise values of AsnS expression, very strict criteria were applied to the samples analysed in this study. The difference of C_t (threshold cycle) between duplicates was <0.5 in all instances. In order to rule out the possible differences of PCR efficacy at various cDNA concentrations, the concentration of the samples was adapted so that all samples measured were within 1–20% of the calibration curve. All

samples were run in duplicates, a mean value was used for calculation of $AsnS_N$.

Flow-cytometry analysis

CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) was used for analysis of nuclear DNA from cell suspension according to the manufacturer's instructions. Briefly, propidium iodide bound to DNA is visualised as an orange-color fluorescence area. The distribution of cell-cycle phases is analysed with CELLQuest (Becton Dickinson) and ModFit (Verity House, Topsham, ME, USA) software applications.²⁵

Statistical analysis

Mann-Whitney unpaired nonparametric test was used for the analysis of the $AsnS_N$ level in the patients' and control samples. The overall distribution of $AsnS_N$ levels was tested using the Kruskal-Wallis method. MANOVA test was used for the multivariate analysis of patients' characteristics. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier test.

Results

Growth suppression of TEL/AML1[+] cells after BFM protocol-like L-asparaginase administration

We have simulated the therapeutic protocol ALL BFM 95 on REH (TEL/AML1[+]) leukaemic cell line and on Nalm-6 (TEL/AML1[-]) leukaemic cell line. L-asparaginase is administered every third day on BFM protocol. We have grown cells in RPMI 1640 medium with L-asparaginase at concentrations 0.4 and 4 U/ml, chosen according to the serum concentration measured in pharmacokinetics studies.³⁹ During the first part of the experiment (lasting 9 days), cells at the concentration of 0.3×10^5 /ml were cultured in medium supplemented with L-asparaginase. Control samples were cultured without drug for 9 days of experiments. In parallel, cells were cultured with single (at 0 h) or repeated (at 0, 72, 144 h) administration of L-asparaginase. After 9 days, 10^5 cells/ml were transferred into fresh RPMI1640 medium without L-asparaginase, and cultured for another 9 days. After 9 days, cells were collected and reseeded at the concentration 10^5 cells/ml and cultured for 10 days more. Every 24 h, the viability of the cells was monitored, and the cell cycle analysis and collection of cells for RNA isolation was carried out.

The growth of the cells was highly suppressed at the concentration 0.4 U/ml in single and repeated administration, respectively, compared with the control group. The effect of L-asparaginase was enhanced in the group cultured with 4 U/ml of L-asparaginase (Figure 1a). In the second part of the experiment, after 9 days of cultivation in a medium without L-asparaginase, the group pretreated with only a single dose of 0.4 U/ml L-asparaginase restarted to proliferate. The growth of cells pretreated with a single dose of 4 U/ml of L-asparaginase was detectable after a total of 19 days in L-asparaginase-free medium. In spite of L-asparaginase absence, the group previously treated with a repeated dose of 4 U/ml maintained cell growth suppression (Figure 1b). The data are summarised in Table 1.

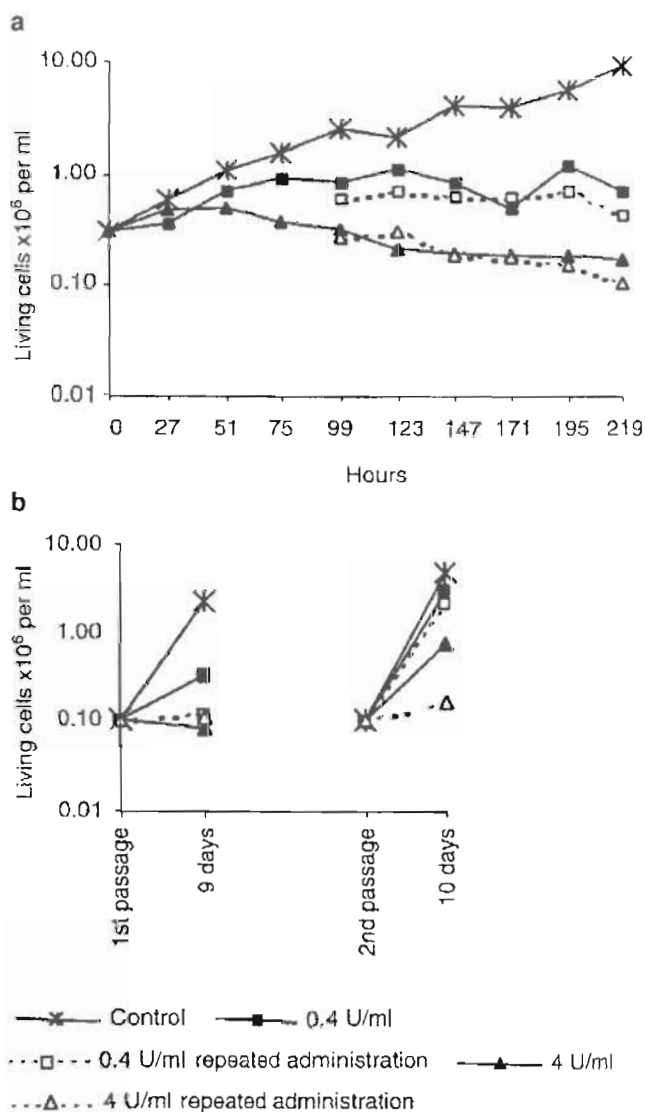


Figure 1 TEL/AML1[+] cell line growth under L-asparaginase treatment. Proliferation of TEL/AML1[+] cells (REH) under the L-asparaginase treatment. (a) REH cell line was cultured up to 219 days without L-asparaginase (control group), with single or with triple administration of 0.4 or 4.0 U/ml of L-asparaginase. (b) Cells from previous experiment were transferred into a fresh medium without L-asparaginase and cultured for another 9 days. After 9 days, cells were transferred into a fresh medium and cultured for another 10 days. The number of living cells ($\times 10^6$) is expressed on the y-axis.

The experimental procedure had to be modified in order to compare the REH and Nalm-6 cell lines. Nalm-6 cell line has a shorter doubling time (36 h) and rapid medium consumption not allowing a long-term culture in unchanged medium. In order to provide sufficient amount of nutrition, the cells were transferred into a fresh medium with appropriate concentration of L-asparaginase, every third day. During this experiment, REH cell line was kept under the same conditions as Nalm-6 cell line. Cells were cultured without (control group), with single (at 0 h) and repeated (at 0, 72, 144 h) administration of L-asparaginase (4 U/ml). After each 24 h, the same parameters were detected, as described in the previous experiment (Tables 2 and 3, Figure 2). Cells (10^5 /ml) were also transferred into RPMI 1640 medium without L-asparaginase and cultured for 8 days. After 8 days, cells were collected and reseeded at the concentration 10^5 cells/ml

Table 1 TEL/AML1[+] cell line growth under L-asparaginase treatment^a

L-asparaginase ^b (dose U/ml)	Cell concentration (cells/ml)					
	Initial	Day 9	Initial ^c	Day 9	Initial ^d	Day 10
0.0	3.0×10^5	9.3×10^6	1.0×10^5	2.2×10^6	1.0×10^5	4.9×10^6
0.4	3.0×10^5	7.1×10^5	1.0×10^5	3.3×10^5	1.0×10^5	3.0×10^6
4.0	3.0×10^5	4.3×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	2.1×10^6
4.0	3.0×10^5	1.7×10^5	1.0×10^5	0.8×10^5	1.0×10^5	7.6×10^5
4.0	3.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.6×10^5

The above table presents the concentrations of TEL/AML1[+] (REH) cells during BFM protocol-like L-asparaginase administration. L-asparaginase was administered at 0.4 and 4 U/ml concentration as a single or repeated dose. The control group of cells was cultivated without L-asparaginase. Starting and final concentrations of cells/ml are presented for each group.

^aNumber of doses and concentration of L-asparaginase (U/ml).

^bFirst passage in RPMI 1640 medium without L-asparaginase.

^cFirst passage in RPMI 1640 medium without L-asparaginase.

^dSecond passage in RPMI 1640 medium without L-asparaginase.

Table 2 TEL/AML1[+] and TEL/AML1 [-] cell line growth under L-asparaginase treatment^a

L-asparaginase ^b (dose U/ml)	Cell concentration (cells/ml)		
	Initial	Day 9	Day 9
REH	0.0		
	1×4.0	3.0×10^5	6.0×10^6
	3×4.0	3.0×10^5	1.5×10^4
Nalm-6	0.0	3.0×10^5	0.8×10^4
	1×4.0	3.0×10^5	1.7×10^7
	3×4.0	3.0×10^5	2.1×10^5
		3.0×10^5	2.4×10^5

The above table presents the concentrations of TEL/AML1[+] (REH) and TEL/AML1[-] (Nalm-6) cells during BFM protocol-like L-asparaginase administration. L-asparaginase was administered at 4 U/ml concentration as a single or repeated dose. Control groups of cells were cultivated without L-asparaginase. The starting and final concentrations of cells/ml are presented for each group.

^aNumber of doses and concentration of L-asparaginase (U/ml).

Table 3 Selected clinical and laboratory characteristics of TEL/AML1[+] patients^a

	No relapse (n = 20)	Subsequent relapse (n = 10)	Significance
Age (months)	53.5 (29–73)	49 (23–162)	NS
WBC ($\times 10^9/l$)	8.5 (2.7–149)	13 (4.2–121)	NS
Sex (M/F)	13/7	6/4	NS
Wt ₀	0.823 (0.261–1.418)	0.261 (0.089–0.538)	P = 0.0002

^aMultivariate analysis was performed using MANOVA test, degree of freedom = 1. All the data refer to initial diagnosis parameters.

and cultured for 11 more days. The inhibition of cell growth was superior in the REH culture. We have observed no effect of repeated L-asparaginase administration on the prolongation of growth inhibition of Nalm-6 after its transfer into a medium without L-asparaginase (data not shown).

Cell cycle analysis

In the course of the experiment simulating the BFM therapeutic protocol, we analysed the cell cycle of leukaemic cells treated with L-asparaginase. We have found a significant difference between REH and Nalm-6 cell line. Flow cytometry analysis showed the REH cells being accumulated in the G1/G0 phase. The percentage of the cells in S and G2/M phases after single or repeated administration of L-asparaginase is presented in

Figure 3. Most of the REH cells were found to be in the G1/G0 phase: 81–98% with a single dose, 91–98% with a repeated dose. The growth of Nalm-6 cells was unaffected by L-asparaginase throughout the experiment. In average, only 51–60% with a single dose and 47–57% with a repeated dose of Nalm-6 cells were in G1/G0 phase.

AsnS dynamics in cells treated with L-asparaginase

To determine the influence of L-asparaginase on the AsnS gene expression, REH cell line, Nalm-6 cell line and nonleukaemic B-lymphoid cells (NC–NC cell line) were cultured in the absence (control group) or presence of L-asparaginase. The following experiment was designed to provide a detailed insight into the dynamics of AsnS gene expression in the short period

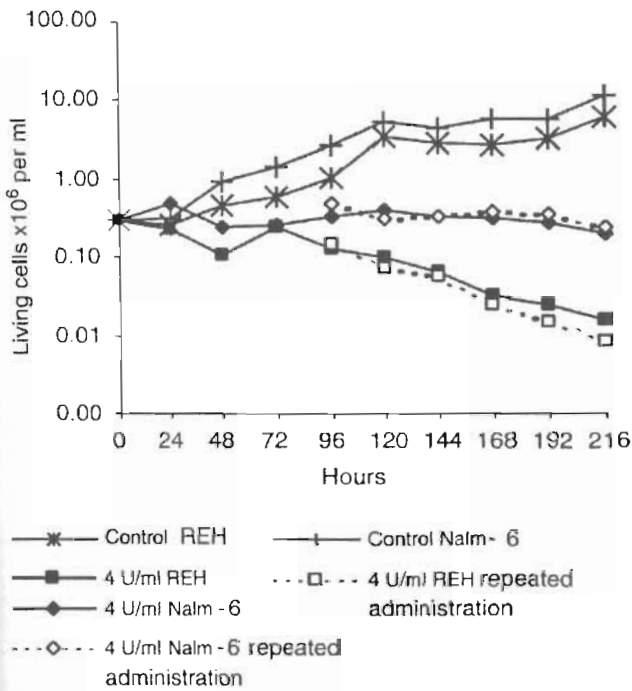


Figure 2 TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] cell line growth under L-asparaginase treatment. Proliferation of TEL/AML1[+] (REH) and TEL/AML1[-] (Nalm-6) under the L-asparaginase treatment. Nalm-6 and REH cell lines were cultured up to 216 days without L-asparaginase (control group), with single or with triple administration of 4.0 U/ml of L-asparaginase. The medium was changed every third day (ie, after 72 and 144 h) in order to meet the nutrition demands of Nalm-6 cell line. The number of living cells ($\times 10^6$) is expressed on the y-axis.

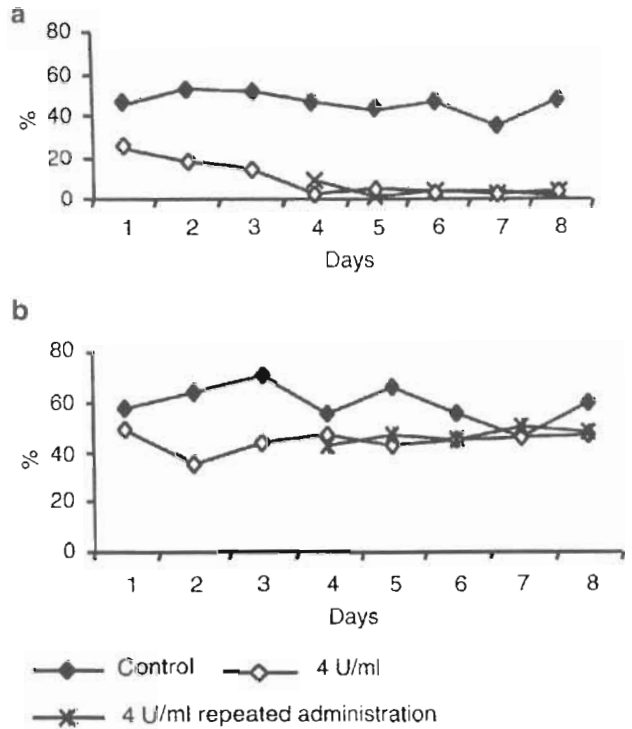


Figure 3 Cell cycle analysis of TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] cell line under L-asparaginase treatment. Analysis of cell cycle. Cells were cultured up to 8 days without L-asparaginase (control group), with single or triple administration of 4 U/ml of L-asparaginase. Flow-cytometric analysis of cells stained with propidium iodide was performed every day. The percentage of cells in S+G2/M in (a) TEL/AML1[+] (REH) and (b) TEL/AML1[-] (Nalm-6) cell culture was measured every 24 h.

after L-asparaginase administration. After 24 h incubation in fresh medium, 4 U/ml L-asparaginase was added. This concentration was shown to completely hydrolyse the amount of asparagine present in the medium (our unpublished results and Hutson *et al*).¹² The cell samples were isolated at time points 3, 6, 9 and 12 h after L-asparaginase administration. The basal level of AsnS_N and induced level of AsnS_N was determined by RQ-RT-PCR. The level of basal transcription in untreated (control) group of REH and NC-NC cells was 3.9 and 3.8 times lower than that of the Nalm-6 cells. The AsnS_N in the control groups remained stable over the period of 12 h in all three groups. The absolute level of induced AsnS_N depended on the initial level. The relative rate of induction calculated as a ratio between induced (treated group) and basal (control group) AsnS_N at each time point is nearly the same for the leukaemic and normal cells (Figure 4a, b).

RNA stability assay

The possible time-dependent degradation or upregulation of AsnS and $\beta 2m$ transcripts in BM or PB samples was evaluated. The TEL/AML1[+] BM diagnostic sample was divided into seven aliquots. One aliquot was processed within 3 h from the aspiration and the others were left at room temperature and processed at 6, 24, 30, 48, 54 and 78 h after the sample was taken. This experiment was performed twice. The sample of PB from healthy volunteers was divided into six samples. One aliquot was processed within 3 h from the aspiration and the

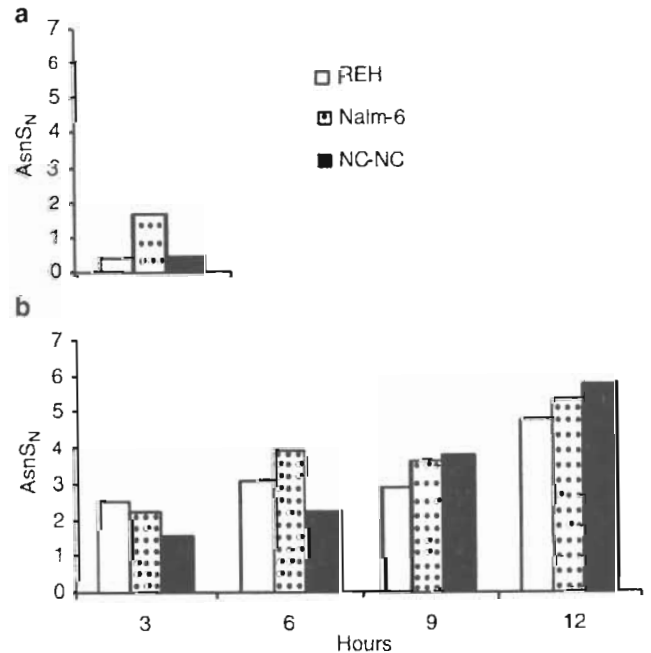


Figure 4 Expression of AsnS in TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] cell line under L-asparaginase treatment. Expression of AsnS in TEL/AML1[+] (REH), TEL/AML1[-] (Nalm-6) cell lines and EBV-transformed lymphoblastoid cell line (NC-NC). The level of AsnS_N represents the ratio of AsnS expression to the $\beta 2m$ control gene. (a) AsnS_N level in untreated cells. (b) Relative AsnS_N level in cells incubated 3, 6, 9 and 12 h with 4 U/ml of L-asparaginase.

... were left at room temperature and processed at 6, 12, 24, and 48 h after the sample was taken. This experiment was performed eight times. RNA stability assay showed no increase in AsnS_N over 36 h in both TEL/AML1[-] and [+] samples. Therefore, we ruled out significant artificial changes of AsnS_N in samples before processing.

Patients with TEL/AML1[+] ALL

We have compared AsnS expression in the BM samples taken at presentation in paediatric patients with acute leukaemia. Our group consisted of patients with TEL/AML1[+] ALL aged 2-6 years (n=20), and B-cell precursor ALL patients without TEL/AML1, BCR/ABL or MLL/AF4 fusion genes diagnosed at the age of 2-6 years (n=23). The TEL/AML1[+] patients showed significantly higher AsnS_N (median = 0.823) compared to TEL/AML1[-] patients (median = 0.416; P=0.008). Both of these groups showed significantly higher AsnS_N compared to the PB of healthy individuals (median = 0.087; P<0.0001) (Figure 5a). The overall distribution of AsnS_N was nonrandom (P<0.0001). We also analysed AsnS expression in unsorted and CD34+ enriched normal BM samples (n=2). The AsnS expression in both samples, full bone marrow (AsnS_N = 0.272) and separated CD34+ cells (AsnS_N = 0.164), were lower than the median values of leukaemic samples. We have also analysed TEL/AML1[-] patients with respect to ploidy. No significant difference in AsnS expression in the group of hyperdiploid ALL was observed compared to the group of nonhyperdiploid ALL.

AsnS expression in AML subtypes

We also analysed AsnS expression in blasts of patients with AML FAB M1 and M2 (n=10), patients with AML FAB M4 (n=9) and patients with AML FAB M5 (n=7). The AML subgroup FAB M5, known to have highest sensitivity to L-asparaginase among AML, showed significantly lower AsnS_N in diagnostic samples (median = 0.215) compared to the group of AML FAB M1/M2 (median = 0.503; P=0.04). All tested AML subtypes, AML FAB M1/M2, M4 and M5 showed higher AsnS_N compared to the PB of healthy individuals (P<0.001, P=0.002 and 0.006) (Figure 5a).

AsnS expression of TEL/AML1[+] ALL patients with subsequent relapse

In TEL/AML1[+] patients with subsequent relapse (n=10) we found lower AsnS_N in the BM sample at initial diagnosis (median = 0.261) compared to TEL/AML1[+] patients who achieved in first complete remission (CRI) (n=20; median = 0.823; P=0.002) (Figure 5b). The median time to relapse in the relapse group was 33.5 (12-57) months; the median follow-up of the group in CRI was 62 (35-75) months. However, the event-free survival in the TEL/AML1[+] group was significantly better for patients with AsnS_N above the median (P=0.00028) (Figure 6).

We did not observe a similar difference in the group of B-cell precursor ALL without TEL/AML1 fusion gene. The group with relapse (n=17) showed similar AsnS_N in diagnostic samples (median = 0.352) compared to patients with no relapse (n=23; median = 0.416). The median time to relapse in the

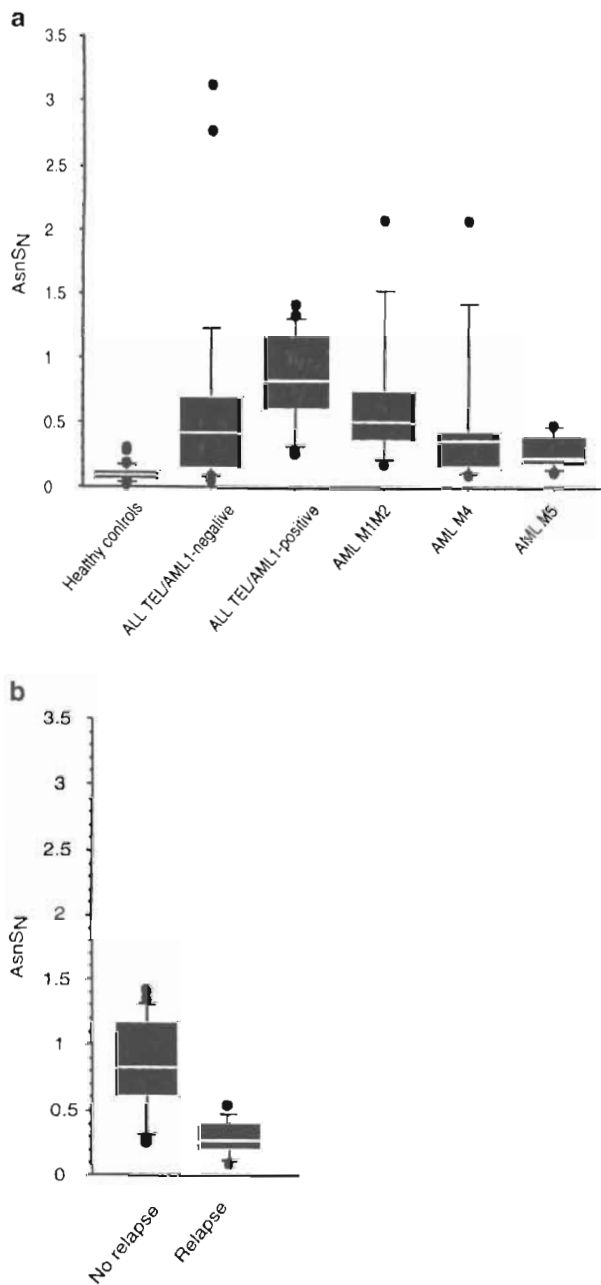


Figure 5 Expression of AsnS in clinical samples. AsnS expression in the clinical samples taken at the time of diagnosis and of healthy controls. The level of AsnS_N represents a ratio of AsnS expression to β 2m control gene. Boxes represent values between the 25th and 75th percentiles with the median marked, whiskers represent 10th and 90th percentiles, and the outlying values are represented by dots. (a) Box plot graph demonstrates AsnS_N in the TEL/AML1[+], TEL/AML1[-] ALL, FAB subtypes of AML and healthy controls. The overall distribution is nonrandom (Kruskal-Wallis; P<0.0001). (b) Box plot graph of AsnS_N in the TEL/AML1[+] patients with and without subsequent relapse, the difference is significant (Mann-Whitney; P=0.002).

'relapse group' was 32 (7-53) months; the median follow-up in the group with no relapse was 52 (32-73) months. No difference in the event-free survival was found within the TEL/AML1[-] group.

Both presentation and relapse samples were available and analysed in 23 patients. No significant difference in AsnS

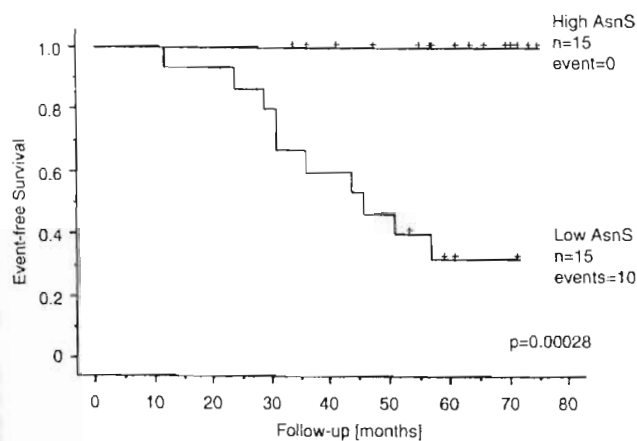


Figure 6 Event-free survival of TEL/AML1[+] patients with high and low expression of AsnS at presentation. TEL/AML1[+] patients with ($n = 10$) and without ($n = 20$) subsequent relapse of the disease were pooled. The median value of AsnS expression (0.6) was used as a cutoff for the separation into groups with 'high' ($n = 15$) and 'low' ($n = 15$) AsnS expression, respectively. Crosses represent patients still at risk of relapse.

expression and no trend were observed (median AsnS_N = 0.456; median AsnS_N = 0.427, respectively, data not shown).

Discussion

It is assumed that the sensitivity of the cells to the treatment with L-asparaginase is a result of multiple mechanisms including AsnS expression and enzymatic activity,^{12,15} amino-acid transport³¹ and a demand for asparagine in cells. We focused on the relationship between the sensitivity to L-asparaginase and the expression of its antagonist – AsnS.

We have used TEL/AML1[+] (REH) and TEL/AML1[-] (Nalm-6) cell lines for *in vitro* model. Cytotoxicity assay showed a higher sensitivity of REH to L-asparaginase compared to Nalm-6 (data not presented). This is in confluence with the data published on patient samples.¹⁶ The basal AsnS levels of REH and Nalm-6 cell lines are in the range observed in patient samples. The basal level of AsnS expression in Nalm-6 is higher compared to the REH cell line, which is opposite to the general trend observed in patients. Nevertheless, due to the large overlap of TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] patients, each of the cell lines may perfectly represent a particular patient. Still, cell line models were used solely for the expression induction experiments and no conclusions should be made on the basis of their initial AsnS expression levels. We disproved the first hypothesis tested that the ability to induce AsnS expression under the treatment with L-asparaginase would discriminate between L-asparaginase-sensitive, hypersensitive and insensitive cells. Rather surprisingly, the rate of AsnS expression induction after L-asparaginase administration was similar in TEL/AML1[+] and TEL/AML1[-] leukaemic cell lines. Moreover, the rate of AsnS expression induction of both leukaemic cell lines did not differ from the nonleukaemic lymphoblastoid cell line. These results indicated that a distinct sensitivity to L-asparaginase is an apparently more complex mechanism than simply insufficient induction of AsnS expression. However, a significant difference was seen when AsnS expression was studied in the healthy controls and ALL patients. The AsnS_N was elevated in the presentation samples of patients with B-cell precursor ALL

compared to the healthy controls. We found significantly higher AsnS_N level in the presentation samples of TEL/AML1[+] ALL patients compared to TEL/AML1[-] patients. This observation is in a perfect confluence with the data presented by Stams *et al.*,²⁴ although it contradicts what always has been thought, namely that a high level of AsnS expression is related to L-asparaginase resistance and not sensitivity. Conversely, both studies indicate an existing relationship between sensitivity to L-asparaginase and AsnS expression in untreated cells.

In 1992, Colleta *et al.*⁹ described AsnS to be a cell cycle 'early-delayed response gene'. Temperature-sensitive AsnS mutants, when exposed to nonpermissive temperature, could not proceed through the cell cycle, and compensationally increased AsnS transcription.¹⁰ We propose that a similar compensatory mechanism of cells unable to progress through the G₁ checkpoint can cause elevated AsnS_N in samples of TEL/AML1[+] ALL patients. This is indeed supported by the S-phase arrest which we observed in TEL/AML1[+], but not the TEL/AML1[-] leukaemic cell line when incubated with L-asparaginase. It is known that enzymatic activity of L-asparaginase causes not only asparagine, but also glutamine depletion in media.³² Glutamine concentration was also shown to be crucial for progression into the S phase of the cell cycle in various cells including lymphocytes.³³⁻³⁵

These findings together with our results led us to the hypothesis that TEL/AML1[+] cells are unable to progress into the S phase of cell cycle under nutrition stress caused by L-asparaginase. In contrast, TEL/AML1[-] cells are able to proceed through cell cycle under L-asparaginase treatment. This fact is then demonstrated with a different sensitivity to L-asparaginase between these two groups.

The TEL/AML1[+] group of ALL is generally considered to have an excellent prognosis, although relapses can occur.^{21,22,36} We compared AsnS_N in the presentation samples of the TEL/AML1 patients with subsequent relapse, and those who sustained complete remission. Both groups had a comparable length of follow-up. The TEL/AML1[+] ALL group with subsequent relapse displayed significantly lower levels of AsnS_N, similar to the TEL/AML1[-] group. This may reflect a lower sensitivity of leukaemic cells of these patients to L-asparaginase treatment. This effect was also demonstrated in the event-free survival analysis of TEL/AML1[+] group.

It has been proposed earlier²² that the better outcome of TEL/AML1[+] children on DFCI protocols²³ might be due to a higher L-asparaginase dose. Better sensitivity to L-asparaginase is believed to be the only treatment-related factor that would distinguish between TEL/AML1[+] and [-] patients. Therefore, quantitative determination of AsnS levels in diagnostic samples might provide a potentially powerful tool for the identification of TEL/AML1[+] patients at risk of relapse.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of Charles University #57, Internal Grant Agency of Ministry of Health #7433, Ministry of Education: #111100004, #111300003, #111300001; JS was supported by Ministry of Education FRVS #1011 and work of OH by Ministry of Health #00000064203. The collaboration of all Czech Paediatric Haematology (CPH) centres (leaders: B Blazek (Ostrava), Z Cerna (Plzen), Y Jabali (Ceske Budejovice), V Mihal (Olomouc), D Prochazkova (Usti nad Labem), J Stary (Praha), J Sterba (Brno), K Tousovska (Hradec Kralove)) is highly appreciated.

References

- Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Philips FS, Clarkson BD et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967; **27**: 2619–2631.
- Laffe N, Traggis D, Das L, Moloney WC, Hann HW, Kim BS et al. L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res* 1971; **31**: 942–949.
- 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.
- Tallal L, Tan C, Oettgen H, Wollner N, McCarthy M, Helson L et al. *E. coli* L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer* 1970; **25**: 306–320.
- Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, den Boer ML, Wunsche 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, Schulze-Westhoff P, Winkelhorst M, Kurzknabe E et al. Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol* 2000; **109**: 427–429.
- Codegioni AM, Biondi A, Conter V, Masera G, Rambaldi A, D'Incalci M. Human monocytic leukemia expresses low levels of asparagine synthase and is potentially sensitive to L-asparaginase. *Leukemia* 1995; **9**: 360–361.
- Pui C-H. Childhood Leukemias. First edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Colletta G, Cirafici AM. TSH is able to induce cell cycle-related gene expression in rat thyroid cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **183**: 265–272.
- 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.
- Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS et al. Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26976–26985.
- Hatson 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–C1699.
- Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS. Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31139–31144.
- Siu F, Chen C, Zhong C, Kilberg MS. CCAAT/enhancer-binding protein-beta is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 2001; **276**: 48100–48107.
- Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* 2001; **357**: 321–328.
- Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Ornum E, Beverloo HB 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.
- Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 2001; **20**: 3716–3725.
- Zuna J. The role of TEL and AML1 genes in the pathogenesis of hematologic malignancies. *Cas Lek Cesk* 2001; **140**: 131–137.
- Fennick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 6566–6574.
- Hiebert SW, Lutterbach B, Amann J. Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol* 2001; **8**: 197–200.
- Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999; **13**: 22–24.
- Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL. *Leukemia* 1999; **13**: 1633.
- Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE et al. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; **92**: 4792–4797.
- Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood* 2003; **101**: 2743–2747.
- Hrusak O, Trka J, Zuna J, Houskova J, Bartunkova J, Sary 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.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G 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.
- Trka J, Zuna J, Hrusak O, Michalova K, Muzikova K, Kalinova M et al. No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples. *Blood* 1999; **93**: 1106–1107, discussion 1108–10.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156–159.
- 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.
- Muller HJ, Beier R, Loning L, Blutters-Sawatzki R, Dorffel W, Maass E 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.
- Aslanian AM, Kilberg MS. Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginase-resistant MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* 2001; **358**: 59–67.
- Muller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998; **28**: 97–113.
- Horig H, Spagnoli GC, Filgueira L, Babst R, Gallati H, Harder F et al. Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J Cell Biochem* 1993; **53**: 343–351.
- Chang WK, Yang KD, Shiao MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol* 1999; **117**: 482–488.
- Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E et al. Regulative potential of glutamine – relation to glutathione metabolism. *Nutrition* 2002; **18**: 217–221.
- Madzo J, Zuna J, Muzikova K, Kalinova M, Krejci O, Hrusak O et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer* 2003; **97**: 105–113.

Příloha 2:

Starková J, Krejčí O, Otová B, Krejčíková K, Hrušák O, Starý J a Trka J (2006):
TEL/AML1 spustením metabolického stresu zvyšuje citlivosť leukemických buniek na L-Asparaginázu, **Transfúze a hematologie dnes** 2006, 2(12), 70-75

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

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

¹CLIP-Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika detskej hematologie a onkologie, 2. LF UK Praha,

²Ústav lekárskej biologie a genetiky, 1. LF UK Praha, ³Ústav 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 malígnych lymfoidných bunkách. Analýza dát expresného profilovania pacientov s akútnou lymfoblasticou 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 therapeutical 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, Oettingen 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 nahradzuje 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 blokovanie 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 tefacie sérum a 10 ml/l antibiotický roztok (100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin). Všetky kultúry boli inkubované pri 37 °C v 5% CO₂. Bunky boli zbierané pomocou centrifugácie 10 min/240 g a resuspendované v koncentrácii 3 x 10⁵ 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°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 expície génu pre GDH bol použitý SYBRGreen a primery s nasledovnou sekvenciou: forward primer AAG ATC AAT CCC AAG AACTAT 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 $\beta 2m$ expície 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 expícia AsnS a GDH ($AsnS_N$ a GDH_N) bola vypočítaná ako pomer medzi hladinami expície 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

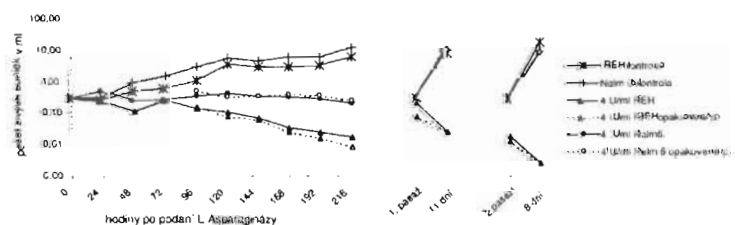
expície normalizovaného génu u sledovaných pacientov bol takisto použitý Mann-Whitney nepárový neparametrický test.

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 štúdií (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 nemenom 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.

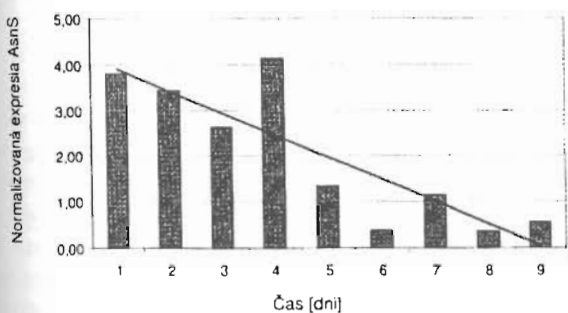


Graf 1. Rast TEL/AML1[+] bunkovej línie (REH) a TEL/AML1[-] bunkovej línie (Nalm-6) po podaní L-Asparaginázy s jednoduchým alebo opakovaným podaním monitorovaný počas 28 dní trvania experimentu. Po 9 dňoch kultivácie buniek v médiu s L-Asp boli bunky prenesené do média bez L-Asp a kultivované ďalších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

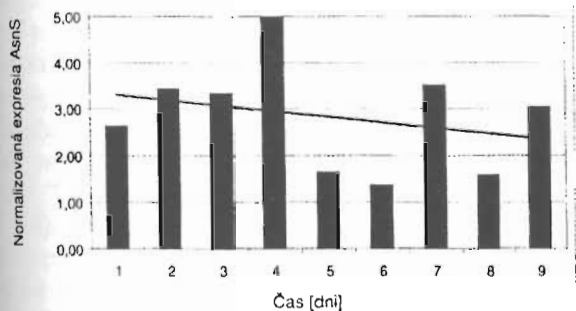
U Nalm-6 buniek nebol naproti tomu zaznamenaný žiadny rozdiel v prolongácii inhibície rastu po pasáži buniek v médiu bez L-Asp (22) (obr. 1).

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 línií. 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.

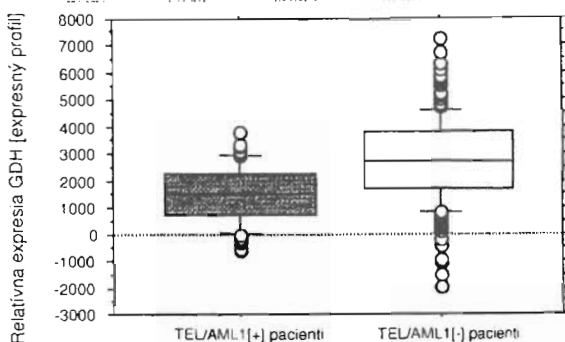


Graf 2b. Normalizovaná hladina AsnS detekovaná v TEL/AML1[+] bunkách (REH) každých 24 hod. v experimente simulujúcom liečebný protokol BFM-ALL95 po 9 dní.

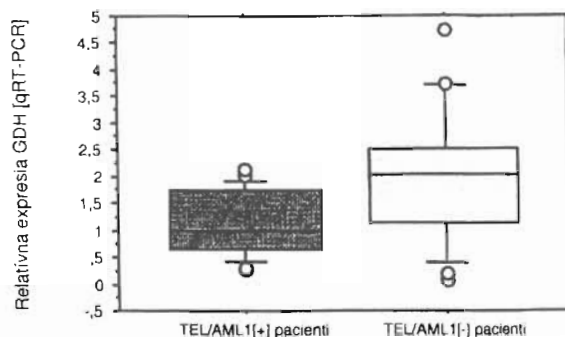
časových bodoch bola dynamika AsnS_N rozdielna. U Nalm-6 buniek klesala až na hladinu rovnakú s hladinou expresie u kontrolnej skupiny. U REH buniek AsnS expresia si udržiavala približne rovnakú hodnotu po celých 9 dní jej sledovania (obr. 2).

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 gén 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 exprese 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 exprese 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 pretrvávajú v 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/AML[+] 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/AML[+] pacientov sme detekovali signifikantne nižšiu hladinu exprese 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/AML[+] pacienti lepšie liečebné výsledky na protokoloch s vyššou dávkovaním L-Asp (37).

Literatúra

1. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 2002; 1: 417-420.
 2. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-1548.

3. 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.
 4. 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.
 5. Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 2001; 20: 3716-3725.
 6. Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellini P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 1999; 274: 30132-30138.
 7. 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.
 8. Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia* 1999; 13: 1932-1942.
 9. Špeck NA. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 192-196.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Oettingen HF, Old LJ, Boyse EA, et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967; 27: 2619-2631.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Chang WK, Yang KD, Shiao MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 482-488.
 18. Barbosa-Tessmann IR, 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.
 19. Horig H, Spagnoli GC, Filgueira L, et al. Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J Cell Biochem* 1993; 53: 343-351.
 20. Ueno T, Ohtawa K, Mitui K, et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 1997; 11: 1858-1861.
 21. Greco A, Gong SS, Iltisauer M, Basilico C. Organization and expression of the cell cycle gene, ts11, that encodes asparagine synthetase. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2350-2359.
 22. Kinjot O, Starkova J, Gtova R, 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 cyler 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@lfmotel.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

Příloha 3:

Starkova J, Madzo J, Cario G, Kalina T, Ford A, Zaliova M, Hrusak O a Trka J (2006): *Identification of RUNX1 target genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukaemic cells*, rukopis zaslaný k publikaci

Running heads:

STARKOVA et al

RUNX1 and ETV6/RUNX1 in lymphopoiesis

Scientific section designations:

Hematopoiesis

Title:

Identification of RUNX1 target genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukaemic cells

Authors:

Julia Starkova, Jozef Madzo, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Anthony Ford, Marketa Zaliova, Ondrej Hrusak and Jan Trka

Abstract:

RUNX1 is an important regulator of myelopoiesis, however less is known about its role in lymphopoiesis. ETV6/RUNX1 fusion arising from t(12;21) is the most common chromosomal aberration in paediatric cancers found in 25% of childhood ALL. According to our hypothesis, ETV6/RUNX1 causes pathological differentiation block in lymphoid cells by recruiting a corepressor complex including histone deacetylase. We show that this block is partially reversible after the treatment with histone deacetylase inhibitors. We also demonstrate that ETV6/RUNX1 protein directly interacts with the previously identified target gene of RUNX1 transcription factor. We subsequently used the effect of histone deacetylase inhibitors on ETV6/RUNX1-positive leukaemic cells for identification of (ETV6/RUNX1) target genes in the lymphoid progenitor cells. Expression profiling analysis confirmed changes in the expression of group of genes differentially expressed in ETV6/RUNX1-positive and -negative leukaemic cells. In selected group of genes with known role in the cell cycle regulation (JunD, ACK1, PDGFRB and TCF4) expression changes were confirmed by quantitative expression analysis. These data support our hypothesis that histone deacetylase inhibitors affect ETV6/RUNX1-positive cells via direct interaction with ETV6/RUNX1 protein, and that treatment with HDACi may release pathological differentiation block caused by ETV6/RUNX1 chimeric transcription factor.

Affiliations note:

From Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology/Oncology, 2nd Medical School, Charles University Prague, Czech Republic; Department of Paediatrics, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany;

Leukaemia Research Fund Centre, Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories, London, United Kingdom

Grant support note:

Supported by grant # 8316 from Czech Ministry of Health, 301/D189 from Grant Agency of the Czech Republic, by Grant Agency of Charles University # 56/2005, # 75/2004 and by Czech Ministry of Education MSM0021620813

Statement of authorship:

J.S. performed the research and wrote a paper; J.M. analysed data; G.C. performed expression profiling studies; T.K. coordinated flow cytometry analysis; M.Z. participated in establishing transfection models; A.F. designed transfection models; O.H. did statistical analysis; J.T. coordinated the project, intellectually contributed to the paper and did manuscript revision

Reprints: Julia Starkova, Dept.of Paediatric Haematology/Oncology, 2nd Medical School, Charles University, V uvalu 84, Prague 15006, Czech Republic; e-mail: julia.starkova@lfmotol.cuni.cz

Introduction

Neoplastic transformation is characterised by inadequate proliferation and changes in the mechanisms of differentiation and apoptosis¹. Aberrant transcription factors, frequently present at diagnosis of leukaemias are probably responsible for one of the steps in leukaemogenic transformation in these particular cases. The expression of chimeric transcription factors results in a block of differentiation and apoptosis by interfering with the function of their wild-type counterparts. The role for one of these chimeric transcription factors, ETV6/RUNX1 or TEL/AML1 in leukaemogenesis is still not completely understood despite the frequency of t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukaemia (ALL; up to 25%)²⁻⁴.

In normal haematopoietic cells protein ETV6 (TEL), an ETS family transcription factor, is composed of two functional domains: N-terminal PNT (pointed) domain and C terminal ETS (erythroblast transformation specific) domain⁵⁻⁷. RUNX1 (AML1, CBF-beta), a member of the RUNX protein family⁸ represents a beta-subunit of CBF (Core Binding Factor) and displays a high homology with the *Drosophila* gene segment *runt*. RUNX1 comprises some characteristic domains, the Runt domain is responsible for the binding with DNA and protein-protein interaction, the transactivation domain is located in the C-terminus site⁹⁻¹². ETV6/RUNX1 fusion protein contains the N-terminal part of ETV6 protein with the

dimerization PNT domain and almost the complete RUNX1 protein with all functional domains. Deficiency in RUNX1 expression leads to an early block in the haematopoietic differentiation. Therefore, RUNX1 knockout completely lacks a mature haematopoiesis and is embryonic lethal^{13,14}. RUNX1 seems to have a dual role in promoting cell cycle progression and differentiation, which could depend on the presence of different factors that interact with it during each stage of the development of a cell¹⁵. RUNX proteins are able to either increase or actively inhibit the transcriptional activity of the target genes, most likely depending on the specific cell type as well as the particular target gene¹⁶. ETV6 function is essential for the establishment of haematopoiesis of all lineages in the bone marrow¹⁷. ETV6^{-/-} mice are embryonic lethal because of a yolk sac angiogenic defect.

The observed effects of ETV6/RUNX1 fusion protein in haematopoiesis are heterogeneous. An *in vivo* model of p16p19-deficient mice with bone marrow cells transduced with retroviral vector expressing ETV6/RUNX1 resulted in a high frequency of leukaemia¹⁸. However, in an ETV6/RUNX1 model published by Fisher et al, despite the accumulation of both multipotent and B-cell progenitors *in vivo*, no leukaemia induction was observed over one year¹⁹. Another study showed that ETV6/RUNX1 dramatically alters differentiation of haematopoietic progenitors *in vitro*, preferentially promoting B-lymphocyte development, enhancing the self-renewal of B-cell precursors, and leading to the establishment of long-term growth factor-dependent pre-B cell lines²⁰. In the model of Tsuzuki et al, ETV6/RUNX1 expression was found to inhibit B-cell differentiation, thus leading to an accumulation of early B-cell progenitors that could provide a potential mechanism for the protracted preleukaemic state that often precedes ALL²¹. These models assume that ETV6/RUNX1 fusion generates a preleukaemic clone *in utero* that persists for several years in a clinically covert fashion¹⁹ and confirm the relevant impact of ETV6/RUNX1 protein on the haematopoietic cell development although differences were described according to the model used.

As the DNA-binding domain of RUNX1 is retained in ETV6/RUNX1 fusion, it is expected that this fusion protein bind to DNA through this domain and functions in a dominant negative fashion. Several theories propose a mechanism of repression activity of ETV6/RUNX1. Siu et al describe heterodimerisation of ETV6/RUNX1 and ETV6 that prevents normal ETV6 activity. Another study suggests that the dominant negative effect of ETV6/RUNX1 is caused by binding with RUNX1 co-activators (e.g. p300) and sequestering into the complex localised in cytoplasm^{22,23}. Another theory proceeds from previously described association of ETV6 part of the chimeric protein with the nuclear co-repressors mSin3A, N-CoR and the histone deacetylase 3 (HDAC-3) which led to the assumption that ETV6/RUNX1 works as a transcriptional repressor by the change of chromatin pattern^{7,24,25}. Published results confirmed direct negative effect of ETV6/RUNX1 protein using reporter constructs driven by regulatory regions derived from haematopoiesis-specific genes including the lymphoid-

specific TCR β enhancer and IL3 promoter^{10,26}. However, no other target genes of RUNX1/ETV6, expressed in haematopoietic cells were identified so far. The proposed mechanism of action via chromatin remodelling using histone deacetylases (HDACs) was not proven.

HDACs are characterised by their capability to secede acetyl group from the lysine residues localized at the ends of histones. HDACs repress expression via binding to the cis-regulatory elements of genes and blocking the differentiation of haematopoietic cells. Relation of HDACs to haematological diseases was described for the first time in the study on acute promyelocytic leukaemia (APL). RARalpha receptor is able to bind the co-repressor complex including HDACs and this function is extended by binding with its fusion partner PML in t(15;17). Another fusion partner of RARalpha, PLZF in t(11;17), also binds the co-repressors and stops transcription of the target genes, consequently blocking the myeloid differentiation. The aberrant repression in both *in vivo* and *in vitro* models of APL was turned over only by HDAC inhibitors (HDACi) in combination with retinoic acid²⁷. HDACi are small molecules interfering with HDACs and thus affecting the acetylation of histones, resulting in the unwinding of chromatin²⁸⁻³⁴. A number of HDACi have been characterised that inhibit the deacetylation of histones, which is associated with the re-activation of gene expression, and inhibition of tumour growth^{1,28,30,32}.

It was proposed that the ability of chromatin remodelling is responsible for the leukaemogenic role of RUNX1/ETV6 fusion protein and that this effect could be revertible by the application of HDACi³⁵. We aimed to explain the mechanism of action of ETV6/RUNX1 aberrant transcription factor. In the current project we used HDACi Trichostatin A (TSA) and valproic acid (VPA) to test the hypothesis of aberrant chromatin remodelling that affects expression of genes originally transactivated by RUNX1³⁶⁻³⁸. We tested whether HDACi can release the pathological differentiation block of lymphoid leukaemic cells by direct effect on ETV6/RUNX1. We wanted to identify the target genes of ETV6/RUNX1 in lymphopoiesis using expression profiling and studied whether their expression actually vary depending on the acetylation/deacetylation of histones.

Material and methods

Cell cultivation

REH, B-cell precursor leukaemia cell line with translocation (12;21) provided kindly by R. Pieters (Erasmus Medical Center Rotterdam), Nalm-6 B-precursor leukaemic cell line with translocation (5;12), Nalm-24 B-precursor leukaemic cell line with translocation (9;22) and NC-NC - normal lymphoblastoid cells immortalized by EBV (Epstein-Barr virus) transformation were used for experiments. Cell cultures except for REH were purchased from the DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig.

Cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with 2mM L-glutamine with 10% of foetal calf serum (FCS) and 10ml/l antibiotic solution (100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin). All suspension cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂. Cells were collected by centrifugation for 10min at 240g and resuspended at a density of 5x10⁵ cells /ml in fresh medium 24hrs before all experiments. Cell lines were treated in 6-well plates, 24 and 48 hours with VPA at concentration 0.5mM and 1.0mM and with TSA at concentration 120nM and 240nM. The doses of VPA were chosen according to the optimum serum concentrations in neurological patients (0.35-0.7mM).

Isolation of mRNA and cDNA conversion

Total RNA was extracted from a standardised amount of mononuclear cells isolated from cell line using a modified method described by Chomczynski and Sacchi³⁹ and from patients samples as described previously⁴⁰. The total extraction volume of RNA was adjusted to the number of processed cells and converted into cDNA using MoMLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry

Immunophenotype measurement of treated cells was performed with a combination of fluorescent monoclonal antibodies. Particular antibodies were chosen in order to cover specific stages of studied B-cell development. The selected immunostainings were measured by multicoloured combinations: surface antigens - CD10 FITC / CD20 PE / CD71 A1633 / DAPI; intracellular antigens - iTdT FITC / ilgM PE / 20 PC5 and iRAG-1 A1633. For measurement we employed BD FACSAria Cell-Sorting System (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and data acquisition analyses were performed by FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA) and by CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) software applications. CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson; San Jose, CA, USA) was used for DNA analysis. All individual cultivations and cell measurements were performed in independent triplicates.

Plasmids

Plasmid pcDNA3.1-ETV6/RUNX1Myc for transient ETV6/RUNX1 model and pGZME-luc for luciferase assay were kindly provided by A. Ford (Institute of Cancer Research, LRF London). Control vector pcDNA3.1-empty was prepared by EcoRI restriction and pGL3-basic and pRL-CMV were purchased from Promega, Madison, WI, USA.

Luciferase assay

The human carcinoma cell line $1.5 \cdot 10^5$ HeLa bb/well (24well dish) was transfected with pcDNA3.1- ETV6/RUNX1Myc or pcDNA3.1-empty (1,6 μ g) by Lipofectamine (2 μ L), 600 μ L of serum free medium 24hrs before transfection with pGZMB-luc. DNA fragment of granzyme B (GZMB) promoter was subcloned into Sma-I site of pGL3-basic luciferase reporter gene construct to form pGZMB-luc. Cells were transfected by pGL3-basic to normalize the luciferase activity (pGZMB-luc/pGL3-basic). pRL-CMV was transfected to each sample for normalizing transfection efficiency.

To test the effect of HDACi on ETV6/RUNX1, after incubation of HeLa cells with VPA (1mM) and TSA (240nM) luciferase activity was monitored again and the difference between untreated and treated cells was calculated. 100% value was assign to untreated cells. Luciferase activity was measured by luminometer Microplate TLX2 using Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Madison, WY, USA) according to manufacturers instructions. All experiments were done in triplicates. Data were expressed as relative luciferase activity (RLU).

qRT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR was performed in the LightCycler[™] rapid thermal cycler system (Roche Diagnostic GmbH, Basel, Switzerland) and Q-Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Oligonucleotide hydrolyzation probes were used in systems for quantification of genes selected from expression profiling, SYBRGreen DNA-binding dye for RAG1 and TdT genes and oligonucleotide hybridization probes for β 2microglobulin (β 2m; house-keeping gene)⁴.

Gene expression measurements and analyses

Spotted cDNA microarrays were used that contain more than 43,000 features representing approximately 30,000 genes (Stanford Functional Genomics Facility, Stanford, CA, USA). We labeled the sample RNA and reference RNA with different fluorescent dyes (Cy5-dUTP and Cy3-dUTP, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany) and comparatively hybridized them to an array.

The fluorescence intensities of Cy5 and Cy3 were measured using a Genepix 4000 scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and analysed using GenePix Pro 4.1 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) Subsequent analysis and normalisation of data was performed as previously described^{40,41}.

Statistical analysis

To analyse the data of REH samples treated with HDACi in the supervised analysis, we used Significance Analysis of Microarrays (SAM) ⁴². Significantly differentially expressed genes were obtained performing a 1000fold permutation test and considering a FDR of 5% and a Fold change of >2.

Recalculation of expression profiling data from ALL patients was performed analysing the data published in Fine et al. ⁴¹ which are available through the Stanford Microarray Database (<http://genome-www.stanford.edu/microarray>) as previously described ⁴³. Differences between genotypic subgroups were calculated using the data from patients with B-cell precursor ALL. For graphical comparison of the predictive value of genes correlating with a genotype assessed by different methods, the probe-set-specific optimal cut-off value was determined using a statistical software R (<http://www.r-project.org>). For each probe set, the frequencies of cases above all possible cut-off values were computed. The cut-off value that led to the best separation (judging by distance from a non-correlating diagonal that connects all points with equal frequencies) was calculated. The level that led to the largest distance from the diagonal of equality was used as the optimum cut-off value for each probe set ⁴³.

Results

Effect of HDACi on proliferation activity and apoptosis

We have tested cell cycle progress and apoptosis rate after HDACi treatment. Increase in the number of apoptotic cells was expressed as the ratio of apoptotic fraction in treated cells to apoptotic fraction in untreated cells. In REH cell line, the apoptosis rate was 8% using 1mM of VPA, and 26% using 240nM of TSA in contrast to 3.7% and 1.7% in control lymphocytes (NC-NC cell line). Similarly, in Nalm-6 the apoptosis rate reached 17% with VPA, and 41% with TSA. The Nalm-6 and REH cell lines reduced their proliferation activity (S+G2/M) by 19%(VPA), 28%(TSA) and 7%(VPA), 15%(TSA), respectively. These data suggest that treatment with TSA preferentially leads to apoptosis in both ETV6/RUNX1-positive and -negative cells. However, this effect was seen after VPA treatment clearly only in Nalm-6 cells whereas in REH cells we observed a relative increase in G1/G0. In contrast, in NC-NC cells cell cycle phases retained proportionally almost unchanged. (Figure 1).

Detection of differentiation antigen shift

Three leukaemic cell lines with known fusion genes, REH (ETV6/RUNX1), Nalm-24 (BCR/ABL) and Nalm-6 (TEL/PDGFRB), were selected for monitoring of differentiation. Initially, CD10, CD20 and CD19 levels were detected 24 and 48 hours after HDACi (VPA, TSA) treatment. Due to different developmental stage of selected cell lines mean fluorescence area intensity instead of genuine cell count was measured. This allowed a

simple comparison of differentiation pattern shift. Native REH cells expression pattern was CD10⁺⁺/CD20⁻/CD19⁺. After cultivation with HDACi, CD10 hyperexpression decreased (CD10⁺), CD20 expression increased to low positivity (CD20^{dim}/+) and level of CD19 decreased but retained within positive range. Native Nalm-24 cells expression pattern was CD10⁺/CD20⁺/CD19⁺. After treatment, expression of all studied antigens decreased, however, did not reach negativity. Native Nalm-6 cells expression pattern was CD10⁺⁺/CD20⁻/CD19⁺. Expression of CD10 was dysregulated in up and down manner depending on the time of acquisition, dose and type of HDACi. Its level oscillated; nevertheless, it tended to slightly higher expression. Surface antigen CD20 maintained its initial negativity under treatment with HDACi (data not shown).

Whereas Nalm-24 and Nalm-6 cell lines did not display evident differentiation drift, REH cell line expressed CD10, CD20 and CD19 in a pattern similar to more mature normal blast 44. To prove REH cell maturation, we used another differentiation marker of B-cell development, TdT. After HDACi administration the expression of TdT in REH cell line decreased down to one half of untreated control, in Nalm-24 cells the TdT level decrease was not so evident. RAG-1 expression in REH cell line paralleled that of TdT. Overall expression changes of these common B-cell precursor differentiation antigens normalized to untreated cell levels are shown in Table 1. Value of each measurement is presented as the mean \pm standard deviation of fluorescence. Lower doses (0.5mM VPA, 120nM TSA) of VPA and TSA were less effective, however the same trends were observed.

The expression decrease of RAG-1 and TdT antigen was confirmed on mRNA level by qRT-PCR. Transcription level of RAG-1 and TdT were normalized to the expression of housekeeping gene, β 2-microglobulin. Normalized expression data of treated and untreated samples were compared.

The mRNA level of RAG-1 gene rapidly decreased after 24 hours from initial level 3.30 ± 0.321 to 1.004 ± 0.053 after VPA ($p=0.0002$) and 0.197 ± 0.046 after TSA ($p<0.0001$) administration. Similarly, the mRNA level of TdT significantly decreased within 24 hours after TSA or VPA treatment from initial RNA level 1.767 ± 0.178 to 0.888 ± 0.110 ($p=0.01$) and 0.072 ± 0.020 ($p=0.0001$), respectively (Figure 2).

Functional proof of ETV6/RUNX1 regulation of Granzyme B

The transcription of GZMB is known to be directly regulated by RUNX1 protein^{45,46}. Therefore, we used GZMB promoter region cloned to luciferase construct to determine whether ETV6/RUNX1 represses GZMB expression on the basis of an existing RUNX1-binding site. Luciferase activity was measured in HeLa cells transfected with pcDNA3.1-ETV6/RUNX1Myc and compared to HeLa with pcDNA3.1 empty vector. Mouse DNA fragment of GZMB (bp -324 to -43) has two RUNX1-binding sites (-278 to -273, -219 to -

214). Inserted sequence of GZMB has 84% homology with human gene fragment. Cells were transfected by pGZMB-luc or pGL3-basic to normalize the luciferase activity a fold change of about 3 RLU (relative luciferase unit) in ETV6/RUNX1 cells vs control cells (empty vector) indicates that GZMB is downregulated by ETV6/RUNX1. Twenty-four hours cultivation with HDACi released the expression block. Values were calculated as RLU of ETV6/RUNX1 cells /RLU of control cells. Ratio of luciferase activity of nontreated cells was 0.436 ± 0.13 in comparison with cells treated with VPA or TSA, 0.796 ± 0.07 ; 0.789 ± 0.21 , respectively (Figure 3).

Screening strategy for identification of downstream genes

We used the direct effect of HDACi on ETV6/RUNX1-positive leukaemic cells to identify the target genes of (ETV6/RUNX1) in B-lineage lymphoid precursor cells. Hierarchical cluster analysis of expression profiling of treated (VPA, TSA) vs untreated REH cells showed that the three groups (TSA-treated, VPA-treated and non-treated controls) were clearly separated. Interestingly, the VPA-treated cells clustered closer to the control cells than to the TSA-treated cells, the possible explanation being the less toxic and more specific effect of VPA discussed further. Initially we aimed to identify genes differentially expressed in ETV6/RUNX1-positive leukaemias when compared to other leukaemia subgroups. We set the cut-off level of expression of all genes reliably discriminating diagnostic leukaemic samples of ETV6/RUNX1-positive paediatric patients against other genotypically characterised ALL subgroups (BCR/ABL and MLL/F4). The level that led to the largest distance from the noncorrelating diagonal was used as the optimum cut-off value for each probe set ⁴³. Based on this criterion we lined up the genes of interest. We selected genes that were downregulated in ETV6/RUNX1-positive cells. During the next step, we defined the “closeness” of the genes under analysis. The genes were selected if the mathematical difference between their expression in ETV6/RUNX1-positive patients and in REH cells was less than the minimum difference in expression between ETV6/RUNX1 and BCR/ABL samples, and at the same time, between ETV6/RUNX1 and MLL/AF4 samples. Furthermore, genes that fulfilled above described criteria were selected and interdigitated with the group of genes with significantly upregulated expression after VPA treatment. Finally, top 24 genes were selected (shown in Table 2).

Expression profiling vs qRT-PCR

We confirmed the expression of four genes by qRT-PCR, three of them downregulated and one upregulated in ETV6/RUNX1-positive leukaemias. First, ACK1 (alias TNK2, activated p21cdc42Hs kinase) and PDGFRB (platelet derived growth factor receptor β) were chosen from our list of top 24 genes (see above). Moreover, differential expression in ETV6/RUNX1-

positive and -negative patients was confirmed by comparison with other publicly available expression profiling data at <http://www.stjudereseearch.org/ALL1> and <http://www.stjudereseearch.org/ALL3>^{47,48}. Gene JunD (jun D proto-oncogene) was chosen from the more extensive list of first 70 genes and gene TCF4 (transcription factor 4) was selected as an example of genes upregulated in ETV6/RUNX1-positive cells. Expression of JunD, ACK1 and PDGFRB in ETV6/RUNX1-positive patients as well as in the cell lines was low with a clear increase after HDACi treatment. TCF4 gene expression was high and the treatment with HDACi led to a decrease. We confirmed changes of expression levels by qRT-PCR between treated vs untreated cells: JunD – TSA p=0.013, VPA p= 0.0008; ACK1 – VPA p=0.07, TSA p=0.5; PDGFRB – TSA p< 0.0001, VPA p=0.016; TCF4 – TSA p< 0.0001, VPA p=0.0002 (Figure 4).

Discussion

Functional consequences of fusion gene formation are either constitutive kinase activation (e.g. BCR/ABL) or an altered transcriptional regulation. Published studies suggest that RUNX1 fusion proteins may act as the negative regulators of genes that, in normal haematopoiesis, are trans-activated by RUNX1 transcription factor^{24,49-51}. RUNX1 is known to regulate promoters of various genes involved in myeloid differentiation, such as macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor, granulocyte-macrophage CSF, interleukin 3, neutrophil elastase, myeloperoxidase and other^{49,52}. RUNX1 regulates haematopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation but its role in lymphoid development is not yet fully understood⁵³. Only few RUNX1 target genes or regions have been described in lymphoid cells (i.e. B-lymphoid kinase, complement receptor 1, enhancers of T-cell receptor β and immunoglobulin α)^{10,23,54}.

We hypothesized that a normal role of RUNX1 in B-cell precursors (transcriptional regulation of genes involved in lymphoid differentiation) is overridden by its dominant negative fusion competitor. ETV6/RUNX1 recruits a co-repressor complex including HDAC, thus inducing a chromatin remodelling and consequently blocking transcription of genes normally trans-activated by RUNX1. We assumed that ETV6/RUNX1 causes pathological differentiation block in lymphoid cells by binding to the target DNA sequences using the RUNX1 part of fusion protein. To prove the direct involvement of HDACs in this differentiation block, we utilized treatment with HDACi to overcome this presumptive block. Despite expected broad effects of HDACi on the transcriptional regulation of cells, these compounds act very selectively to alter the transcription of fewer than 2% of expressed genes⁵⁵.

HDACi VPA and TSA show specific effect on the cell cycle and differentiation of ETV6/RUNX1-positive cells. The expression of differentiation markers in ETV6/RUNX1-positive cells has changed in accordance with our hypothesis (decrease of CD10, TdT,

RAG1 expression and upregulation of CD20) after HDACi administration. This clear differentiation shift was in contrast to the reaction of other leukaemia subtypes to HDACi treatment. Cell lines derived from leukaemias with aberrant tyrosine kinase fusion genes (BCR/ABL, TEL/PDFβR) underwent unspecific immunophenotype changes without a differentiation effect.

In contrast to the leukaemic cells, the administration of HDACi did not change the progress of cell cycle in the normal mature lymphocytes. Both HDACi we used decreased the number of proliferating cells in the leukaemic cell lines. TSA had a more pronounced effect with a significant shift towards apoptosis in both ETV6/RUNX1-positive and -negative cells, whereas, VPA acted differentially, arresting ETV6/RUNX1-positive cells in the G1/G0 phase of the cell cycle instead driving them to apoptosis. This result are in agreement with the previously published data suggesting that VPA preferentially acts on corepressor-associated HDACs and inhibits class I HDACs more efficiently than class II enzymes. Previous studies also showed lower toxicity of VPA to normal haematopoietic precursors³⁶.

To prove the direct effect of HDACi on ETV6/RUNX1 in the cells *in vitro*, we have chosen a previously identified target gene of RUNX1, GZMB. To our knowledge for the first time, we show a direct effect of the interaction between ETV6/RUNX1 and any of the potential target genes of RUNX1. For this purpose we have established a transient ETV6/RUNX1 expressing model to demonstrate the downregulation of GZMB in the presence of ETV6/RUNX1 protein compared to ETV6/RUNX1-negative controls. In the next logical subsequent step, we demonstrated that after the HDACi treatment, luciferase activity of pGZMB-luc increased in ETV6/RUNX1-positive model compared to the control cells transfected only with the empty vector.

Identification of ETV6/RUNX1 target genes was based on a selection of gene expression data of ALL patients and cells expressing fusion gene ETV6/RUNX1. Identification of specific genes of ETV6/RUNX1-positive phenotype was based on the analysis of specific cut-offs; the selection of genes specifically over- or under-expressed in ETV6/RUNX1-positive patients' cells was made. This group of genes was confronted with the genes, which expression had changed significantly after the treatment with HDACi. From the genes, which fulfilled these criteria of analysis we have selected 4 genes to compare the expression data from expression profiling and the data from qRT-PCR. These 4 genes were selected from the extensive list on the basis of their previously described fundamental role in the cell proliferation and the regulation of cell cycle⁵⁶⁻⁵⁹. Our results suggest that JunD, ACK1, PDGFRB and TCF4 are directly regulated by ETV6/RUNX1 fusion protein in a model system, therefore being a likely targets of RUNX1 transcription factor in B-lineage lymphopoiesis. We assume that these genes are likely to be involved in ETV6/RUNX1-driven leukaemogenesis.

HDACs are currently among the most promising targets in the drug development for cancer therapy, and first-generation HDACi are currently being tested in phase I/II clinical trials²⁹. ALL patients carrying ETV6/RUNX1 fusion have a good prognosis compared to other subgroups of childhood ALL, but relapses still occur in this group. We presume that HDACi can potentially be used in the treatment of molecular relapses or in patients with detectable residual disease in the later phases of therapy in this genotypically defined subgroup of patients. The doses of VPA we used in our study correspond to the serum concentrations of this agent in the neurological patients. The use of this agent in the human medicine predisposes VPA for the testing in the high-risk ETV6/RUNX1-positive leukaemia patients.

References

1. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:194-202.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Golub TR, McLean T, Stegmaier K, Carroll M, Tomasson M, Gilliland DG. The TEL gene and human leukemia. *Biochim Biophys Acta*. 1996;8:M7-10.
6. Kim CA, Phillips ML, Kim W, et al. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J*. 2001;20:4173-4182.
7. 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.
8. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:376-387.
9. Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia*. 1999;13:1932-1942.
10. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol*. 1996;16:1349-1355.

11. Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MV, et al. Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development*. 2002;129:2015-2030.
12. Speck NA. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:192-196.
13. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321-330.
14. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3444-3449.
15. Peterson LF, Boyapati A, Ranganathan V, et al. The hematopoietic transcription factor AML1 (RUNX1) is negatively regulated by the cell cycle protein cyclin D3. *Mol Cell Biol*. 2005;25:10205-10219.
16. Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem*. 2003;89:9-18.
17. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*. 1998;12:2392-2402.
18. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, et al. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res*. 2002;62:3904-3908.
19. Fischer M, Schwieger M, Horn S, et al. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene*. 2005;24:7579-7591.
20. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood*. 2004;103:3890-3896.
21. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:8443-8448.
22. Song H, Kim JH, Rho JK, Park SY, Kim CG, Choe SY. Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter. *Mol Cells*. 1999;9:560-563.
23. Rho JK, Kim JH, Yu J, Choe SY. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297:91-95.
24. Guidez 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.

25. Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*. 2001;20:3716-3725.
26. Uchida H, Downing JR, Miyazaki Y, Frank R, Zhang J, Nimer SD. Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene*. 1999;18:1015-1022.
27. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;93:3167-3215.
28. Meinke PT, Liberator P. Histone deacetylase: a target for antiproliferative and antiprotozoal agents. *Curr Med Chem*. 2001;8:211-235.
29. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:38-51.
30. Kutko MC, Glick RD, Butler LM, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth suppression and cell death in human rhabdomyosarcoma in vitro. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5749-5755.
31. Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell*. 1978;14:105-113.
32. Butler LM, Webb Y, Agus DB, et al. Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase. *Clin Cancer Res*. 2001;7:962-970.
33. Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, et al. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res*. 2001;61:3591-3594.
34. Insinga A, Minucci S, Pelicci PG. Mechanisms of selective anticancer action of histone deacetylase inhibitors. *Cell Cycle*. 2005;4:741-743.
35. Hiebert SW, Lutterbach B, Amann J. Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:197-200.
36. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*. 2001;20:6969-6978.
37. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001;276:36734-36741.
38. Blaheta RA, Cinatl J, Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev*. 2002;22:492-511.
39. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.

40. Cario G, Stanulla M, Fine BM, et al. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005;105:821-826.
41. Fine BM, Stanulla M, Schrappe M, et al. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004;103:1043-1049.
42. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5116-5121.
43. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:876-878.
44. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood*. 2000;96:9-23.
45. Babichuk CK, Bleackley RC, Wargnier A, et al. Mutational analysis of the murine granzyme B gene promoter in primary T cells and a T cell clone
Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *J Biol Chem*. 1997;272:18564-18571.
46. Wargnier A, Legros-Maida S, Bosselut R, et al. Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6930-6934.
47. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*. 2003;102:2951-2959.
48. 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.
49. Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Isaac S, Seto E, Hiebert SW. A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem*. 2000;275:651-656.
50. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6566-6574.
51. Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264:871-877.
52. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997;90:489-519.

53. Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *Embo J.* 1995;14:341-350.
54. Libermann TA, Pan Z, Akbarali Y, et al. AML1 (CBFalpha2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. *J Biol Chem.* 1999;274:24671-24676.
55. Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 1996;5:245-253.
56. Zhao DH, Hong JJ, Guo SY, et al. Aberrant expression and function of TCF4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Cell Res.* 2004;14:74-80.
57. Ahmed I, Calle Y, Sayed MA, et al. Cdc42-dependent nuclear translocation of non-receptor tyrosine kinase, ACK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:571-579.
58. Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, et al. Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J Biol Chem.* 2002;277:33968-33977.
59. Bjorling-Poulsen M, Seitz G, Guerra B, Issinger OG. The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 2003;23:1015-1023.

Figure 1: Detection of changes in cell cycle progress

Cell cycle was monitored 48 hours after HDACi treatment of REH, Nalm-6 and NC-NC cell lines. Cell cycle fractions are presented as a percentage of all cells.

Figure 2: Comparison of changes in gene expression and protein expression levels of TdT and RAG-1

The expression of differentiation markers was measured using flow cytometry 24 and 48 hours after the treatment with HDACi in REH cells. In the upper part of figure, dot blot images show effect of TSA (120nM, 240nM) and VPA (0.5mM, 1.0mM) after 48 hours on the expression of TdT and RAG-1. Data are presented as percentage of cells of specific quadrants. Graphs in lower part present normalized gene expression level by qRT-PCR 24 hours after incubation of REH cells with HDACi. Significance was calculated by Mann-Whitney test (* ≤ 0.05; ** ≤ 0.01).

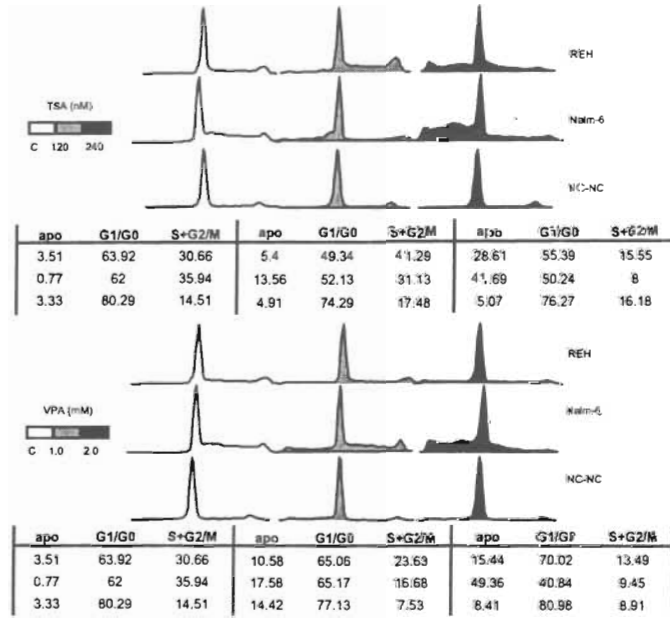
Figure 3: GZMB expression regulation by ETV6/RUNX1 chimeric transcription factor

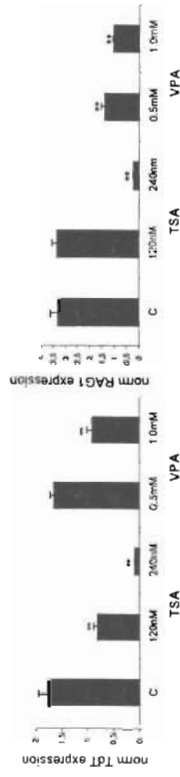
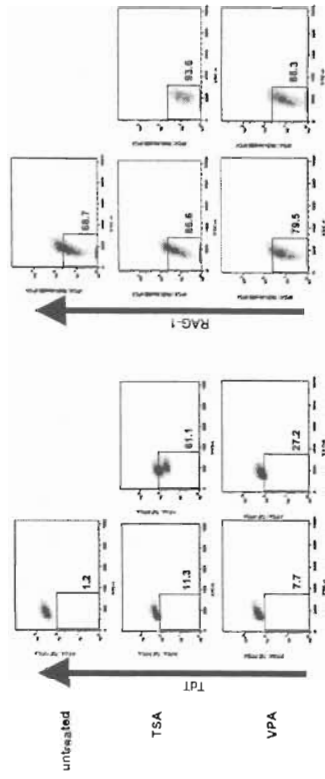
A) Normalized activities of GZMB-luc detected in HeLa cells with empty vector and cells transiently transfected with ETV6/RUNX1.

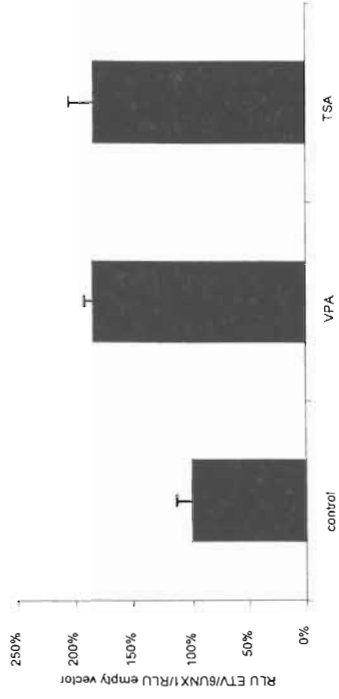
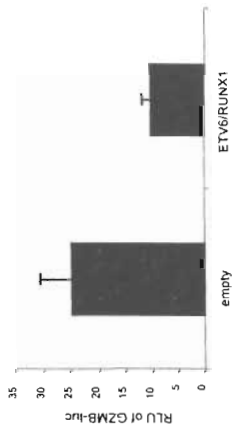
B) The ratio of RLU of GZMB-luc in HeLa ETV6/RUNX1-transfected cells to RLU of normalized GZMB-luc in HeLa control cells (empty vector) were assigned to a value of 100%. Control and ETV6/RUNX1 cells were transfected with GZMB-luc and treated with HDACi. Released repression activity of ETV6/RUNX1 protein was recalculated in percent.

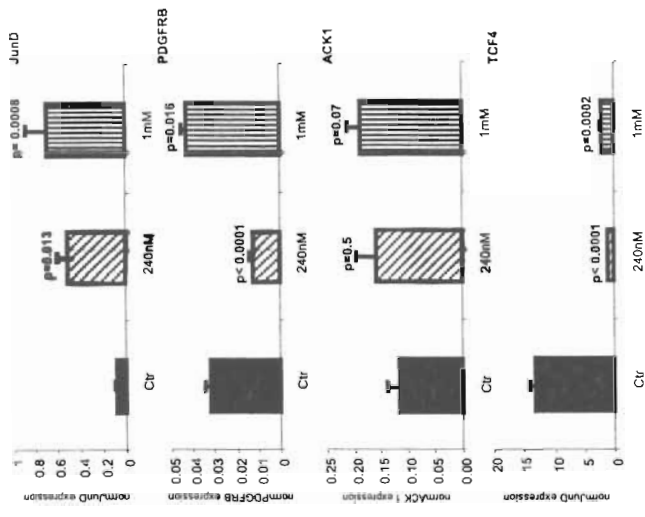
Figure 4: Analysis of gene expression of selected using qRT-PCR

Quantification of four genes selected from microarray data was performed by qRT-PCR comparing untreated and treated REH cells. Gene expression of target was normalized to β 2microglobulin as a housekeeping gene. All samples were measured in triplicates and gene expression of each replicate was detected in duplicate. P value was calculated from mean of ratio of selected gene to β 2m of every replicates with absolute error.









cells	time	drug	CD10	CD20	CD19	TdT	RAG1
REH	24 hours	Cont.	1,00±0,03	1,00±0,10	1,00±0,02	1,00±0,02	1,00±0,13
		VPA	0,76±0,07	1,47±0,1	0,77±0,04	0,43±0,09	0,7±0,06
		TSA	0,6±0,04	2,18±0,46	0,6±0,01	0,45±0,05	0,83±0,16
	48 hours	Cont.	1,00±0,02	1,00±0,05	1,00±0,02	1,00±0,01	1,00±0,00
		VPA	0,88±0,02	0,98±0,03	0,84±0,05	0,44±0,05	0,57±0,02
		TSA	0,63±0,09	0,85±0,04	0,28±0,02	0,25±0,08	0,38±0,02
Nalm-24	24 hours	Cont.	1,00±0,02	1,00±0,03	1,00±0,02	1,00±0,11	
		VPA	0,79±0,01	1,12±0,11	0,8±0,04	0,75±0,07	
		TSA	0,62±0,01	0,69±0,02	0,7±0,01	0,57±0,06	
	48 hours	Cont.	1,00±0,12	1,00±0,07	1,00±0,02	1,00±0,14	
		VPA	0,70±0,03	0,52±0,02	0,69±0,00	0,72±0,04	
		TSA	0,56±0,03	0,43±0,17	0,44±0,02	0,28±0,02	

NAME	t xx	t yy	closeness	median C	median VPA	VPA-C	p(VPA/C) ¹
BSPRY	9,09	92,86	0,60	-0,82	0,41	1,23	0,0074
ACK1	27,27	100,00	0,20	-0,79	0,25	1,04	0,0054
ANTXR2	10,00	81,25	0,32	-0,25	1,33	1,58	0,0140
ITM2C	0,00	68,75	0,57	-1,50	0,52	2,02	0,0141
CXXC5	18,18	81,25	0,12	-0,02	0,96	0,98	0,0063
AHI1	9,09	71,43	0,13	-0,20	0,72	0,92	0,0097
ARD1	9,09	68,75	0,30	-0,49	0,25	0,74	0,0114
PAK1	0,00	56,25	0,36	-0,28	1,06	1,34	0,0012
NID67	18,18	73,33	0,49	-1,06	1,26	2,32	0,0018
PDGFRB	0,00	53,33	0,05	-0,81	1,58	2,39	0,0112
RNF144	10,00	62,50	0,06	-0,03	0,54	0,57	0,0079
FLJ00012	20,00	68,75	0,62	-1,32	0,62	1,94	0,0024
C14orf101	45,45	93,75	0,22	-0,60	0,01	0,61	0,0103
Similar to peptidylprolyl isomerase A (LOC402673)	54,55	100,00	0,10	-0,32	0,45	0,77	0,0017
AI302216	18,18	62,50	0,18	-0,24	0,43	0,67	0,0117
AA252394	50,00	93,33	0,24	-0,24	0,49	0,73	0,0054
CDNA FLJ10641 fis, clone NT2RP2005748	22,22	64,29	0,32	-0,42	0,65	1,07	0,0104
N24645	9,09	50,00	0,06	-0,26	0,47	0,73	0,0125
WDR7	45,45	84,62	0,43	-0,91	-0,16	0,75	0,0150
CDNA FLJ45905 fis, clone OCBBF3026576	45,45	84,62	0,08	-0,31	0,61	0,92	0,0103
HRMT1L1	36,36	75,00	0,47	-0,34	0,34	0,68	0,0032
TNFRSF5	20,00	53,33	0,28	-0,05	0,32	0,37	0,0079
MGMT	0,00	33,33	0,12	-0,36	0,70	1,06	0,0123
ATRX	45,45	73,33	0,08	-0,20	0,38	0,58	0,0022

¹ **t xx** – cut-off for each gene in ETV6/RUNX1-positive patients; **t yy** – cut-off for each gene in ETV6/RUNX1-negative patients; “**closeness**” is a relative gene expression similarity between ETV6/RUNX1-positive patients’ samples and ETV6/RUNX1-positive cell line (see also the text); **median C** is the median expression level in untreated ETV6/RUNX1-positive cells, **median VPA** is the median expression level in VPA-treated ETV6/RUNX1-positive cells; **VPA-C** is a difference between median C and median VPA with a p value.

Příloha 4:

Trka J, Zuna j, Hrušák O, Zemanová Z, Mužiková K, Kalinová M, Zörnerová T, Brabencová A, Madžo J, Krejčí O, Starková J, Pončáková I, Šrámková L, Poloučková A, Hölzelová E, Horák J, Starý J. (2003) *Hybridný gen TEL/AML1 asociovaný s akutní leukémií vzniká v průběhu normálního fetálního vývoje a je detekovatelný v pupečnickových krvích zdravých novorozenců. Československá pediatrie;58(8):471-477*

Hybridní gen TEL/AML1 asociovaný s akutní leukémií vzniká v průběhu normálního fetálního vývoje a je detekovatelný v pupečnickových krvích zdravých novorozenců

Trka J.^{1,2}, Zuna J.^{1,2}, Hrušák O.^{1,3}, Zemanová Z.⁴, Mužíková K.^{1,2}, Kalinová M.^{1,2}, Zörnerová T.^{1,2}, Brabencová A.^{1,2}, Madžo J.^{1,2}, Krejčí O.^{1,2}, Starková J.^{1,2}, Pončáková I.², Šrámková L.^{1,2}, Poloučková A.^{1,3}, Hölzelová E.^{1,3}, Horák J.⁵, Starý J.²

CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague)¹

II. dětská klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha²

přednosta prof. MUDr. J. Vavřínek, DrSc.

Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol, Praha³

přednostka prof. MUDr. J. Bartůňková, DrSc.

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha⁴

přednosta prof. MUDr. T. Zima, DrSc.

Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha⁵

přednosta doc. MUDr. L. Rob, CSc.

Souhrn

Hypotéza, že (pre-)leukemický klon buněk dětské akutní lymfoblastické leukémie může vznikat v průběhu prenatálního života, byla nedávno potvrzena. Důkazy byly podány pomocí studií klonality u leukémií monozygotních dvojčat a v několika případech pomocí zpětného sledování markeru leukemických buněk do materiálu pocházejícího z perinatálního období života pacientů. Tyto nálezy potvrzují vícezářahový model vzniku leukémie a kladou okamžik prvního zásahu (alespoň u některých typů leukémií) do prenatálního života. Autoři se ve studii zaměřili na detekci mRNA hybridního genu TEL/AML1, který je nalézán téměř u čtvrtiny všech dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a jehož vznik by mohl být důsledkem tohoto prvního zásahu. Vyšetřili celkem 298 vzorků pupečnickové krve zdravých novorozenců a celkem v 8 případech (<3 %) prokázali pozitivitu TEL/AML1 pomocí (kvantitativní) reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce. Pozitivitu našli také v jedné z 12 vyšetřených fetálních hemopoetických tkání. V jednom případě přítomnost fúze TEL/AML1 potvrdili i pomocí fluorescenční in situ hybridizace. In vitro experimenty na buňkách buněčných linií a zdravých dárců neprokázaly, že by fúze TEL/AML1 mohla vznikat arteficiálně jako důsledek apoptózy v již odebraném vzorku. Tyto výsledky potvrzují, že buňky nesoucí hybridní gen TEL/AML1 jsou v organismu dětí přítomny již při narození, a to ve frekvenci minimálně 40krát vyšší, než je celková kumulativní pravděpodobnost, že kterékoli z těchto dětí onemocní kdykoli v průběhu života TEL/AML1 pozitivní leukémií.

Klíčová slova: dětská akutní lymfoblastická leukémie, pupečnicková krev, TEL/AML1

Summary

Acute Leukaemia Associated Hybrid Gene TEL/AML1 is Generated During Normal Foetal Development and Can Be Detected in Cord Blood of Healthy Newborns

Pre-natal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children has been recently confirmed. The evidence comprises the clonality studies of concordant leukaemias in monozygotic twins and several cases of backtracking of leukaemic cell markers back to the material from the peri-natal period of life. These findings confirm that more events are necessary for the origin of acute leukaemia and lay the first event into the period of pre-natal life at least in some types of leukaemia. This study concentrated on the detection of mRNA of the TEL/AML1 hybrid gene that is found in almost one quarter of all patients with acute lymphoblastic leukaemia. The origin of TEL/AML1 was recently attributed to the first leukaemogenic event. Authors analysed a total of 298 cord blood samples from healthy newborns and in 8 cases they identified TEL/AML1 positivity using (quantitative) reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Authors found positivity also in one of 12 foetal haematopoietic tissues tested. In one case, they confirmed TEL/AML1 positivity by fluorescent in situ hybridisation. In vitro experiments using cell lines and healthy donors cells did not confirm the hypothesis that TEL/AML1 fusion can originate due to apoptogenic stimuli during the period between the samples were taken and processed. These results demonstrate that TEL/AML1-positive cells can be detected at birth and that the frequency of this finding is forty times higher than total cumulative probability for these children to develop TEL/AML1-positive leukaemia.

Key words: paediatric acute lymphoblastic leukaemia, cord blood, TEL/AML1

T.

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku. Přestože prognostické faktory jsou dobře známé a léčba ALL má vysokou úspěšnost (14), víme relativně málo o okolnostech a době vzniku této nemoci. Předpokládá se, že pro naprostou většinu subtypů ALL platí dvou- nebo vícezáhová teorie vzniku leukemického klonu (8). O okamžiku, ve kterém dojde k prvnímu zásahu, vedoucímu ke vzniku pre-leukemického klonu, bylo donedávna možno jen spekulovat. Případy novorozeneckých či vrozených leukémií však potvrzovaly, že leukemogeneze nebo alespoň její část může proběhnout již *in utero*. První přímý důkaz o prenatálním původu akutní leukémie u dětí přinesli v roce 1993 Ford se spolupracovníky (5). Analyzovali 3 případy koncordantních leukémií u monozygotních dvojčat a na základě identických přestaveb genu MLL u jednotlivých dětí v každém páru dospěli k závěru, že leukémie dvojčat mají společný klonální původ. Hypotéza, že (pre-)leukemický klon vzniká v organismu jednoho dvojčete a do druhého je přenesena cestou intraplacentárních anastomóz, byla později potvrzena řadou podobných publikovaných případů (1, 4, 7, 11, 22). Podle těchto prací se prenatální původ ALL monozygotních dvojčat neomezuje na novorozenecký a kojenecký věk: Wiemelsova práce dokládá devítiletou latenci mezi vznikem leukémie u jednoho a druhého dvojčete (22).

Budeme-li tedy považovat za prokázanou teorii o prenatálním vzniku dětské ALL (alespoň u části případů), můžeme očekávat, že leukemický nebo pre-leukemický klon bude v malém množství u některých dětí detekovatelný již při narození. Tento závěr potvrzují i dosud publikované výsledky studií tzv. zpětného sledování leukemických buněk neboli „backtrackingu“. Tato metodika, poprvé použitá Gale a spolupracovníky (6), využívá ke zpětné detekci markeru leukemického klonu materiál odebraný dítěti krátce po narození a poté dlouhodobě archivovaný: kapku krve určenou primárně pro screening metabolických vad na tzv. Guthrieho kartě. Gale uplatnila tuto metodu u 3 kojeneckých pacientů a u všech prokázala přítomnost buněk nesoucích aberaci typickou pro leukemické buňky v DNA z Guthrieho karty. Další práce, které tuto metodiku využily s různými druhy markerů (leukemogenní hybridní geny, přestavby imunoreceptorových genů), potvrdily u části vyšetřených pacientů prenatální původ jejich onemocnění (3, 6, 12, 21-23).

Protože prenatální původ byl prokázán také u řady případů TEL/AML1 pozitivní ALL, zaměřili jsme se právě na tento gen. Hybridní gen TEL/AML1 vzniká důsledkem translokace t(12;21)(p13;q22) a nachází se u téměř čtvrtiny dětských pacientů s ALL (16). Je tak vůbec nejčastější chromosomální aberací u dětských leukémií a považuje se za prognosticky příznivou známku (15, 24). Právě vysoká frekvence této aberace a prokázaný prenatální původ některých případů TEL/AML1 pozitivní ALL, spolu s relativně jednoduchou metodikou detekce mRNA tohoto genu, nás vedly k prezentované studii.

Rozhodli jsme se pátrat v pupečnickových krvích velkého počtu zdravých novorozenců po přítomnosti fúzního transkriptu TEL/AML1. Naše hypotéza vycházela z toho, že vznik translokace t(12;21) a tím i hybridního genu TEL/AML1 je primární událostí, která vede ke vzniku (pre)leukemického klonu. Ten je v organismu přítomen až do doby, kdy proběhne další leukemogenní událost a vznikne

definitivní leukemický klon. Tato druhá leukemogenní událost zřejmě již bezprostředně předchází vlastní diagnózu leukémie a u TEL/AML1 pozitivních ALL proběhne většinou v předškolním věku (16). Prenatální původ TEL/AML1 pozitivní ALL byl však prokázán i u pacienta, u kterého byla leukémie diagnostikována až ve 14 letech věku (22). U pacientů nad 18 let je však již tento typ ALL extrémně vzácný.

Tato fakta naznačují, že nedojde-li ke druhé události v určitém věkovém rozmezí, její pravděpodobnost se významně snižuje. Za takovýchto podmínek není vyloučené, že v některých případech k této události nedojde vůbec a od narození přítomné TEL/AML1 pozitivní buňky u takovýchto dětí samy o sobě nikdy leukémií nevyvolají. Předběžné výsledky naší studie potvrdily, že mRNA hybridního genu TEL/AML1 je skutečně možno detekovat v pupečnickových krvích zdravých novorozenců (17, 19). Současně s námi pracuje na stejné problematice skupina prof. Greaves (Leukaemia Research Fund Centre for Cell and Molecular Biology, Institute of Cancer Research, Londýn, Velká Británie). Vzhledem k tomu, že ve Velké Británii už existovala banka pupečnickových krví určená výhradně pro vědecké účely, mohla tato skupina prioritně prokázat přítomnost transkriptu translokace t(12;21) v 1 % normálních pupečnickových krví nejen metodou molekulárně genetickou, ale i pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (13).

Téměř současně se ale objevila zpráva, že hybridní gen TEL/AML1 může vznikat důsledkem apoptotických změn v buňkách - a to jak v *in vitro* podmínkách při arteficiální apoptogenní stimulaci (např. hladověním), tak i *in vivo* při febrilních nemaligních stavech (2). Proto jsme rozšířili naši analýzu pupečnickových krví o řadu *in vitro* experimentů na buňkách zdravých dobrovolníků i buněčných linií a vyšetření dětí s febrilními stavy.

Cílem studie bylo potvrzení přítomnosti mRNA hybridního genu TEL/AML1 v pupečnickových krvích, ověření přítomnosti translokace t(12;21) pomocí FISH, stanovení frekvence tohoto fenoménu a testování potenciálního arteficiálního vzniku této translokace vlivem apoptogenní stimulace. Využili jsme kromě klasické metodiky reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) také moderní technologii kvantitativní RT-PCR v reálném čase (RQ-RT-PCR).

Materiál a metody

Pupečnickové krve a fetální hemopoetické tkáně

Analyzovali jsme celkem 3 série normálních pupečnickových krví (PUK) odebraných na Gynekologicko-porodnické klinice FN Motol. Krve byly shromážděny přísně anonymně a s informovaným souhlasem rodiček. První série (A) zahrnovala celkem 149 PUK, druhá série (B) 94 PUK a třetí (C) 55 PUK. Všechny PUK byly zpracovány do 24 hodin od přijetí materiálu. Dále jsme analyzovali 10 vzorků tkáně jater z potracených plodů a vzorek tkáně sleziny a jater z dalšího potraceného plodu (29. gestační týden, sepeš).

Periferní krev dětí s febriliemi

Vyšetřili jsme také s informovaným písemným souhlasem vzorky 30 dětských pacientů, přijatých na II. dětskou kliniku s nemaligním horečnatým onemocněním (teplotou v okamžiku odběru vyšší než 38 °C).

Buněčné linie a polyklonální kontroly

Pro *in vitro* experimenty jsme použili jaderné buňky periferní krve zdravých dobrovolných dárců a buňky buněčných linií REH a K562.

Vzorky kostní dřeně pacientů s non-TEL/AML1 ALL

Retrospektivně jsme vyšetřili vzorky kostní dřeně 23 pacientů s non-TEL/AML1 ALL v remisi onemocnění. Jednalo se o odběry před Protokolem M (ALL BFM-95).

Protikontaminační opatření

Přestože i při běžném provozu klademe velký důraz na opatření proti tzv. „carry-over“ kontaminaci, v případě analýzy PUK jsme zavedli ještě další speciální postupy. Série B a C (viz dále) byly zpracovány v nových laboratořích, kde do té doby nikdo nepracoval se vzorky pacientů s leukémiemi, které by mohly být potenciálním zdrojem kontaminací. Negativní kontroly byly zahrnuty do všech kroků a v sériích B a C byla pozitivní kontrola pro PCR vysoce nařaděna ($\sim 10^5$). Tato kontrola byla přidána v oddělené místnosti po uzavření všech reakčních zkumavek se vzorky PUK. V sérii B byla navíc jako kontrola pro PCR použita cDNA s méně častým typem fúze TEL/AML1 (exon 5 genu TEL - exon 3 genu AML1), kterou jsme dosud identifikovali pouze u dvou pacientů s ALL ze 73 pozitivně testovaných.

Použili jsme nové pipety, centrifugu a další vybavení; chemikálie a reagenty byly připraveny a uloženy odděleně od ostatních.

Izolace jaderných/mononukleárních buněk

Buňky byly z kostní dřeně/periferní krve izolovány pomocí centrifugace na hustotním gradientu (Ficoll Paque, Pharmacia, Uppsala, Švédsko) nebo osmotickou lýzou. Počet živých buněk pro experimenty byl počítán ve světelném mikroskopu pomocí trypanové modři.

Magnetická separace buněk (MACS)

Pro účely MACS separace byl celý objem mononukleárních buněk získaných ze vzorku PUK rozdělen na dvě identické části a ty byly podrobeny sortování na CD19⁺ a CD34⁺ frakce pomocí zařízení MiniMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, SRN) a magnetických značených kuliček anti-CD19 a anti-CD34. Účinnost separace jsme v počátečních experimentech ověřovali pomocí průtokové cytometrie, později rutinně ověřována nebyla.

Extrakce RNA

RNA byla extrahována pomocí upravené jedнокrokové metody Chomczynskiho & Sacchi (9). Úprava množství buněk, ze kterého byla RNA izolována, zaručovala, že v jedné PCR reakci byla amplifikována cDNA alespoň z $2,2 \times 10^5$ neseptovaných buněk.

Extrakce DNA

DNA byla extrahována pomocí QIAamp DNA Blood kitu (QIAGEN, Hilden, SRN) a její množství a čistota byly ověřeny na spektrofotometru.

Příprava cDNA

Použili jsme náhodné hexametry a reverzní transkriptázu MMLV (Gibco BRL - Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) a postupovali přesně podle návodu výrobce.

Amplifikace TEL/AML1 cDNA (RT-PCR)

Klasickou dvoukolovou PCR detekci transkriptu TEL/AML1 jsme prováděli tak, jak jsme popsali dříve (24). Citlivost metody dosahovala 10^4 až 10^5 TEL/AML1 pozitivních buněk, jak jsme ověřili pomocí diluční řady.

Kvantitativní detekce TEL/AML1 cDNA (RQ-RT-PCR)

Primery a sondy byly připraveny ve spolupráci s firmou TIB Molbiol (Berlín, SRN). Amplifikační systém zahrnuje exon 5 genu TEL a exon 3 genu AML1. Sonda byla hydrolyzační, značená FAM/TAMRA (reporter/quencher) a ke kvantitativní detekci byl použit přístroj pro „real-time“ PCR ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Pro zvýšení citlivosti jsme testovali využití amplifikátu prvního kola klasické RT-PCR jako templátu pro RQ-RT-PCR ve srovnání s jedнокolovou RQ-RT-PCR. Experimenty prokázaly mírně vyšší citlivost dvoukolové modifikace a ta byla nadále používána s výjimkou screeningu, kde jsme z antikontaminačních důvodů i nadále používali jedнокolovou reakci. Citlivost obou metod standardně přesahovala 10^3 při jedнокolové a 10^6 při dvoukolové amplifikaci.

Sekvenční analýza

Produkty PCR byly před sekvenací na přístroji ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vyříznuty z gelu a purifikovány pomocí Qiagen (Hilden, SRN). Sekvence byly analyzovány pomocí softwaru Vector NTI 8 Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA).

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Analýza interfázních jader byla prováděna pomocí dvoubarevné translokační sondy LSI TEL/AML1 ES od firmy Vysis (Downers Grove, IL, USA) pro detekci fúzního genu TEL/AML1.

Apoptogenní stimulace

K vyvolání apoptózy *in vitro* jsme využili kultivaci buněk v médiu bez fetálního séra (RPMI/FCS-) nebo jednonutinového ozáření UV. Nestimulovanou apoptózu vznikající při opožděném zpracování vzorku jsme simulovali ponecháním vzorků buněk zdravých dobrovolníků a buněčné linie K562 při pokojové teplotě 0-72 hodiny.

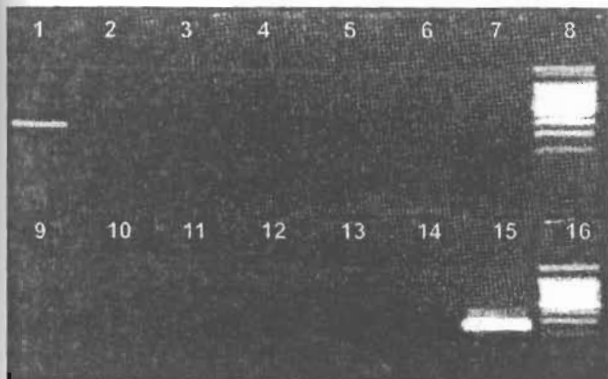
Analýza životnosti buněk

Pro detekci a kvantitativní stanovení apoptózy jsme použili Annexin-V-FLUOS kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN). Postupovali jsme podle firmního protokolu.

Výsledky

Přítomnost transkriptu TEL/AML1 v pupečnickových krvích

V sérii A jsme detekovali přítomnost TEL/AML1 cDNA ve třech ze 149 vyšetřených vzorků PUK pomocí klasické dvoukolové RT-PCR (obr. 1). Přímé sekvenování potvrdilo, že se jedná o klasickou fúzi TEL/AML1, při které je exon 5 genu TEL fúzován s exonerem 2 genu AML1. Tato varianta se vyskytuje v naprosté většině leukemických buněk pacientů s TEL/AML1 pozitivní ALL.

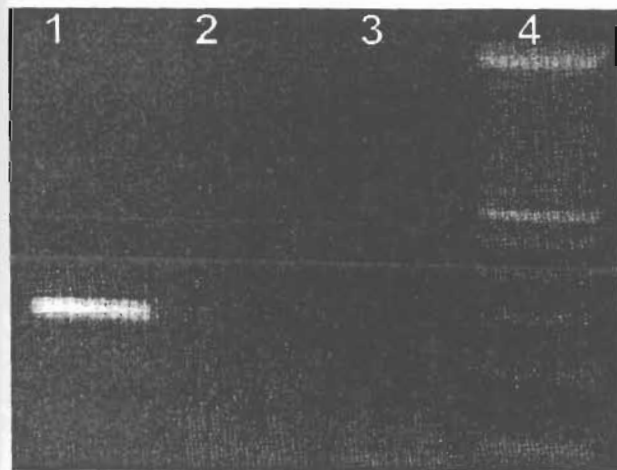


Obr. 1. Příklad pozitivního nálezu transkriptu TEL/AML1 cDNA v PUK pomocí klasické RT-PCR. V dráze číslo 1 je pozitivní PUK, v dráze číslo 15 pozitivní kontrola (cDNA pacienta s TEL/AML1 pozitivní leukémií), velikost obou produktů je 269 párů bází (bp).

Fig. 1. An example of positive finding of the TEL/AML1 cDNA transcript in cord blood (CB) by a classical RT-PCR. In the lane No 1 positive CB, in the lane No 15 positive control (cDNA of a patient with TEL/AML1 positive leukaemia), the size of both products is 269 base pairs (bp).

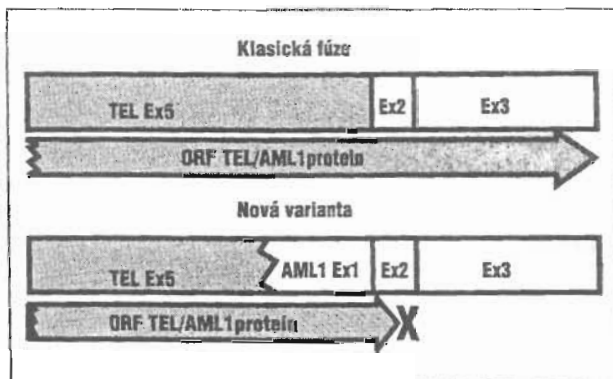
Všech 19 vzorků, obohacených o CD19+ buňky pomocí MACS separace, bylo negativních.

Z 94 dostupných vzorků v sérii B, které byly MACS separovány do CD19+/- a CD34+/- frakcí, bylo pouze v 78 dostatečné množství buněk pro extrakci RNA ve všech čtyřech frakcích. V jednom z nich jsme v CD19 obohacené frakci identifikovali pomocí klasické dvoukolové RT-PCR produkt, který velikostí neodpovídal klasické TEL/AML1 fúzi (obr. 2). Sekvenční analýza odhalila, že hybridní cDNA je tvořena neúplným exonem 5 genu TEL připojeným k exonu 1 genu AML1. Tato varianta fúze vede ke vzniku stop kodonu v exonu 2 genu AML1 a tím k translaci předčasně ukončeného hybridního proteinu TEL/AML1 (obr. 3).



Obr. 2. RT-PCR vyšetření jediného pozitivního vzorku v sérii B. Produkt je jiné velikosti (319 bp) než klasická fúze TEL/AML1 (269 bp), což potvrdila i sekvenční analýza. Přítomnost atypické fúze, navíc s posunem čtecího rámce, vylučuje možnost kontaminace. Sporný je ale biologický význam fúze vedoucí k nefunkčnímu, zkrácenému proteinu.

Fig. 2. RT-PCR examination of the only one positive sample in the B series. The product size is different (319 bp) than the classical fusion TEL/AML1 (269 bp), as also confirmed by sequence analysis. The presence of an atypical fusion, also with the frameshift, excludes a possibility of contamination. The biological significance of the fusion, leading to non-functional, shorter protein, is questionable.



Obr. 3. Schéma představuje „novou“ variantu fúze u PUK z obrázku 2 a ukazuje polohu stop kodonu vzniklého posunem čtecího rámce (ORF).

Fig. 3. The diagram represents a „new“ variant of the fusion in CB from Fig. 2 and shows the position of the stop codon produced by open reading frame (ORF).

Pokusili jsme se neúspěšně prokázat s použitím specifických primerů přítomnost této fúze na úrovni genomové DNA.

Metodou I-FISH jsme analyzovali celkem 3×10^3 jader v tomto pozitivním vzorku PUK a TEL/AML1 fúzi jsme detekovali ve třech z nich (obr. 4). V kontrolním vzorku kostní dřeně jsme žádné pozitivní jádro nenalezli (celkem analyzováno 5×10^3 jader). Jeden pozitivní signál jsme ale detekovali také v kontrolním vzorku PUK, který byl RT-PCR negativní.

Všechny vzorky série C byly MACS separovány do CD19+/- a CD34+/- frakcí. Všechny frakce byly vyšetřeny pomocí jednokolové RQ-RT-PCR v triplikátu. Celkem 4 vzorky byly reprodukovatelně pozitivní na hladinách odpovídajících $2,2 \times 10^{-5}$ - 7×10^{-6} leukemických buněk (obr. 5). Jednalo se o CD34- a CD19- frakce.

Přítomnost transkriptu TEL/AML1 ve vzorcích fetálních hemopoetických tkání

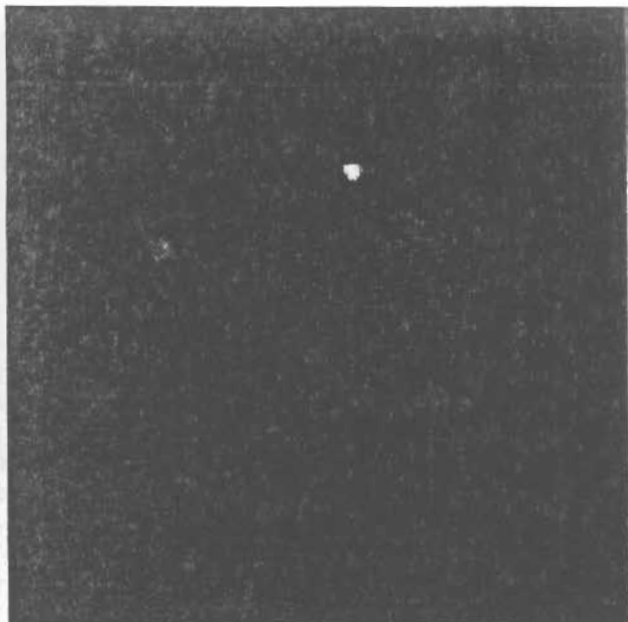
Vyšetřili jsme celkem 10 vzorků jaterní fetální tkáně pomocí RT-PCR s negativním výsledkem. Ve vzorku tkáně sleziny plodu spontánně potraceného v 29. týdnu gestace jsme reprodukovatelně prokázali pozitivitu TEL/AML1. Zajímavé je, že ve dvou ze tří paralelně vyšetřovaných alikvotů tkáně jsme našli pouze kratší hybridní cDNA (fúze exonu 5 genu TEL a exonu 3 genu AML1). Protože kontrola v tomto případě - stejně jako naprostá většina leukemických pacientů (viz výše) - obsahovala variantu s převažujícím větším transkriptem (exon 5 genu TEL fúzován s exonem 2 genu AML1), tento nálezu vylučuje možnost kontaminace (viz obr. 6).

Detekce transkriptu TEL/AML1 ve vzorcích non-TEL/AML1 ALL

Všech 23 vyšetřených vzorků bylo negativních v klasické dvoukolové RT-PCR. Všechna vyšetření byla provedena v triplikátu.

Detekce transkriptu TEL/AML1 po apoptogenní stimulaci

Při simulaci přirozeně vznikající apoptózy (stání v pokojové teplotě 0-72 hodiny) na vzorcích buněk dvou zdravých dárců a buněčné linie K562 nebyly detekovány stopy transkriptu TEL/AML1. Skutečné množství apoptotických buněk jsme v tomto experimentu nestanovovali.



Obr. 4. FISH analýza pozitivního vzorku PUK. Zelený signál představuje normální TEL gen, větší červený signál normální gen AML1, menší červený signál zbytek materiálu z translokovaného genu AML1 a zeleno-červeně-žlutý signál fúzi TEL/AML1. Použití tohoto typu sondy vylučuje falešnou pozitivitu vzniklou náhodným překrytím chromosomu v jádře.

Fig. 4. FISH analysis of a positive CB sample. The green signal represents a normal TEL gene, the larger red signal is the normal AML1 gene and the green-red-yellow signal represents the TEL/AML1 fusion. The use of this type of probe precludes a false positivity originated by a random overlap of chromosomes in the nucleus.

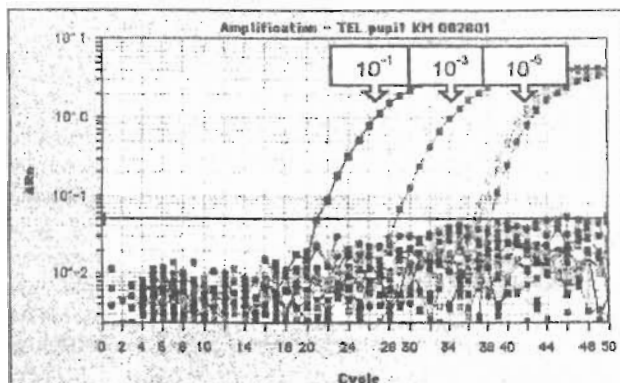
Vyšetřili jsme v triplikátu vzorky 30 dětí s horečnatým nemaligním onemocněním. V jednom vzorku jsme detekovali transkript TEL/AML1, ale opakovaný experiment s nově extrahovanou RNA z téhož vzorku tuto pozitivitu nepotvrdil.

Vyšetřovali jsme vzorky normálních krevních jaderných buněk 4, 8, 12, 24 a 36 hodin od zahájení apoptogenní stimulace (UV nebo RPMI/FCS-). Maximum apoptotických buněk jsme detekovali po 4 hodinách v obou systémech. Vzorky byly potom v triplikátu vyšetřeny standardní RT-PCR. Nede- tekovali jsme žádnou reprodukovatelnou TEL/AML1 pozitivitu.

Diskuse

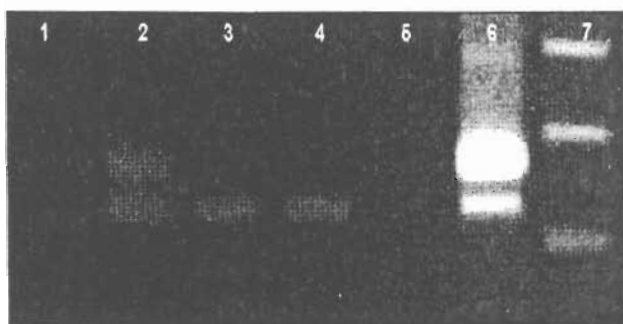
Od doby, kdy byly přineseny první důkazy o prenatalním původu dětské ALL (5), se nabízí otázka, u jak vysokého procenta dětí jsou leukemické (nebo alespoň potenciálně leukemogenní) buňky přítomny již při narození. Další navazující otázkou je, zda tyto buňky jsou detekovatelné již krátce po narození a pokud ano, zda je lze nalézt se stejnou nebo větší frekvencí, než je frekvence příslušného druhu dětské leukémie.

Nejdříve se pozornost soustředila na gen MLL/AF4, jehož přítomností je charakterizována novorozenecká a kojenecká ALL. Jediná zpráva o nález MLL/AF4 pozitivních buněk u velkého počtu zdravých novorozenců a pacientů s non-MLL/AF4 pozitivní leukémií (20) byla zpochybněna metodicky i fakticky (10, 18). Pozornost se potom soustředila na



Obr. 5. Ukázka RQ-RT-PCR analýzy. Šipky označují amplifikační křivky diluční řady TEL/AML1 pozitivní linie REH (10^{-1} značí ředění TEL/AML1 pozitivních buněk v poměru 1:10; 10^{-3} = 1:10³; 10^{-5} = 1:10⁵). Zelená a červená křivka jsou pozitivní PUK.

Fig. 5. An example of RQ-RT-PCR analysis. The arrows mark amplification curves of the TEL/AML1 dilution curve of the REH positive line (10^{-1} delineates dilution of the TEL/AML1-positive cells in the ratio 1:10; 10^{-3} = 1:10³, 10^{-5} = 1:10⁵). The green and red curves represent positive CB.



Obr. 6. Vyšetření jater a sleziny potraceného plodu pomocí RT-PCR. Jaterní tkáň je negativní (dráha 1), dráhy 2-4 obsahují amplifikát slezinné tkáně. Alikvoty ve třetí a čtvrté dráze obsahují pouze kratší variantu fúze TEL/AML1, zatímco v prvním alikvotu (dráha 2) a pozitivní kontrole (cDNA pacienta s TEL/AML1 pozitivní leukémií) (dráha 6) se amplifikují obě varianty. V pozitivní kontrole významně převažuje varianta větší, což prakticky vylučuje kontaminaci do alikvotů 3 a 4.

Fig. 6. The examination of the liver and spleen of an aborted foetus by RT-PCR. The liver tissue is negative (lane 1), the lanes 2-4 contain an amplified sample of the spleen tissue. The aliquots in the lane 3 and 4 contain only a shorter variant of the TEL/AML1 fusion, whereas in the first aliquot (lane 2) and in the positive control (cDNA of a patient with TEL/AML1-positive leukaemia) (lane 6) both variants are amplified. In the positive control the larger variant significantly prevails, which virtually rules out a contamination into aliquots 3 and 4.

méně agresivní subtypy leukémie s prokázáním prenatalním původem a molekulárním markerem, zejména na TEL/AML1 pozitivní ALL. Z experimentů využívajících „backtracking“ se dá odvodit, že frekvence buněk leukemického (nebo preleukemického) klonu je v materiálu získaném z Guthrieho karet $\leq 10^{-3}$ (6). Detekce těchto velmi vzácných buněk v pupečnickových krvích je komplikována faktem, že na rozdíl od „backtrackingu“ nemáme k dispozici klonálně specifickou sekvenci a nemůžeme zvýšit citlivost a specificitu vyšetření využitím specifického primeru. Navíc v případě nález transkriptu TEL/AML1 pomocí RT-PCR nebo RQ-RT-PCR v podstatě neexistuje možnost, jak prokázat, že se nejedná o kontaminaci TEL/AML1 pozitivním materiálem (např. kontrolní cDNA

PCR reakci) nebo produktem PCR jiných vzorků, se kterými v laboratoři pracovalo. Protože množství templátu přítomné ve vzorku je velmi malé, není možno očekávat ani stoprocentní reproduibilitu vyšetření.

Na stejném problému jako naše skupina současně pracuje laboratoř prof. Greavesa z Londýna. Ta využila existující české banky pupečnickových krví, díky které u vzorků, které vyšly ve screeningu TEL/AML1 pozitivní, bylo možno analyzovat větší množství materiálu a provést cílenou separaci pomocí FACS nebo MACS (13). Na tomto materiálu pak bylo možno specificitu vyšetření potvrdit pomocí FISH analýzy. Zajímavé je, že Greavesova skupina TEL/AML1 pozitivitu prokázala kromě nefrakcionované PUK také v CD19+, CD34+, ale také CD10-/19+/ κ/λ frakci. To znamená, že TEL/AML1 pozitivní mohou být také zralé B buňky, ze kterých nikdy nevzniká TEL/AML1 pozitivní leukémie.

Celková frekvence TEL/AML1 pozitivních PUK je mírně vyšší v našem souboru než v publikované Moriho studii (13). Tento fakt ale může být způsoben celkově relativně malým počtem vyšetřených PUK v obou studiích (vzhledem k frekvenci pozitivních nálezů). Také fakt, že nacházíme TEL/AML1 pozitivní buňky v CD19- a CD34- frakcích může vycházet z toho, že jsme analyzovali celkově menší množství materiálu v jednotlivých PUK a tím se oslabil efekt magnetické separace na úkor větší buněčnosti negativních frakcí. Na druhé straně je teoreticky možné, že TEL/AML1 pozitivní buňky se neomezují na CD19+/34+ frakce, ale mohou se vyskytnout v neočekávaných vývojových typech B buněk.

Celkově ale naše i Moriho výsledky potvrzují, že TEL/AML1 pozitivní buňky jsou detekovatelné v krvi již krátce po narození a že tedy pocházejí z prenatálního období života. Frekvence těchto nálezů v PUK je minimálně 40krát větší, než je celková kumulativní pravděpodobnost, že některé z těchto dětí kdykoli v průběhu života onemocní TEL/AML1 pozitivní leukémií. Jinými slovy, nález TEL/AML1 pozitivních buněk vzniklých v prenatálním období života nedeterminuje nutně ke vzniku leukémie. Nález fúze TEL/AML1 pomocí FISH i v PUK, která byla RT-PCR negativní, může napovídat, že hraniční pozitivita může být přítomna dokonce ještě častěji a že jedna z detekčních metod může při těchto hraničních nálezech selhat. Nejasnosti týkající se konkrétních frakcí TEL/AML1 pozitivních buněk zasluhují další studium. Prioritní je nález reprodukovatelné TEL/AML1 positivity ve fetální slezinné tkáni, který by mohl napovědět o místu a času vzniku TEL/AML1 pozitivního klonu.

Naše experimenty nepotvrdily údaje publikované Eguchi-Ishimaem et al. o častém specifickém vzniku t(12;21) na základě apoptogenní stimulace (2). Pokud by *in vitro* experimenty prokázaly spontánní vznik (pro leukemické buňky typického) hybridního genu TEL/AML1, představovalo by to jednoduché vysvětlení pro nález TEL/AML1 pozitivních buněk v různých biologických materiálech. Apoptóza iniciovaná až v odebraném vzorku vlivem vnějšího prostředí by vedla k arteficiálním falešně pozitivním výsledkům. Přestože jsme nepopokovali kompletní spektrum pokusů provedených Eguchi-Ishimaem et al., nenalezli jsme TEL/AML1 pozitivitu ani u dětí s febriliemi, ani ve vzorcích vystavených pokojové teplotě či apoptogenní stimulaci. Stejně tak jsme nedetekovali transkript TEL/AML1 ve vzorcích kostní dřeně dětí s non-T/AML1 ALL, přestože se jednalo o náběry provedené v průběhu intenzivní chemoterapie a tedy s indukovanou apoptózou.

Závěr

Naše výsledky potvrzují hypotézu navrženou Greavesem (8), podle které by u skupiny TEL/AML1 pozitivních leukémií mohl být vznik fúze TEL/AML1 důsledkem prvního leukemogenního zásahu. Tento zásah by se odehrál v prenatálním období a v okamžiku porodu by bylo možno velmi citlivou metodou tyto preleukemické buňky detekovat. K definitivnímu zvratu do leukemického klonu a zjevnému propuknutí klinického obrazu leukémie by pak docházelo pouze u části dětí po kontaktu s dosud neznámým faktorem (antigenem?) v průběhu postnatálního života.

Poděkování

Autoři práce děkují za spolupráci všem spolupracujícím centrům Pracovní skupiny pro dětskou hematologii v ČR (Czech Paediatric Haematology - CPH) a jejich vedoucím, jmenovitě B. Blažkovi (Ostrava), Z. Černé (Plzeň), Y. Jabalimu (České Budějovice), V. Mihálovi (Olomouc), D. Procházkové (Ústí nad Labem), J. Štěřbovi (Brno), K. Toušové (Hradec Králové).

Práce byla podpořena granty IGA MZ 6292 a 6509 a výzkumnými záměry I1100003 a I1100005 MŠMT.

Literatura

1. Campbell, M., Cabrera, M. E., Legues, M. E., Ridge, S., Greaves, M.: Discordant clinical presentation and outcome in infant twins sharing a common clonal leukaemia. *Brit. J. Haematol.*, 93, 1996, č. 1, s. 166-169.
2. Eguchi-Ishimaem, M., Eguchi, M., Ishii, E. et al.: Breakage and fusion of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood*, 97, 2001, č. 3, s. 737-743.
3. Fasching, K., Panzer, S., Haas, O. A., Marschalek, R., Gajner, H., Panzer-Grumayer, E. R.: Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 95, 2000, č. 8, s. 2722-2724.
4. Ford, A. M., Pombo-de-Oliveira, M. S., MacCarthy, K. P. et al.: Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. *Blood*, 89, 1997, č. 1, s. 281-285.
5. Ford, A. M., Ridge, S. A., Cabrera, M. E. et al.: In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*, 363, 1993, č. 6427, s. 358-360.
6. Gale, K. B., Ford, A. M., Repp, R. et al.: Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 1997, č. 25, s. 13950-13954.
7. Gill Super, H. J., Rothberg, P. G., Kobayashi, H., Freeman, A. I., Diaz, M. O., Rowley, J. D.: Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. *Blood*, 83, 1994, č. 3, s. 641-644.
8. Greaves, M.: Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukemia. *Europ. J. Cancer*, 35, 1999, č. 14, s. 1941-1953.
9. Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 1987, č. 1, s. 156-159.
10. Kim-Rouille, M. H., MacGregor, A., Wiedemann, L. M., Greaves, M. F., Navarrete, C.: MLL-AF4 gene fusions in normal newborns. *Blood*, 93, 1999, č. 3, s. 1107-1108.
11. Mahmoud, H. H., Ridge, S. A., Behm, F. G. et al.: Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. *Med. Pediatr. Oncol.*, 24, 1995, č. 2, s. 77-81.
12. Maia, A. T., Ford, A. M., Jalali, G. R. et al.: Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood*, 98, 2001, č. 2, s. 478-482.

13. Mori, H., Colman, S. M., Xiao, Z. et al.: Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. natl. Acad. Sci. (USA)*, 99, 2002, č. 12, s. 8242-8247.
14. Pui, C. H., Campana, D., Evans, W. E.: Childhood acute lymphoblastic leukaemia-current status and future perspectives. *Lancet Oncol.*, 2, 2001, č. 10, s. 597-607.
15. Trka, J., Zuna, J., Haskovec, C. et al.: Detection of BCR/ABL, MLL/AF4 and TEL/AML1 hybrid genes and monitoring of minimal residual disease in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Čas. Lék. čes.*, 138, 1999, č. 1, s. 12-17.
16. Trka, J., Zuna, J., Hrusak, O. et al.: Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. *Pediatric Hematology Working Group in Czech Republic. Leukemia*, 12, 1998, č. 6, s. 996-997.
17. Trka, J., Zuna, J., Hrusak, O., Kalinova, M., Muzikova, K., Stary, J.: RT-PCR detects TEL/AML1 but not MLL/AD4 expression in the cord blood of healthy new-borns. *Haematologica*, 84, 1999, č. EHA-4 Abstract book, s. 123.
18. Trka, J., Zuna, J., Hrusak, O. et al.: No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples. *Blood*, 93, 1999, č. 3, s. 1106-1107.
19. Trka, J., Zuna, J., Zavacka-Polouckova, A. et al.: Evidence for the presence of t(12;21) in cord blood samples of healthy newborns. *Blood*, 96, 2000, č. 11, s. 694a.
20. Uckun, F. M., Herman-Hatten, K., Crotty, M. L. et al.: Clinical significance of MLL-*AF4* fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood*, 92, 1998, č. 3, s. 810-821.
21. Wiemels, J. L., Cazzaniga, G., Daniotti, M. et al.: Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, 354, 1999, č. 9189, s. 1499-1503.
22. Wiemels, J. L., Ford, A. M., Van Wering, E. R., Postma, A., Greaves, M.: Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*, 94, 1999, č. 3, s. 1057-1062.
23. Yagi, T., Hibi, S., Tabata, Y. et al.: Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 96, 2000, č. 1, s. 264-268.
24. 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*, 13, 1999, č. 1, s. 22-24.

Došlo 3. 2. 2003

Doc. MUDr. Jan Trka, PhD.

II. dětská klinika 2. LF UK a FN Motol

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

REFERÁT

Čes.-slov. Pediat., 58, 2003, No. 8, p. 477.

Ringbäck Weitoft, G., Hler, A., Haglung, B. et al.: Mortality, Severe Morbidity and Injury in Children Living with Single Parents in Sweden (Mortalita, těžká morbidita a úrazy u dětí žijících jen s jedním rodičem ve Švédsku). *Lancet*, 361, 2003, č. 9354, s. 289-295.

Švédští experti sledovali, jaká je nemocnost těch dětí, o které se stará jen jeden z odloučeně žijících manželů. Výsledky této studie byly velmi tristní. Ukázalo se totiž, že tyto děti jsou třikrát častěji závislé na drogách, dvakrát tak často trpí nějakou psychickou nemocí a prakticky dvojnásobně často končí svůj život sebevraždou než jejich vrstevníci z úplných rodin. Tyto děti z rozloučených rodin také vykazují obecně vyšší mortalitu, častěji umírají po nešťastném úrazu, ne však v rámci dopravního ruchu.

Studie byla zahájena v roce 1991 a trvala 8 let, přičemž vedle úmrtí byly analyzovány i všechny hospitalizační pobyty

těchto dětí ve věku 6 až 18 let. Celkem 65 tisíc dětí žilo v „odloučených“ rodinách, 920 tisíc se společně žijící rodinou tvořilo kontrolní skupinu. V tomto mezidobí zemřelo celkem 1912 dětí, z toho 364 po suicidii, 528 při dopravních nehodách a 70 na následky drog. Příčiny nepříznivých výsledků u dětí odloučených rodičů se však nepodařilo přesně objasnit. Roli hrála např. nezaměstnanost odloučeného rodiče, špatné bytové poměry, asi 10 % dětí bylo možno označit jako „chudé“, finanční průměr byl v těchto případech o polovinu nižší.

Tato problematika bude i nadále narůstajícím a dosud nevyřešeným úkolem, poněvadž podle odhadu expertů žije jen s jedním rodičem asi jedna čtvrtina všech dětí, a to se určitě netýká jen Švédska, ale i např. poměrů v Německu.

Fuchs, Praha

Použitá literatura

1. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535-1548
2. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 2002;1:417-420
3. Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, et al. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 2003;17:2202-2206
4. Pui C-H. Childhood Leukemias. 1999
5. Ito C, Kumagai M, Manabe A, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 1999;93:315-320
6. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342:998-1006
7. Sawinska M, Ladon D. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 2004;28:35-42
8. Lightfoot TJ, Roman E. Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:104-117
9. Hanson RD, Hess JL, Yu BD, et al. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14372-14377
10. Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, et al. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003;102:262-268
11. Meyer C, Schneider B, Jakob S, et al. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2006;20:777-784
12. Heerema NA, Arthur DC, Sather H, et al. Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Childrens Cancer Group. *Blood* 1994;83:2274-2284
13. Cave H, Cacheux V, Raynaud S, et al. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:1459-1464
14. Raynaud S, Cave H, Baens M, et al. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;87:2891-2899
15. Romana SP, Le Coniat M, Poirel H, Marynen P, Bernard O, Berger R. Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). *Leukemia* 1996;10:167-170
16. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, et al. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;90:4559-4566
17. Fears S, Vignon C, Bohlander SK, Smith S, Rowley JD, Nucifora G. Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:127-135
18. Kobayashi H, Satake N, Maseki N, Sakashita A, Kaneko Y. The der(21)t(12;21) chromosome is always formed in a 12;21 translocation associated with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996;94:105-111

19. Ma SK, Wan TS, Cheuk AT, et al. Characterization of additional genetic events in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion: a molecular cytogenetics study. *Leukemia* 2001;15:1442-1447
20. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16:1233-1258
21. Trka J, Zuna J, Hrusak O, et al. Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. Pediatric Hematology Working Group in Czech Republic. *Leukemia* 1998;12:996-997
22. 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
23. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH. Significance of the TEL-AML fusion gene in childhood AML. *Leukemia* 1999;13:1470-1471
24. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999;13:22-24
25. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2006;107:4508-4513
26. Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;211:279-288
27. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4917-4921
28. Scholz H, Deatrick J, Klaes A, Klambt C. Genetic dissection of pointed, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics* 1993;135:455-468
29. Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19:6533-6548
30. Kim CA, Phillips ML, Kim W, et al. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J* 2001;20:4173-4182
31. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 1999;19:6566-6574
32. Wood LD, Irvin BJ, Nucifora G, Luce KS, Hiebert SW. Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3257-3262
33. Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 1998;23:213-216
34. 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
35. Guidez 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
36. Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:871-877
37. Kadosh D, Struhl K. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 1997;89:365-371

38. Alland L, Muhle R, Hou H, Jr., et al. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997;387:49-55
39. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997;89:325-328
40. Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* 1997;16:4374-4383
41. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998;12:2392-2402
42. Fenrick R, Wang L, Nip J, et al. TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* 2000;20:5828-5839
43. Van Rompaey L, Dou W, Buijs A, Grosveld G. Tel, a frequent target of leukemic translocations, induces cellular aggregation and influences expression of extracellular matrix components. *Neoplasia* 1999;1:526-536
44. Basbaum CB, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:731-738
45. Irvin BJ, Wood LD, Wang L, et al. TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem* 2003;278:46378-46386
46. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994;77:307-316
47. Golub TR, Goga A, Barker GF, et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996;16:4107-4116
48. Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 1995;55:34-38
49. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:2535-2540
50. Buijs A, Sherr S, van Baal S, et al. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene* 1995;10:1511-1519
51. Buijs A, van Rompaey L, Molijn AC, et al. The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity. *Mol Cell Biol* 2000;20:9281-9293
52. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 1996;16:1349-1355
53. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10431-10434
54. Speck NA, Stacy T, Wang Q, et al. Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res* 1999;59:1789s-1793s
55. Wang Q, Stacy T, Miller JD, et al. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 1996;87:697-708
56. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, et al. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6859-6863
57. Downing JR. AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia. *Leukemia* 2001;15:664-665

58. Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Isaac S, Seto E, Hiebert SW. A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem* 2000;275:651-656
59. Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *Embo J* 1995;14:341-350
60. Wargnier A, Legros-Maida S, Bosselut R, et al. Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6930-6934
61. Uchida H, Zhang J, Nimer SD. AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. *J Immunol* 1997;158:2251-2258
62. Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* 1995;11:2667-2674
63. Busch C, Humphries RK. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 2000;71:301-308
64. Canon J, Banerjee U. Runt and Lozenge function in *Drosophila* development. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11:327-336
65. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;86:1-14
66. Roulston D, Espinosa R, 3rd, Nucifora G, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD. CBFA2(AML1) translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy. *Blood* 1998;92:2879-2885
67. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in **childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia**. *Blood* 1995;86:4263-4269
68. Liu P, Tarle SA, Hajra A, et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993;261:1041-1044
69. Niini T, Kanerva J, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2000;85:362-366
70. Bernardin F, Friedman AD. AML1 stimulates G1 to S progression via its transactivation domain. *Oncogene* 2002;21:3247-3252
71. Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia* 1999;13:1932-1942
72. Hernandez-Munain C, Krangel MS. c-Myb and core-binding factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor delta enhancer. *Mol Cell Biol* 1995;15:3090-3099
73. Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Teneri DG, Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* 1998;18:3915-3925
74. Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1993;13:6336-6345
75. Song H, Kim JH, Rho JK, Park SY, Kim CG, Choe SY. Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter. *Mol Cells* 1999;9:560-563

76. Rho JK, Kim JH, Yu J, Choe SY. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:91-95
77. Lee YJ, Kim JH, Bae S, Rho SK, Choe SY. Mechanism of transcriptional repression by TEL/RUNX1 fusion protein. *Mol Cells* 2004;17:217-222
78. Chakrabarti SR, Sood R, Nandi S, Nucifora G. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13281-13285
79. Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 2001;20:3716-3725
80. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 1999;35:1941-1953
81. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, et al. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* 2002;62:3904-3908
82. Fischer M, Schwieger M, Horn S, et al. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 2005;24:7579-7591
83. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* 2004;103:3890-3896
84. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8443-8448
85. Andreasson P, Schwaller J, Anastasiadou E, Aster J, Gilliland DG. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130:93-104
86. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4584-4588
87. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999;354:1499-1503
88. Maia AT, Koechling J, Corbett R, Metzler M, Wiemels JL, Greaves M. Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:335-340
89. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999;94:1057-1062
90. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157-162
91. Cave H, Gerard B, Martin E, et al. Loss of heterozygosity in the chromosomal region 12p12-13 is very common in childhood acute lymphoblastic leukemia and permits the precise localization of a tumor-suppressor gene distinct from p27KIP1. *Blood* 1995;86:3869-3875
92. Gale KB, Ford AM, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13950-13954
93. Taub JW, Konrad MA, Ge Y, et al. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2992-2996

94. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997;349:344-349
95. Greaves M. Childhood leukaemia. *Bmj* 2002;324:283-287
96. Alessandri AJ, Pritchard SL, Schultz KR, et al. A population-based study of pediatric anaplastic large cell lymphoma ETV6 (TEL)-AML1 pre-B acute lymphoblastic leukaemia cells are associated with a distinct antigen-presenting phenotype
Absence of t(12;15) associated ETV6-NTRK3 fusion transcripts in pediatric acute leukemias. *Cancer* 2002;94:1830-1835
97. Zuna J, Ford AM, Peham M, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:5355-5360
98. 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
99. Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967;27:2619-2631
100. 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
101. Roth E, Spittler A, Oehler R. [Glutamine: effects on the immune system, protein balance and intestinal functions]. *Wien Klin Wochenschr* 1996;108:669-676
102. 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
103. Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* 2001;357:321-328
104. Richards NG, Schuster SM. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998;72:145-198
105. Gong SS, Basilico C. A mammalian temperature-sensitive mutation affecting G1 progression results from a single amino acid substitution in asparagine synthetase. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3509-3513
106. Colletta G, Cirafici AM. TSH is able to induce cell cycle-related gene expression in rat thyroid cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:265-272
107. Gong SS, Guerrini L, Basilico C. Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol* 1991;11:6059-6066
108. Hutson RG, Kilberg MS. Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochem J* 1994;304 (Pt 3):745-750
109. Guerrini L, Gong SS, Mangasarian K, Basilico C. Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol Cell Biol* 1993;13:3202-3212
110. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS. Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:31139-31144
111. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, et al. Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem* 2000;275:26976-26985
112. Jaffe N, Traggis D, Das L, et al. L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res* 1971;31:942-949

113. 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
114. Tallal L, Tan C, Oettgen H, et al. E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer* 1970;25:306-320
115. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-1218
116. Stams WA, Beverloo HB, den Boer ML, et al. Incidence of additional genetic changes in the TEL and AML1 genes in DCOG and COALL-treated t(12;21)-positive pediatric ALL, and their relation with drug sensitivity and clinical outcome. *Leukemia* 2006;20:410-416
117. Kornberg RD. Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* 1999;9:M46-49
118. Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:148-154
119. Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 2000;20:1899-1910
120. Fyodorov DV, Kadonaga JT. The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* 2001;106:523-525
121. Lusser A, Kadonaga JT. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 2003;25:1192-1200
122. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-45
123. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15:2343-2360
124. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:142-148
125. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress
Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Cell* 2001;107:137-148
126. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 2000;408:377-381
127. Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001;262:75-83
128. Guenther MG, Barak O, Lazar MA. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 2001;21:6091-6101
129. Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 1997;89:357-364
130. Dhordain P, Lin RJ, Quief S, et al. The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 1998;26:4645-4651
131. Hiebert SW, Lutterbach B, Amann J. Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol* 2001;8:197-200

132. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;93:3167-3215.
133. Melnick A, Licht JD. Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2002;9:322-332
134. Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 1978;14:105-113.
135. Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 2003;4:13-18
136. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:194-202
137. Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* 2001;276:38837-38843
138. Su GH, Sohn TA, Ryu B, Kern SE. A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res* 2000;60:3137-3142
139. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999;401:188-193
140. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 2001;20:6969-6978
141. Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3697-3702
142. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2:151-163
143. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:673-678
144. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001;20:7186-7203
145. Warrell RP, Jr., Frankel SR, Miller WH, Jr., et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385-1393
146. He LZ, Tolentino T, Grayson P, et al. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 2001;108:1321-1330
147. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10860-10865
148. Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J, Irvin B, Durst K, Linggi B. The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:177-183
149. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:21-38
150. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159

151. Cario G, Stanulla M, Fine BM, et al. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:821-826
152. Fine BM, Stanulla M, Schrappe M, et al. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:1043-1049
153. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116-5121
154. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19:876-878
155. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102:2951-2959
156. 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
157. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:38-51

Seznam publikací a přednášek

Publikace:

- Vaskova M, Fronkova E, Starkova J, Kalina T, Mejstrikova E, Hrusak O (2006): *Stages of B Precursor Development Reflecting Recombination Status and Propensity to Leukemic Transformation*. rukopis připravený k zaslání
- Zápotocký M, Starková J, Votruba I, Holý A, Trka J, Otová B (2006): *Expression of MRP4 and MRP5 genes related to the resistance to 9-[2-(phosphonomethoxy) ethyl]-2,6-diaminopurine (PMEDAP) in the haematological malignancy models*. rukopis připravený k zaslání
- Starkova J, Madzo J, Cario G, Kalina T, Ford A, Zaliova M, Hrusak O a Trka J (2006): *Identification of RUNX1 target genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukaemic cells*, rukopis zasláný k publikaci
- Starková J, Krejčí O, Otová B, Krejčíková K, Hrušák O, Starý J a Trka J (2006): *TEL/AML1 spuzením metabolického stresu zvyšuje citlivost leukemických buniek na L-Asparaginázu*, **Transfuzie a hematologie dnes** 2006, 2(12), 70-75
- Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, Trka J: Reply to Stams et al. **Leukemia**. 2005 19, 321
- Krejčí O¹, Starková J¹, Otová B, Madžo J, Kalinová M, Hrušák O, Trka J. (2004) *Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-Asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells*. **Leukemia** Mar;18(3):434-41, ¹oba jsou prvními autory
- Trka J, Zuna j, Hrušák O, Zemanová Z, Mužiková K, Kalinová M, Zörnerová T, Brabencová A, Madžo J, Krejčí O, Starková J, Pončáková I, Šrámková L, Poloučková A, Hölzelová E, Horák J, Starý J. (2003) *Hybrid gene TEL/AML1 associated with acute leukaemias arising during normal fetal life is detectable in cord blood of healthy new born childrens*. **Československá pediatrie**;58(8):471-477
- Sabol M, Kutschy P, Siegfried L, Miroššay A, Suchý M, Hrbková H, Dzurilla M, Marušková R, Starková J, Paulíková E (2000): *Cytotoxic effect of cruciferous phytoalexins against murine L1210 leukemia and B16 melanoma*, **Biologia**, Bratislava 55/6: 701-707

Abstrakta v časopisech s IF:

- Starkova J, Madzo J, Zaliova M, Cario G, Ford A, Hrusak O a Trka J (2006): *ETV6/RUNX1 directly dysregulates genes with RUNX1 binding site via mechanism reversible by histone deacetylase inhibitors* **Haematologica** Vol 91, Supplement 1, 0983, 360

- Starkova J, Madzo J, Cario G, Krejcikova K, Hrusak O and Trka J (2005): *The expression of genes associated with TEL/AML1 [+] leukaemias are changed by histone deacetylase inhibitors* **Blood** Vol 106, No 11, 4364, 171b
- Starková J, Madžo J, Vášková M, Kalina T a Trka J (2004) *Histone deacetylase inhibitors are capable to modify leukaemia-specific phenotype of TEL/AML1-positive leukaemic cells* **Blood** Vol 104, No 11, P.A.1891, 524a
- Starkova j, O. Krejci, B. Otova, J. Madzo, O. Hrusak, J. Stary, J. Trka: *Upregulation of Asparagine Synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-Asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells* **Pediatric Blood and Cancer** 2004, Vol 43, No 4, P.A.017, 385
- Starková J, Krejčí O, Otová B, Madžo J, Hrušák O, Starý J a Trka J. (2004) *Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-Asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells* **The Hematology Journal** Vol 5, Supplement 2, P.A.058, S21
- Madžo J, Starková J, Vášková M, Kalina T a Trka J (2004) *Histone deacetylase inhibitors are capable to modify leukaemia-specific phenotype of TEL/AML1-positive leukaemic cells.* **Pediatric Blood and Cancer** Vol 43, No 4, S.055, 327
- Madžo J, Starková J, Vášková M, Kalina T a Trka J (2004) *Histone deacetylase inhibitors are capable to modify leukaemia-specific phenotype of TEL/AML1-positive leukaemic cells.* **The Hematology Journal** Vol 5, Supplement 2, P.A.055, S20
- Starková J, Krejčí O, Otová B, Madžo J, Hrušák O a Trka J. (2003) *Relationship between sensitivity to L-Asparaginase and the expression of Asparagine Synthetase and TEL/AML1 genes in lymphoblastic leukaemic cells-* **The Hematology Journal** Vol 4, supplement 2, P.A.0108, 42
- Krejčí O, Starková J, Zuna J, Kalinová M, Madžo J, Hrušák O, Kalina T, Starý J, Otová B a Trka J (2002) *Upregulation on asparagine synthetase does not play a role in the origin of relapse in childhood ALL.* 7th Congress of the European Hematology Association, **The Hematology Journal** Vol. 3, supplement 1, P.A.1057, 312

Přednášky na tuzemských a zahraničních konferencích

- Starkova J, Madzo J, Zaliova M, Cario G, Ford A, Hrusak O a Trka J (2006): *ETV6/RUNX1 directly dysregulates genes with RUNX1 binding site via mechanism reversible by histone deacetylase inhibitors.* 11. konference evropské hematologické společnosti EHA
- Starková J, Madžo J, Vášková M, Kalina T a Trka J (2005) *Zmena expresie génov regulujúcich lymfoidnú proliferáciu u TEL/AML1 pozitívnych leukemických buniek po podaní inhibitorov deacetyláz histónov.* XIV. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů, České Budějovice

- Starková J, Madžo J, Krejčíková K, Cario G a Trka J (2005) *The expression of genes associated with TEL/AML1 [+] leukaemias is changed by histone deacetylase inhibitors.* 2. ročník RNA klubu, České Budějovice
- Starková J, Madžo J, Krejčíková K, Vášková M a Trka J (2005) *Inhibitory histón deacetyláz menia expresiu skupiny génov regulujúcich lymfoidnú proliferáciu u TEL/AML1 pozitívnych leukemických buniek.* XIX.Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí; Olomouc
- Starková J (2005) *Histone deacetylase inhibitors reveal the role of TEL/AML1 fusion protein in leukaemogenesis.* 2. hradecko-královecká konference českých a slovenských postgraduálních studentů, Hradec Králové
- Starková J, Madžo J, Vášková M, Kalina T a Trka J. (2004) *Vplyv inhibitorov histón deacetyláz na diferenciáciu a rast leukemických buniek.* XVIII.Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí; Olomouc
- Starková J, Madžo J, Hrušák O a Trka J (2004) *Effect of histone deacetylase inhibitors on TEL/AML1[+] leukaemic cells.* Science Week 2004: Chromatin structure and gene expression mechanism as therapeutic targets; Luxembourg
- Starková J, Madžo J, Zuna J, Hrušák O a Trka J (2003) *Inhibitory histón deacetyláz, nové látky ovplyvňujúce rast a diferenciáciu leukemických buniek.* XIII. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů; Lednice
- Starková J, Krejčí O, Hrušák O, Trka J. (2003) *Expresia génov zodpovedných za syntézu asparagínu a glutamínu v leukemických bunkách rozdeľuje TEL/AML pozitívne a negatívne ALL.* XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí; Olomouc
- Starková, J, Krejčí, O, Otová, B, Kalinová, M, Zörnerová, T, Hrušák, O & Trka, J (2002) *Antiproliferatívny in vitro efekt L-Asparaginázy na leukemické bunky s t(12;21).* Česko-slovenské dny laboratorní hematologie s mezinárodní účastí, Hradec Králové
- Starková, J, Krejčí, O, Otová, B, Kalinová, M, Zörnerová, T, Hrušák, O & Trka, J (2002) *Testování protinádorového účinku na TEL/AML1 pozitivních a negativních buňkách.* XIII. sjezd české a slovenské hematologické transfuziologické společnosti, Praha, ČR
- Starková J., Krejčí O., Otová B., Kalinová M., Trka J. (2002) *Vplyv L-Asparaginázy na TEL/AML1 pozitívnych podskupinu pacientov s akútnou lymfoblastickou leukémiou.* XII. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů, Modra, Slovensko

Seznam použitých zkratk

AARE	amino acid response element
ACK1	activated p21cdc42Hs kinase
AL	akutní leukémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyelocytární leukémie
ASH	American Society of Hematology
AsnS	asparagin syntetáza
BCP-ALL	prekurzorová leukémie B-řady
B2M	beta-2-microglobulin
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CBF α	core binding factor alpha
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CML	chronická myeloidní leukémie
CR1	first complete remission
EFS	event-free survival
ERSR	endoplasmic reticulum stress response
FAB	French-American-British classification of AML
GDH	glutamát dehydrogenáza
GZMB	granzyme B
HAT	histon acetyltransferáza
HDAC	histon deacetyláza
HDACi	inhibitory deacetyláz histonů
HOX	homeoboxové geny
L-Asp	L-Asparagináza
Nalm-6	TEL/PDGFRB pozitivní leukemická linie
Nalm-24	BCR/ABL pozitivní leukemická linie
NC-NC	EBV transformované zralé lymfocyty
OS	overall survival
PDGFRB	platelet derived growth factor receptor beta
Ph chromosom	Philadelphský chromosom

RA	retinoic acid
RAG-1	subunit of recombination activating gene
REH	TEL/AML1 pozitivní leukemická linie
RLU	relative luciferase unit
qRT-PCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
TCF-4	transcription factor 4
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TSA	Trichostatin A
VPA	kyselina valproová