

## Abstrakt

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastější nádorové onemocnění u dětí. L-asparagináza (ASNáza) klíčová složka terapie dětské ALL, hydrolyzuje plazmatický asparagin a glutamin. Leukemické buňky jsou na depleci aminokyselin citlivé, protože mají v porovnání se zdravými buňkami sníženou aktivitu asparagin syntetázy (ASNS). Léčba dětské ALL je velmi úspěšná, přesto se v některých případech projevují nežádoucí účinky a rezistence na terapii. Příčiny nebyly dosud spolehlivě vysvětleny.

V naší práci jsme chtěli objasnit, do jaké míry exprese genu pro *ASNS* ovlivňuje citlivost ALL buněk k ASNáze. Dále jsme se zaměřili na detailní mechanismus účinku ASNázy, s cílem vysvětlit příčiny rozdílné citlivosti leukemických pacientů k tomuto léčivu.

Pro studium vztahu mezi expresí genu pro *ASNS* a citlivostí k ASNáze jsme použili BCP ALL buněčné linie (REH, NALM-6, RS4;11 a UOCB-6) a 30 diagnostických BCP ALL vzorků. Pomocí RNA interference jsme u ALL linií gradientově snížili expresi genu pro *ASNS*. Definovali jsme hraniční hodnotu exprese genu pro *ASNS*, pod jejíž úroveň již exprese genu pro *ASNS* nekoreluje s citlivostí k ASNáze. Hladina exprese genu pro *ASNS* u patientských vzorků je pod definovanou hranicí. Dále jsme potvrdili, že citlivost ALL diagnostických vzorků k ASNáze nekoreluje s expresí genu pro *ASNS*. Navíc jsme ukázali, že u ALL buněk s velmi nízkou bazální expresí genu pro *ASNS* nedochází po podání ASNázy ke zvýšení exprese tohoto genu.

Pro další práci jsme dlouhodobou inkubací s ASNázou vypěstovali subklony leukemických linií s nižší citlivostí k ASNáze (rezREH, rezNALM-6). U parentálních i rezistentních linií jsme změřili expresní profil a následně jsme analyzovali signální a metabolické dráhy, jejichž aktivita byla po vytvoření rezistence změněna. Stejným způsobem jsme analyzovali veřejně dostupná expresní data patientských vzorků, u nichž je známá citlivost k ASNáze. Zjistili jsme, že geny jejichž exprese byla signifikantně změněna, se vyskytují v dráhách regulujících translaci mRNA a metabolismus. Zaměřili jsme se proto na účinek ASNázy na metabolismus ALL buněk. Inkubace ALL buněk s ASNázou vedla ke zvýšení oxidace MK, respirace a ke snížení glykolýzy. Zvýšená oxidace MK, společně se sníženou translací a syntézou pyrimidinů byla způsobena inhibicí dráhy RagB-mTORC1. Účinek ASNázy na glykolýzu je na RagB-mTORC1 nezávislý. Bylo popsáno, že aktivita oxidace MK je velmi důležitá pro

přežívání leukemických buněk v metabolickém stresu. Studovali jsme proto, zda oxidace MK neovlivňuje citlivost ALL buněk k ASNáze. Farmakologická inhibice oxidace MK významně zvýšila cytotoxický účinek ALL buněčných linií i BCP ALL diagnostických vzorků k ASNáze. Další důkaz významu oxidace MK pro buněčné přežívání jsme získali při využití ALL buněčné linie s konstitutivní aktivací mTORC1. U této linie nedochází po inkubaci s ASNázou k aktivaci oxidace MK, v porovnání s kontrolními buňkami je však na ASNázu citlivější.

Závěrem naší práce je, že na základě bazální exprese genu pro *ASNS* nelze u ALL pacientů predikovat citlivost k ASNáze. Navíc jsme zjistili, že ASNáza významně ovlivňuje bioenergetické a biosyntetické procesy ALL buněk. Naše výsledky dále ukazují, že lze pro zvýšení cytotoxického účinku ASNázy využít kombinaci s farmakologickými inhibitory oxidace MK.