

**Anna Mikosik**

**ROLA AKTYWNOŚCI BIAŁEK SYSTEMU  
KALPAINA – KALPASTATYNA ORAZ SORCYNY  
W ZAHAMOWANIU ZDOLNOŚCI DO APOPTOZY  
KOMÓREK OSTREJ DZIECIEŃCEJ BIAŁACZKI  
LIMFOBLASTYCZNEJ (ALL)**

**(Rozprawa doktorska)**

**Katedra i Zakład Fizjopatologii**

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Promotor: prof. dr hab. Jacek M. Witkowski**

**Gdańsk 2012**

„**W** życiu niczego nie należy się obawiać.  
Należy jedynie zrozumieć.”

Maria Curie-Skłodowska

„**N**auka nigdy nie dobiega końca, Watsonie”

Sir Arthur Conan Doyle

**Składam serdeczne podziękowanie:**

*Promotorowi tej pracy – panu Profesorowi Jackowi M. Witkowskemu. Szczególne wyrazy wdzięczności za prowadzenie, pomoc oraz bezcenne uwagi w trakcie wykonywania oraz redagowania przedstawionej pracy doktorskiej.*

*Pani Profesor Annie Balcerskiej oraz pani doktor Annie Płoszyńskiej, za zgodę na przeprowadzenie niniejszych badań, udostępnienie materiału badawczego oraz charakterystyki klinicznej badanych osób.*

*Wszystkim koleżankom i kolegom z Katedry i Zakładu Fizjopatologii za pomoc i życzliwość każdego dnia.*

*Rodzicom – za ogromne pokłady cierpliwości i codzienną pomoc, bez której nigdy nie doszło by do powstania niniejszej pracy.*

## SPIS TREŚCI

<b>WYJAŚNIENIE SKRÓTÓW</b>	<b>7</b>
<b>1. WSTĘP</b>	<b>8</b>
1.1 Ostra białaczka limfoblastyczna	8
1.1.1 Podział białaczek	8
1.1.2 Objawy choroby i terapia	11
1.1.3 Czynniki rokownicze ALL	12
1.1.4 Przyczyny ALL	13
1.2 Apoptoza – cel i przebieg procesu	14
1.2.1 Apoptoza w białaczkach	16
1.3 System białkowy kalpaina-kalpastatyna (CCS)	18
1.3.1 Klasyczne kalpainy	19
1.3.2 Substraty kalpain	20
1.3.3 Kalpastatyna - wewnątrzkomórkowy inhibitor kalpain	21
1.3.4 Mechanizm funkcjonowania systemu kalpaina - kalpastatyna	23
1.3.5 Rola kalpain w patologiach	24
1.3.6 Wpływ kalpain na proces apoptozy w komórkach nowotworowych	25
1.4 Sorcyna – białko regulatorowe	27
1.4.1 Rola i budowa sorcyny	27
<b>2. CELE PRACY</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b>	<b>31</b>
3.1 Charakterystyka badanych grup	31
3.2 Immunofenotypizacja komórek uzyskanych od chorych z zastosowaniem markerów powierzchniowych	34
3.3 Izolacja komórek jednojądrzastych ze szpiku	36
3.4 Analiza ilości $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy oraz kalpastatyny w jednojądrzastych komórkach szpiku (blasty ALL oraz komórki grupy porównawczej)	37
3.5 Ocena apoptozy w blastach ALL	39
3.5.1 Pomiar apoptozy spontanicznej w komórkach ALL oraz nie-ALL z zastosowaniem Aneksyny V	39
3.5.2 Hodowle komórkowe z zastosowaniem inhibitora IV kalpain: ocena wpływu zahamowania aktywności kalpainy na spontaniczną apoptozę blastów ALL	40

3.5.3	Pomiar zmiany potencjału błony mitochondrialnej z zastosowaniem sondy JC1 w blastach ALL <i>ex vivo</i> oraz w 24 godzinnych hodowlach komórkowych <i>in vitro</i>	41
3.6	Cytometria przepływowa	42
3.7	Ocena poziomów ekspresji genów białek systemu kalpaina - kalpastatyna oraz sorcyny techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR)	42
3.7.1	Izolacja całkowitego RNA	42
3.7.2	Reakcja syntezy cDNA	43
3.7.3	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	44
3.7.4	Elektroforeza agarozowa	45
3.7.5	Analiza densytometryczna żeli	46
3.8	Pomiar aktywności enzymu $\mu$ -kalpainy poprzez detekcję fragmentów degradacji kalpastatyny z użyciem techniki Western blot	46
3.8.1	Przygotowanie lizatów komórkowych	48
3.8.2	Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford	48
3.8.3	Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE	48
3.8.4	Western blotting	49
3.9	Analiza statystyczna	50
<b>4.</b>	<b>WYNIKI</b>	<b>51</b>
4.1	Ocena ilości i aktywności $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy oraz kalpastatyny w blastach ALL oraz limfocytach CD19 <sup>+</sup> grupy porównawczej	51
4.1.1	Podwyższony odsetek limfoblastów B CD19 <sup>+</sup> zawierających enzym $\mu$ - kalpainę w stosunku do komórek CD19 <sup>+</sup> grupy porównawczej	51
4.1.2	Porównanie zawartości $\mu$ -kalpainy w blastach ALL i w komórkach CD19 <sup>+</sup> grupy porównawczej	53
4.1.3	Porównanie odsetka komórek zawierających wewnątrzkomórkowy inhibitor kalpainy - kalpastatynę w blastach ALL i komórkach CD19 <sup>+</sup> grupy porównawczej	55
4.1.4	Porównanie ilości kalpastatyny w komórkach CD19 <sup>+</sup> ALL oraz AML i kontroli	57
4.1.5	Ocena odsetka komórek o fenotypie m-kalpaina <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> wśród CD19 <sup>+</sup> grupy ALL i porównawczej oraz poziomu MFI dla enzymu	61
4.2	Ekspresja genów dla kalpastatyny, $\mu$ -kalpainy oraz m-kalpainy w blastach ALL oraz komórkach grupy nie-ALL	63

4.3 Ocena wpływu $\mu$ -kalpainy na apoptozę w nowotworowych blastach ALL	66
4.3.1 Różnice w poziomie apoptozy <i>ex vivo</i> a związek z wysoką aktywnością $\mu$ - kalpainy	66
4.4 Wpływ zahamowania aktywności $\mu$ -kalpainy <i>in vitro</i> na proces apoptozy w blastach ALL	70
4.5 Ocena rzeczywistej aktywności $\mu$ -kalpainy w badanych komórkach ALL	74
4.6 Ocena ekspresji genu i poziomu białka sorcyny w blastach ALL oraz próba oszacowania zależności między sorcyną a systemem białkowym kalpaina - kalpastatyna	79
4.6.1 Ocena poziomu ekspresji genu <i>SRI</i> i ilości białka sorcyny w komórkach ALL oraz grupy porównawczej	79
4.6.2 Zależności między sorcyną a białkami systemu kalpainowego w ludzkich komórkach ALL	81
<b>5. DYSKUSJA</b>	<b>85</b>
<b>6. WNIOSKI</b>	<b>103</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>104</b>
<b>STRESZCZENIE</b>	<b>124</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>126</b>

## WYJAŚNIENIE SKRÓTÓW

**ALL:** ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*)

**AML:** ostra białaczka szpikowa (ang. *Acute Myeloid Leukemia*)

**B-CLL:** przewlekła białaczka B-limfocytarna (ang. *B-cell chronic lymphocytic leukemia*)

**BM MNC:** komórki jednojądrzaste szpiku kostnego (ang. *bone marrow-derived mononuclear cells*)

**BSA:** albumina surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumin*)

**CCS:** system kalpaina – kalpastatyna (ang. *calpain – calpastatin system*)

**CD:** antygen różnicowania limfocytów (ang. *cluster of differentiation*)

**FITC:** izotiocyanian fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*)

**JC1:** jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny

**kDa:** kilodalton

**µg:** mikrogram

**µl:** mikrolitr

**µM:** stężenie mikromolarne

**MDR:** wielolekowa oporność (ang. *multidrug resistance*)

**MFI:** średnia fluorescencja (ang. *mean fluorescence intensity*)

**ml:** mililitr

**MRD:** choroba resztkowa (ang. *minimal residual disease*)

**obr./min.:** obroty na minutę

**PBS:** buforowana fosforanami sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffered saline*)

**PCR:** łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*)

**pH :** ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych

**R-PE:** fikoerytryna (ang. *phycoerythrin*)

**RPE-Cy5:** fikoerytryna-cyjanina 5 (ang. *phycoerythrin-cyanin 5*)

**SDS:** siarczan dodecyłu

**SDS-PAGE:** elektroforeza w warunkach denaturujących (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**TdT:** terminalna transferaza dezoksynukleotydowa (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*)

**TEMED:** N, N, N', N'- tetrametyloetylenodiamina

**Tris:** trójhdroksymetyloaminometan

**TNF:** czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*)

**U/ml:** jednostki na mililitr

## 1. WSTĘP

### 1.1 Ostra białaczka limfoblastyczna.

Ostra białaczka limfoblastyczna ALL (ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*) jest najczęściej występującym typem białaczki w onkologii dziecięcej, stanowi ponad 70% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów u pacjentów poniżej 15 roku życia [1-3]. W Polsce białaczka diagnozowana jest u około 35 chorych na 1 milion dzieci każdego roku [3,4].

Intensywny rozwój i zastosowanie chemioterapii wraz z leczeniem wspomagającym przyczyniły się do znacznego wzrostu przeżycia i sukcesu terapeutycznego w grupie chorych z ALL, wynoszącego ponad 80% wyleczeń [5-10]

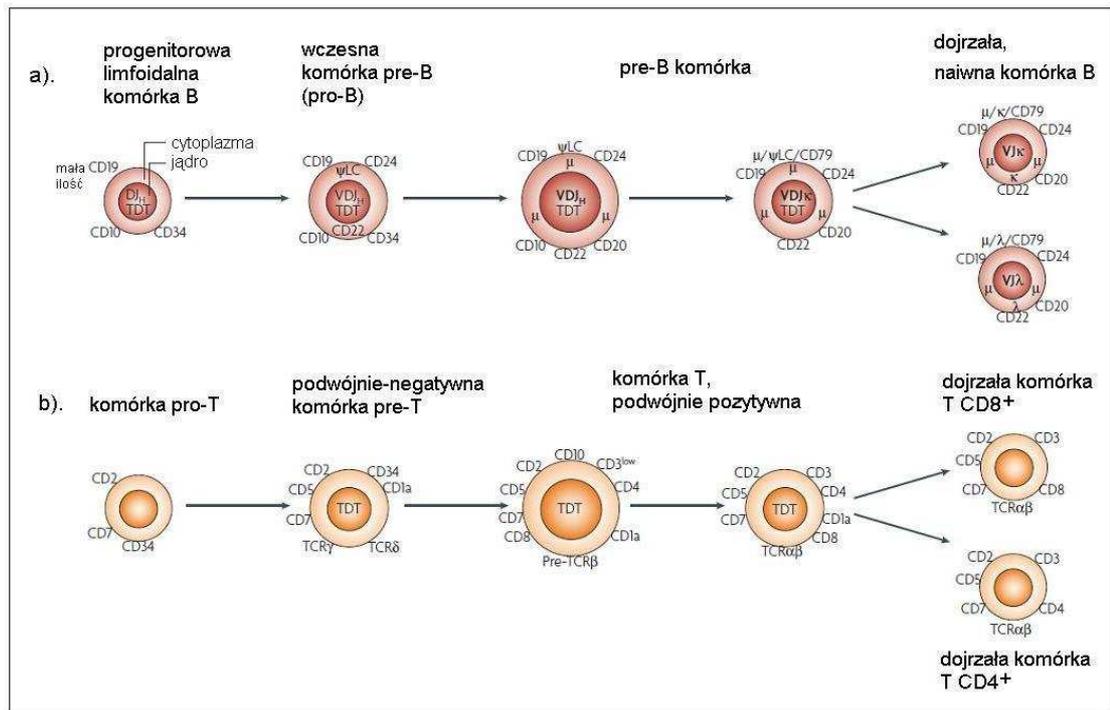
Przebieg choroby związany jest z nadmierną proliferacją komórek linii limfoidalnej B lub T, doprowadzającą do masowego zajęcia szpiku kostnego młodymi, niedojrzałymi formami limfoblastów [8,11]. Oprócz nasilonej proliferacji, blasty białaczkowe cechują się również zmniejszoną podatnością na czynniki wywołujące programowaną śmierć komórek (apoptozę), co w sumie prowadzi do zahamowania normalnej hematopoezy i rozwoju choroby [5,12,13]. Grupa ostrych białaczek dziecięcych jest silnie heterogenna; 70% wszystkich zdiagnozowanych przypadków ALL stanowi białaczka z prekursorowych komórek limfoidalnych linii B [14,15] o różnych stopniach zróżnicowania.

#### 1.1.1 Podział białaczek.

Proces różnicowania i dojrzewania limfocytów B i T związany jest z pojawianiem się poszczególnych antygenów na powierzchni komórki oraz cytoplazmatycznych immunoglobulin (te zjawiska przedstawiono schematycznie na rycinie 1). Kolejne stadia rozwoju młodych form komórek B związane są z pojawianiem się powierzchniowych antygenów CD34, CD10 i początkowo niedużej ilości CD19. Następnie, wczesne limfocyty B charakteryzują się obecnością na powierzchni komórek antygenów: CD10, CD19, CD24, CD34, CD45, HLA-DR oraz cytoplazmatycznych: CD22, CD79a, CD79b, TdT (terminalna transferaza

dezoksynukleotydom). Gdy kończy się faza limfocyta pre-B, znikają z jego powierzchni TdT, CD34 oraz CD10. Dojrzałe, naiwne limfocyty B wykazują obecność powierzchniowej immunoglobuliny M (IgM) oraz znacząco wzrasta ilość CD20 i CD21. Powyższe zmiany fenotypu mogą być wykrywane, co pozwala na określenie, z którego stadium różnicowania wywodzi się dana białaczka ALL, co rzutuje również na schemat leczenia.

Z kolei, dojrzewanie również pochodzących ze szpiku kostnego, prekursorów komórek T ma miejsce w grasicy, gdzie również poszczególne stadia rozwojowe mogą być rozpoznane na podstawie pojawiania się kolejnych receptorów. Młode formy pro-T wykazujące obecność powierzchniowych antygenów CD34, CD7, CD33, HLA-DR oraz CD2, wędrują z warstwy korowej grasicy do rdzenia, równocześnie dojrzewając. Najmłodsze tymocyty pre-T posiadają antygeny CD34, CD7, CD2 oraz cytoplazmatyczne CD3 i TdT, ale jeszcze nie CD4 lub CD8 (w związku z czym określane są jako komórki podwójnie negatywne = *double-negative cells*). Następnie, na ich powierzchni pojawiają się cząsteczki CD4 i CD8 (tymocyty stają się podwójnie pozytywne), natomiast znika CD34; wykazują one również obecność powierzchniowych antygenów CD1a, CD10 i niedużych ilości CD3. Ostatnie etapy dojrzewania odbywają się już w rdzeniu grasicy, gdzie tymocyty z wykształconym receptorem komórek T (TCR) oraz CD3, stają się pojedynczo-pozytywnymi komórkami o fenotypie albo CD4<sup>+</sup> albo CD8<sup>+</sup> [8].



**Rycina 1.** Schematyczny rozwój limfocyta B (a) oraz T (b), za Pui i wsp., [8], zmieniono.

Immunofenotypizacja badanych komórek szpiku kostnego, przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał monoklonalnych, umożliwia opisanie stopnia dojrzałości komórek B lub T, oraz ich prekursorów, a więc także określenie danego stadium rozwojowego limfoblastów białaczkowych i podtypu ALL. Klasyfikacja według Europejskiej Grupy ds. Immunologicznej Klasyfikacji Białaczek (EGIL - *European Group for Immunological Classification of Leukemia*) podaje podtypy ALL z linii B: pro-B, common, pre-B i dojrzałe B oraz z linii T: pro-T, pre-T, cortical T i mature T – Tabela 1. Zdarzają się jednak przypadki, gdy blasty nie wykazują obecności typowych determinant danego etapu rozwojowego komórki lub pojawiają się na nich równocześnie antygeny dwóch linii komórkowych (np. ostra białaczka dwufenotypowa) [16,17]. Określenie obecności charakterystycznych antygenów limfoblastów (immunofenotypizacja) z użyciem cytometru przepływowego [18-20], badania morfologiczne blastów (rozmaz szpiku kostnego) oraz ocena ich genotypu (patrz niżej) z zastosowaniem technik cytogenetycznych i molekularnych są obecnie standardowym postępowaniem w diagnostyce ALL [7,9,19].

<b>Podtypy ALL z linii limfocytów B</b>		
<u>nazwa</u>	<u>opis</u>	<u>charakterystyczne antygeny w diagnostyce</u>
<u>Pro-B</u>	ALL progenitorowa, z wczesnych prekursorów komórek B	powierzchniowe: HLA-DR, CD34, CD19 cytoplazmatyczne: CD22, CD79a, TdT
<u>Common</u>	najczęściej występujący typ ALL u dzieci	powierzchniowe: TdT, HLA-DR, CD34, CD19, CD10, zmiennie CD22, CD45, CD20
<u>Pre-B</u>	pojawia się u ok. 25% chorych	powierzchniowe: HLA-DR, CD19, CD20, CD22 i TdT cytoplazmatyczne: obecność łańcucha ciężkiego immunoglobuliny klasy IgM ( $\mu$ )
<u>Dojrzała B (B-cell)</u>	komórki większe niż B-prekursorowe, 2-5% wszystkich ALL	powierzchniowe: HLA-DR, CD19, CD20, CD22, łańcuchy ciężkie immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) i łańcuch lekki kappa ( $\kappa$ ) lub lambda ( $\lambda$ )
<b>Podtypy ALL z linii limfocytów T</b>		
<u>Pro-T</u>	kolejne fazy rozwoju młodych, różnicujących się tymocytów	powierzchniowe: zmiennie HLA-DR, CD34, CD7 cytoplazmatyczne: CD3 i TdT
<u>Pre-T</u>		powierzchniowe: CD7, CD2, CD5, zaczynają pojawiać się CD3, CD8 i CD4; często obecne CD10 cytoplazmatyczne: CD3 i TdT
<u>Cortical-T</u>		powierzchniowe: CD1a, CD3, CD7, CD2, CD5, CD8 lub CD4 cytoplazmatyczne: TdT i CD3
<u>Dojrzała T (T-cell)</u>		powierzchniowe: CD7, CD2, CD5, CD8 lub CD4, CD3; tu dwa typy receptora: TCR $\alpha/\beta$ lub TCR $\gamma/\delta$ cytoplazmatycznie: TdT

**Tabela 1.** Immunofenotypowa klasyfikacja ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL) wg EGIL, za Radwańska i wsp., [16], Balana-Nowak i wsp., [17].

### 1.1.2 Objawy choroby i terapia.

W konsekwencji klonalnej ekspansji nowotworowo zmienionych limfoblastów dochodzi do trzykładowej niewydolności szpiku - niedokrwistości, małopłytkowości i leukopenii, stąd najczęstsze objawy choroby ALL to ogólne

osłabienie, bladość, zaburzenia krzepnięcia w postaci skłonności do powstawania drobnych wybroczyn, siniaków i krwawień oraz niedobór prawidłowych leukocytów prowadzący do infekcji z gorączką i stanem zapalnym. Czasami dochodzi do znaczącego spadku masy ciała pacjenta, któremu towarzyszy apatia i brak łaknienia. Stosunkowo często mali pacjenci skarżą się na bóle kostne (naciekanie okostnej przez nowotworowe limfoblasty), zaś dość rzadko dochodzi do znacznej organomegalii (wątroba, śledziona, węzły chłonne obwodowe). Zmiany nowotworowe mogą obejmować też ośrodkowy układ nerwowy (OUN) [17,21,22].

Podstawą leczenia ostrych białaczek ALL jest polichemioterapia wraz z leczeniem wspomagającym, różna dla poszczególnych podtypów białaczek i określonych czynników ryzyka. Leczenie ostrych białaczek limfoblastycznych standardowo składa się z faz: indukcji remisji, konsolidacji (intensyfikacji) i terapii podtrzymującej remisję, aż do wyeliminowania choroby resztkowej MRD (ang. *minimal residual disease*). Celem pierwszej fazy indukcji jest wyeliminowanie ponad 99% początkowej liczby blastów nowotworowych, w celu przywrócenia normalnej hematopoezy. Podczas kolejnych faz terapii, dochodzi do wzmocnionego usuwania pozostałych komórek nowotworowych, by zminimalizować ryzyko nawrotu choroby. Leczenie trwa zazwyczaj około 12 miesięcy, ale może zająć również od 2 do 2,5 roku [9,22,23]. Allogeniczny przeszczep komórek hematopoetycznych jest stosowany w terapii białaczek ALL należących do najwyższej grupy ryzyka, np. z genotypem zawierającym chromosom Philadelphia czy bardzo słabą wstępną odpowiedzią na leczenie. Przeszczep polega na dożylnym podaniu tych komórek odpowiednio przygotowanemu choremu biorecy, doprowadzając do całkowitej lub częściowej wymiany i odbudowy szpikowego układu krwiotwórczego [9,23-25].

### **1.1.3 Czynniki rokownicze ALL.**

Wśród czynników prognostycznych choroby, wpływających na zastosowane leczenie, wymienia się dane laboratoryjne, biologiczne cechy blastów, morfologię zajętego szpiku kostnego. Klasycznymi czynnikami prognostycznymi choroby są wiek, wielkość wstępnej leukocytozy, wczesna odpowiedź na leczenie, obecność

resztkowej choroby nowotworowej MRD, immunofenotyp blastów [2,6,10,26,27]. Wśród czynników ryzyka wymienia się również płeć, obecność objawów pozaszpikowych, zajęcie ośrodkowego układu nerwowego, ocenę cytogenetyczną blastów [28-30].

Pewne czynniki genetyczne mają też potencjalne znaczenie prognostyczne lub terapeutyczne - translokacje chromosomalne i zmiany strukturalne w genach (np. ponad 25% wszystkich B-prekursorowych ALL związanych jest z translokacją t(12;21)(p13;q22), powodującą fuzję genów *TEL-AML1*, czy translokacją t(9;22) powodującą obecność chromosomu Philadelphia (fuzja *BCR-ABL1*), zaś przy białaczkach wywodzących się z linii komórek T ponad 50% mutacji dotyczy genu *NOTCH1* [9,31]. Zmiany mutacyjne zanotowano w dużej liczbie przypadków ALL w genach wpływających na rozwój limfocytów B np. *TCF3 EBF1*, *LEF1*, *IKZF1* i *IKZF3* [9].

Liczba chromosomów w kariotypie blastów jest również czynnikiem ryzyka. Hypodiploidia (oceniana jako liczba chromosomów mniejsza niż 44 na pojedynczy blast) stanowi negatywny czynnik rokowniczy, podczas gdy hyperdiploidia (ponad 50 chromosomów na blast), jak również trisomie chromosomów 4, 10 i 17 mogą rokować korzystnie [9,14,30,32,33]. Całość danych umożliwia dobranie odpowiedniego algorytmu leczenia i terapii. Poznanie nowych czynników prognostycznych oraz genetycznych nieprawidłowości w organizmie być może doprowadzi w przyszłości do rozwoju celowanej do danego pacjenta terapii, w drodze silnie zindywidualizowanej farmakogenomiki [9,34].

#### 1.1.4 Przyczyny ALL.

Mimo intensywnych badań, etiologia choroby ciągle pozostaje nie do końca poznana. Tylko mniej niż 5% przypadków ALL jest silnie związane z dziedzicznymi predyspozycjami (jak wystąpienie zespołu Downa, zespołu Blooma, zespołu Nijmegen, zespołu ataksja-teleangiektazja) [9]. Wystąpienie i rozwój choroby może mieć też związek z czynnikami środowiskowymi, jak wcześniejsza ekspozycja rodziców pacjenta ALL lub matki w czasie ciąży, na szkodliwe czynniki środowiskowe, w tym dym papierosowy [35,36], promieniowanie jonizujące [37], pestycydy [38] lub spożywanie leków, narkotyków oraz alkoholu [39-43]. Postuluje

się również hipotezę infekcyjną związaną z rozwojem ALL [37,44], jednak jak dotychczas nie znaleziono bezpośredniego dowodu na działanie czynnika infekcyjnego [42,43]. Z tą obserwacją wiąże się hipoteza chroniącego przed zachorowaniem na białaczkę ALL, wpływu długotrwałego karmienia dziecka piersią przez matkę [38,45,46]. Część autorów uznaje również, iż grypa lub zapalenie płuc w trakcie ciąży, może wiązać się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia białaczki u potomstwa [41,47,48]; zdania badaczy są podzielone, część z nich uważa, iż właśnie brak infekcji w niemowlęctwie jest czynnikiem ryzyka białaczki [37,49,50]. Ryzyko wystąpienia białaczki prawdopodobnie mogą podnosić także choroby przenoszone drogą płciową [41].

Mimo zastosowania nowoczesnej polichemioterapii, cały czas istnieją przypadki białaczki ALL odporne na leczenie lub wykazujące nawrót choroby. Stąd więc tak ważnym staje się poszukiwanie nowych czynników rokowniczych, markerów postępu choroby, potencjalnych celów diagnostycznych. Bazując na fakcie postulowanej zahamowanej apoptozy [51,52] w przebiegu ALL, za taki nowy czynnik rokowniczy można uznać aktywność enzymów z grupy kalpain, regulujących między innymi procesy śmierci komórki. Poszukiwanie nowych biologicznych markerów i uwzględnienie ich w algorytmach leczenia umożliwi lepsze poznanie patomechanizmu choroby.

## **1.2 Apoptoza – cel i przebieg procesu.**

Programowana śmierć komórkowa (apoptoza) to aktywny proces strukturalnych zmian w komórce, doprowadzających do jej planowanego unicestwienia [53]. Podczas zjawiska zachodzą morfologiczne i biochemiczne przemiany (np. permeabilizacja błony mitochondrium, kondensacja cytoplazmy, proteoliza białek i rozpad kwasów nukleinowych w komórce, re-aranżacje w budowie błon - przemieszczanie fosfatydylseryny na zewnątrz membrany) prowadzące do powstania ciał apoptotycznych, które są usuwane przez fagocytozę. Proces apoptozy różni się znacznie od nekrozy; zachodzi w pojedynczych komórkach i w drodze innego, ściśle planowanego mechanizmu [54-56]. Apoptoza

wraz z proliferacją i różnicowaniem, utrzymane w równowadze, gwarantują prawidłowy wzrost i funkcjonowanie całego organizmu [55,57].

Ponad sto białek jest zaangażowanych w proces apoptozy. Można je podzielić na cztery grupy funkcjonalne: białka wyzwalające proces, modulujące, efektorowe oraz substraty. Najważniejszą rodziną białek efektorowych (wykonawczych) jest system cysteinowych proteaz – kaspaz (ang. *cysteine aspartate-specific proteases*) [57-60]. Po uaktywnieniu kaspazy (w drodze kaskadowej reakcji proteolitycznej, od kaspazy inicjatorowej, do kaspazy wykonawczej) działają bezpośrednio na składniki komórki, doprowadzając do jej samobójczej śmierci [61-63].

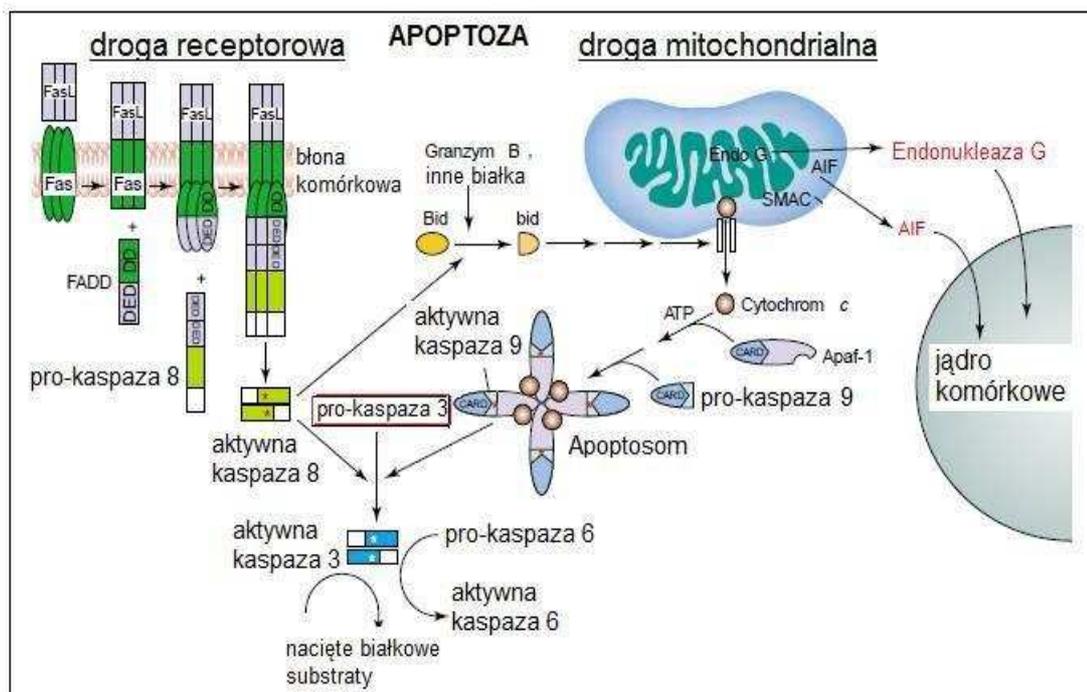
Istnieją dwie niezależne drogi aktywacji kaspaz. Jedna ze ścieżek to oddziaływanie zaczynające się od membranowych receptorów (droga zewnętrzna, receptorowa), zaś druga ścieżka indukcji dotyczy przemian w mitochondrium (droga mitochondrialna, wewnętrzna); przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

Droga receptorowa indukcji apoptozy związana jest z aktywacją kaspaz poprzez oddziaływanie liganda z receptorem (tzw. „receptory śmierci” Fas/CD95, TNF- $\alpha$  itd.). Na skutek tego połączenia powstaje kompleks DISC (ang. *death-inducing signaling complex*), który wpływa na uruchomienie inicjatorowej kaspazy 8, a następnie w drodze kaskadowej aktywacji kaspaz efektorowych: kaspazy 3, 6 i 7.

W drodze mitochondrialnej pod wpływem czynnika inicjującego apoptozę (np. uszkodzenie DNA komórki czy stres oksydacyjny) dochodzi do zaburzenia równowagi między pro- i anty-apoptocycznymi białkami (np. rodzina białek Bcl-2) co prowadzi m.in. do aktywacji i translokacji do wnętrza mitochondriów czynników Bid, Bax i Bak. Z ich udziałem w mitochondriach dochodzi do powstania porów, przez które do cytoplazmy komórki uwalnia się cytochrom c (czemu w komórkach nie ulegających apoptozie zapobiega działanie czynnika Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>). Skutkiem jest depolaryzacja mitochondrium jako jeden z pierwszych objawów programowanej śmierci komórki [64]. Uwolnione cząsteczki cytochromu c wraz z dATP, wchodzi w reakcję z nieaktywną formą cytoplazmatycznego czynnika Apaf-1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*), powodując jego aktywację i powstanie oligomerycznego kompleksu (około 700-1400 kDa) zwanego apoptosomem. Kompleks ten aktywuje inicjatorową kaspazę 9 dając czynny kompleks

enzymatyczny i prowadząc do aktywacji głównej kaspazy efektorowej - kaspazy 3. Faza egzekucji komórki może się zatem rozpocząć [55,62,63,65].

Apoptoza może się też odbywać w procesie niezależnym od kaspaz; zjawisko jest wtedy związane z oddziaływaniem czynnika mitochondrialnego AIF (ang. *Apoptosis Inducing Factor*) lub endonukleazą G [59,66-68].



**Rycina 2.** Ścieżka receptorowa i mitochondrialna prowadzące do apoptozy w komórce (za Kaufmann i wsp., [55], zmieniono).

### 1.2.1 Apoptoza w białaczkach.

Apoptoza jest naturalnym fizjologicznym procesem, lecz nieprawidłowy przebieg lub zmiany w jej występowaniu związane są z patologią wielu chorób nowotworowych. Supresja apoptozy łączy się często z rozwojem nowotworów i opornością na chemioterapię [54,55,57,69]. Komórki nowotworowe dzieląc się w sposób niekontrolowany w organizmie, równocześnie nie ulegają prawidłowemu różnicowaniu i wymykają się spod kontroli mechanizmów śmierci komórkowej, co doprowadza do ich masowej akumulacji.

Brak śmierci komórkowej jest kluczowy również w przebiegu nowotworów krwi – białaczek. Typowym przykładem białaczki o zahamowanej apoptozie nowotworowych komórek B jest przewlekła białaczka B-limfocytarna dorosłych (B-CLL (ang. *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) [70-72]. Czas przeżycia komórek jest tu znacząco dłuższy w porównaniu do zdrowych limfocytów B, zaś proliferacja nie różni się w stopniu istotnym od nienowotworowych limfocytów. Świadczy to o silnie zredukowanej apoptozie nowotworowych limfocytów B. Patomechanizm supresji apoptozy nowotworowych limfocytów B związany jest z oddziaływaniem czynników wewnątrzkomórkowych, jak również czynników występujących na zewnątrz komórki. W mechanizm choroby silnie zaangażowane są anty-apoptotyczne białka rodziny Bcl-2, czynnik NF- $\kappa$ B, kinaza białkowa PKC czy cytokiny. Wykazano również podwyższoną aktywność białek z rodziny IAF (ang. *Inhibitors of Apoptosis*), które hamują apoptozę, poprzez inaktywację kaspaz i prokaspaz [12,70]. Za brak apoptozy odpowiadać też może nadmierna aktywność enzymu  $\mu$ -kalpaina i towarzyszący jej w komórkach nowotworowych brak aktywności kaspazy-3 [73].

Upośledzoną apoptozę sygnalizuje się też w grupach ostrych białaczek. W komórkach białaczki szpikowej dorosłych AML (ang. *Acute Myeloid Leukemia*), wysoki poziom białka Bcl-2, zapobiegającego apoptozie, koreluje z gorszą odpowiedzią na zastosowaną chemioterapię. Zatem ilość białka anty-apoptotycznego (choć różnicowana w różnych podtypach AML), może być traktowana jako czynnik prognostyczny w przebiegu tej białaczki [57,65].

W przebiegu dziecięcych białaczek szpikowych i chłoniaków, postuluje się iż za brak apoptozy odpowiada upośledzenie receptorowego szlaku programowanej śmierci komórkowej. Przyczyną tego mogą być mutacje dotyczące powierzchniowego receptora komórki CD95 [13]. Zależność ta nie dotyczy jednak dziecięcej grupy ALL, gdzie nie udowodniono występowania istotnych mutacji w regionie genów kodujących powierzchniowe „receptory śmierci”.

Oporne na apoptozę blasty występują także w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci, co wpływa na akumulację nowotworowych komórek i brak remisji choroby [13,69]. Także wznowy ALL dotyczą częściej pacjentów, u których blasty już przy pierwszym rozpoznaniu choroby, wykazywały silną proliferację i zredukowaną apoptozę. Wykazano również, iż u pacjentów we

wznowie ALL, apoptoza blastów jest silniej zredukowana niż ma to miejsce w nowozdiagnozowanych białaczkach ALL [5]. W blastach, w porównaniu do zdrowych komórek B, wykazano nieprawidłowo wysoki poziom białka Bcl-2. Nadprodukcja tego białka hamuje apoptozę i koreluje z wydłużonym czasem życia komórek nowotworowych [74,75]. Brak apoptozy blastów ALL może stanowić zatem jeden z czynników prognostycznych choroby. Kwestia supresji apoptozy w blastach ALL jest sprawą złożoną, w której mechanizmy zaangażowane są różne systemy białkowe. Poznanie patomechanizmów i oddziaływań białek umożliwi lepsze poznanie szlaku apoptozy w białaczkowych blastach ALL.

### 1.3 System białkowy kalpaina-kalpastatyna (CCS).

System proteolityczny kalpaina-kalpastatyna (ang. *calpain-calpastatin system*, CCS) składa się z grupy proteaz określanych jako kalpainy oraz ich endogennych inhibitorów – kalpastatyn. Kalpainy są grupą wewnątrzkomórkowych (cytoplazmatycznych) proteaz cysteinowych; do swojej aktywacji wymagają odpowiednio wysokiego stężenia jonów wapnia [76,77]. Znajdowane są we wszystkich organizmach eukariotycznych i wielu *Procaryota*, odkryto również kalpainy występujące u roślin [78]. Rodzina kalpain składa się z klasycznej pary enzymów nie wykazujących ściśle określonego miejsca występowania, określanych jako typowe, 'wszędobylskie' albo ubikwistyczne ( $\mu$ -kalpaina i m-kalpaina – patrz niżej) oraz z liczniejszej grupy kalpain tkankowo - specyficznych, występujących w określonych narządach. W ludzkim genomie znaleziono jak do tej pory 15 genów kodujących kalpainy [77,79]. Kalpainy po raz pierwszy opisano i wyizolowano z mózgu szczura w 1964 roku [80], od tamtej pory stały się intensywnym obiektem badań w kontekście znaczenia fizjologicznego oraz roli w rozlicznych patologiach.

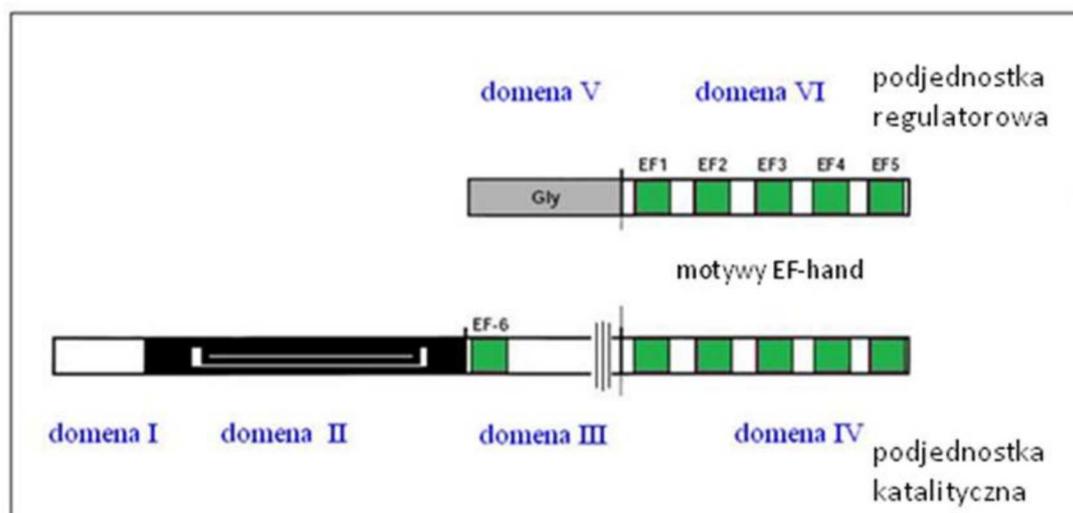
W niniejszej pracy badano wpływ klasycznych kalpain ( $\mu$ -kalpainy i m-kalpainy) na proces apoptozy w blastach ALL, stąd rola i znaczenie kalpain tkankowo-swoistych nie jest opisywane dalej ani w części opisowej, ani doświadczalnej.

### 1.3.1 Klasyczne kalpainy.

Najbardziej znane białka tego systemu to  $\mu$ -kalpaina (kalpaina I) i m-kalpaina (kalpaina II), nazwane tak od stężeń jonów wapnia wymaganych do pełnej aktywności proteolitycznej *in vitro*; odpowiednio  $\mu$ -kalpaina wymaga 1 – 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , a m-kalpaina 0,1 – 1  $\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  [76,77,81].

Zarówno m- jak i  $\mu$ -kalpaina wykazują podobną budowę domenową. Zbudowane są z dwóch podjednostek (rycina 3) - większej podjednostki katalitycznej (masa około 80 kDa, przy czym dla  $\mu$ -kalpainy wielkość ta wynosi 81,889 Da, zaś dla m-kalpainy około 79,900 Da) oraz mniejszej podjednostki regulatorowej (masa około 30 kDa, identyczna dla obu kalpain) [81]. Podjednostka większa jest podzielona na cztery domeny, w obrębie których domena II (cysteinowa domena proteazowa, składająca się dodatkowo z dwóch subdomen oraz części o budowie podobnej do kalmoduliny) i domena IV (wiązanie jonów wapnia) odpowiadają za właściwości katalityczne dużej podjednostki. Funkcja domeny I i III nie jest do końca jasna. Podjednostka regulatorowa jest zbudowana z dwóch domen: N-terminalnego, bogatego w glicynę regionu hydrofobowego (domena V) oraz C-terminalnej domeny VI odpowiadającej, podobnie jak domena IV, za wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Motywy EF-hand w domenach IV i VI związane są z utrzymaniem naturalnej konformacji enzymu - w postaci heterodimeru. Sama podjednostka duża jest mało stabilna, dopiero powstanie heterodimeru gwarantuje utrzymanie funkcjonalności enzymu [76,82-84]. Istnieją liczne białka będące homologami małej podjednostki kalpainowej, głównie należące do peptydowej rodziny z motywami strukturalnymi penta-EF-hand, jak np. sorcyna (patrz dalej) [81,85].

Struktura podjednostek obu izoenzymów jest silnie konserwowana ewolucyjnie wśród wszystkich kręgowców, świadcząc o dużym znaczeniu kalpain oraz zaangażowaniu w uniwersalne komórkowe funkcje [76,81,86].



**Rycina 3.** Schemat budowy domenowej kalpainy (za Sorimachi i wsp., [76], zmieniono).

### 1.3.2 Substraty kalpain.

Fizjologiczne znaczenie kalpain jest wielce istotne, gdyż ogromna liczba białek została zidentyfikowanych jako substraty kalpain w komórkach. Ponad sto peptydów występujących w komórkach uznanych jest za ich substraty, lista ta ciągle ulega wydłużeniu. Większość z nich można przydzielić do czterech głównych grup: białka cytoszkieletu komórki (głównie związane z interakcjami z błonami komórkowymi), kinazy i fosfatazy, białka związane z błonami (liczne receptory transmembranowe oraz białka kanałów jonowych) i rozliczne czynniki transkrypcyjne [76,81,87-89]. Do grupy cytoszkieletowych substratów kalpain należą między innymi: fodryna, kadheryna, katenina, kalponina, desmina, dystrofina, miozyna, synemina, spektryna, troponina, tubulina i wiele innych. Wśród grupy kinaz i fosfataz, ulegających nacięciu proteolitycznemu przez kalpainę znajdują się: kinaza białkowa C, kinaza receptora EGF, kalcyneuryna, fosfataza tyrozynowa PTP-1B i liczne inne enzymy. Kalpainy mogą również wpływać na ekspresję pewnych genów, poprzez oddziaływanie na substraty z grupy czynników transkrypcyjnych, takich jak: c-Jun, c-Fos, NFκB, STAT3, STAT5 czy p53. Tak wielka ilość substratów sugeruje ogromne zaangażowanie kalpain w podstawowe funkcje życiowe komórki.

Mimo tak licznej grupy substratów nie jest jasno określone jakimi charakterystycznymi cechami strukturalnymi odznaczają się wszystkie hydrolizowane przez kalpainy białka, czy peptydy. Wiadomo jednak, iż klasyczne kalpainy rozpoznają pewien ogólny wzorzec struktury pierwszo- i drugorzędowej białkowego substratu. Równie istotne są też specyficzne sekwencje w obrębie substratu, jak sekwencja aminokwasowa PEST, czyli region bogaty w reszty Pro (prolina), Glu/Asp (kwas glutaminowy/asparaginowy) i Ser/Thr (seryna/treonina) [90].

Chociaż kalpainy mogą całkowicie hydrolizować niektóre swoje substraty, na większość z nich nie działają jednak jak zwykle proteazy, ale drogą ograniczonej hydrolizy modulują ich aktywność i działanie [76,84,91]. Powyższa, regulowana biomodulacja substratów kalpain może prowadzić do przekazywania sygnałów w komórce, kontroli cyklu komórkowego czy proliferacji, a z drugiej strony także postuluje się ich rolę w regulacji apoptozy (np. w sposób pośredni lub przez bezpośrednie oddziaływanie na swoje substraty: kaspazy, czy białka rodziny Bcl-2, jak: Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bid, Bax ) [76,87,92-94].

Wśród biomodulowanych poprzez proteolityczne nacięcie substratów kalpain wymieniany jest także ich wewnątrzkomórkowy inhibitor – kalpastatyna, co jest kluczowe dla działania całego systemu kalpaina-kalpastatyna [95,96]. Również obie kalpainy, mogą być nawzajem swymi substratami, co jeszcze bardziej obrazuje skomplikowane interakcje w obrębie systemu kalpaina-kalpastatyna [91].

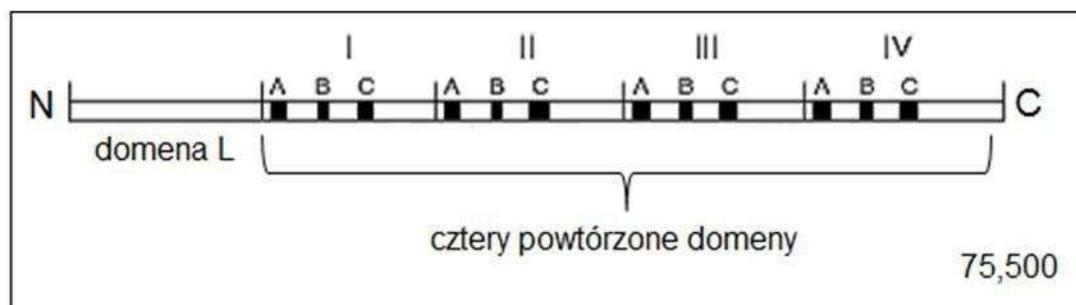
### **1.3.3 Kalpastatyna - wewnątrzkomórkowy inhibitor kalpain.**

Kalpastatyna jest jedynym znanym do tej pory, endogennym, występującym w tych samych komórkach, inhibitorem kalpain, nie wywierającym wpływu na inne enzymy [77,89,92]. Inhibicja kalpain odbywa się w sposób specyficzny i związana jest z budową domenową kalpastatyny i odpowiednim związaniem się inhibitora do enzymu. Kalpastatyna jest opisywana jako peptyd o masie w zakresie 34 do ok. 300 kDa. Użycie przynajmniej czterech różnych promotorów i mechanizmów alternatywnego splicingu sprawia, iż możliwe jest powstanie różnych polipeptydów z pojedynczego genu *CAST* [81]. Kalpastatyna o masie około 70 kDa jest najczęściej

występującą formą kalpastatyny w tkankach ludzkich, również w komórkach krwi [97].

Kalpastatyna składa się z domeny inhibicyjnej, powtórzonej cztery razy, oraz N-terminalnej domeny L. Każda z czterech domen hamuje jedną cząsteczkę kalpainy, ale ich efektywność inhibicyjna, zmniejsza się. Funkcja terminalnej domeny jest niejasna, gdyż sama nie ma właściwości inhibicyjnych (Rycina 4) [77,81].

Chociaż homologia sekwencji wśród kalpastatyny nie jest tak silna jak ma to miejsce dla kalpainy, blisko 65% wszystkich poddanych sekwencjonowaniu kalpastatyn wykazuje podobieństwo. Każda domena zawiera 3 krótkie, około 20 aminokwasowe subdomeny: A, B i C, niezbędne do efektywnej inhibicji kalpain. Proces ten wymaga związania kalpastatyny w trzech miejscach - subdomeny A w miejscu IV domeny kalpain, subdomeny C w miejscu VI domeny kalpain oraz subdomeny B blisko miejsca aktywnego enzymu - domeny II [89,98,99]. Zatem kalpastatyna hamuje kalpainę poprzez związanie się do miejsca aktywnego enzymu w drodze mechanizmu kompetycyjnego [92,100]. Ani subdomena A, ani C samodzielnie nie mają zdolności do inhibicji kalpain. Żeby doszło do inhibicji niezbędne jest odpowiednie stężenie jonów  $Ca^{2+}$  w komórce (porównywalne lub niższe ze stężeniem jonów  $Ca^{2+}$  potrzebnych do przeprowadzenia reakcji autolizy, uaktywniającej kalpainy). Nie ma dowodów by kalpastatyna była zdolna do związania jonów  $Ca^{2+}$ , tak więc wymagane stężenie  $Ca^{2+}$  służy do aktywacji kalpainy, która wydaje się być konieczna do połączenia kalpaina - kalpastatyna i do zahamowania aktywności enzymu [81].



**Rycina 4.** Schemat budowy ludzkiej kalpastatyny pochodzącej z wątroby (średnia masa cząsteczkowa wynosi około 70 kDa (Goll i wsp., [81], zmieniono).

### 1.3.4 Mechanizm funkcjonowania systemu kalpaina-kalpastatyna.

Mimo iż kalpainy są obiektem intensywnych badań od ponad 30 lat i stwierdzono niekwestionowany fakt ich ogromnej roli w zdrowej i patologicznej komórce, cały czas mechanizm ich regulacji pozostaje nieznany. Do funkcjonowania kalpain niezbędne jest, jak już wspomniano, odpowiednie mikro- lub milimolarnie stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , które przyłączają się w obrębie motywów EF-hand domen kalpainowych. Paradoksalny jest fakt, iż w warunkach fizjologicznych, stężenie wapnia w komórce nie jest wystarczająco wysokie do uaktywnienia kalpain, stąd nie do końca jest pewnym w jaki sposób aktywacja się odbywa [101]. Postuluje się tu rolę przyłączania pewnych fosfolipidów, aktywatorów, proces fosforylacji kalpainy, czy jej translokacji względem membrany [81,84,102].

Aktywacja kalpain wymaga poza przyłączeniem jonów wapnia, również wielu strukturalnych zmian w obrębie domen, związanych z cięciem autoproteolitycznym enzymu, odsłaniającym miejsce aktywne w obrębie podjednostki katalitycznej [81,103,104].

Z uwagi na wielkie znaczenie kalpain w komórkach i możliwe skutki ich działania, proces aktywacji systemu kalpaina - kalpastatyna musi być ściśle regulowany. Niekontrolowanej proteolizie kalpainowych substratów zapobiega obecność kalpastatyny - specyficznego inhibitora, który jest również szczególnym substratem dla aktywnej kalpainy. Kalpastatyna będąc substratem enzymu, wprawdzie ulega uaktywnieniu na skutek ograniczonej proteolizy dokonanej przez kalpainę, w warunkach odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Następnie, dopiero zaktywowana w ten sposób, zyskuje zdolność do inhibicji kompetycyjnej kalpain [84,92]. Procesy aktywacji systemu kalpaina - kalpastatyna odbywają się zatem w drodze dokładnie regulowanych, wzajemnych pętli sprzężeń zwrotnych. Równowaga musi być tu ściśle regulowana, gdyż nadmiar któregoś ze składników systemu może doprowadzać do patologii w komórce i rozwoju choroby [94,100].

Dodatkowo, należy wspomnieć tu o wzajemnych zależnościach między kalpainami a kaspazami (kluczowymi enzymami procesu apoptozy), które mogą być nawzajem swoimi substratami [61,91,96]. Kaspazy mogą również ciąć kalpastatynę, likwidując tym samym inhibitor dla kalpain i wpływając na ich aktywność [105].

### 1.3.5 Rola kalpain w patologiach.

Ważną rolę kalpain w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i tkanek uwiadcniają szczególnie patologie organizmu, gdzie dochodzi do zaburzeń w ich ilości i działaniu. Nieprawidłowe funkcjonowanie lub błędny poziom ekspresji kalpain stwierdzono w wielu różnych chorobach, między innymi w mózгах osób z chorobą Alzheimera, gdzie proteolityczne cięcie prekursorowego białka  $\beta$ -amyloidu oraz białka tau przez kalpainę I, wpływa na patomechanizm choroby [106,107]. Inne choroby związane z nieprawidłowym działaniem klasycznych kalpain to między innymi: choroba Huntingtona [108], choroba Parkinsona [109], udar i urazowe uszkodzenia mózgu [110] czy rozwój zaćmy [111] i wiele innych.

Kalpains grają też kluczową rolę regulacyjną podczas powstawania i rozwoju chorób nowotworowych, gdyż większość z ich substratów zaangażowanych jest w przebieg i kontrolę procesu proliferacji komórek. Nieprawidłowe aktywności kalpain wpływają na migrację i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych, a także na angiogenezę i redukcję apoptozy [94,112]. Wpływ kalpain na migrację komórek, a tym samym na proces rozprzestrzeniania się nowotworu w organizmie, wykazano w szeregu udokumentowanych badań. W rozwoju raka prostaty stanowią „molekularny przełącznik”, który wpływa na rozwój nowotworu. Proces ten związany jest z oddziaływaniem kalpains II na substraty z grupy czynników wzrostu oraz molekuł adhezyjnych, które wpływają na zdolności migracji komórek, a tym samym na proces inwazji nowotworowej [113,114]. Z kolei, obie kalpains:  $\mu$ - i  $m$ -, ulegając aktywacji doprowadzają do rozprzestrzeniania się komórek raka płuc i progresji tej choroby [112,115]. Podobnie wielkość ekspresji genu kodującego kalpainę I ulega znaczącym zmianom w licznych guzach litych, w porównaniu do zdrowej tkanki. Zmiany te są szczególnie obserwowane w komórkach raka jelita grubego i nerki, odnotowano również zależność między podwyższonym mRNA kalpains I, a tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych [116]. Jak już wspomniano, rola podwyższonego poziomu kalpains wiąże się tu z modulującym oddziaływaniem na jej białkowe substraty i wpływem na proliferację i migrację komórek nowotworowych.

W rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego, nowotworu występującego w tkankach miękkich, nadmiernej aktywności kalpainy towarzyszy drastycznie obniżona ilość kalpastatyny. Skutkuje to niszczącym działaniem obu kalpain na białka cytoszkieletu i zwiększoną zdolnością inwazji komórek nowotworowych w organizmie [112,117].

### 1.3.6 Wpływ kalpain na proces apoptozy w komórkach nowotworowych.

Kalpainy, które poprzez oddziaływanie na substraty są zaangażowane w rozliczne funkcje i procesy komórkowe, biorą także udział w procesach prowadzących do apoptozy. Zjawisko jest złożone, gdyż w pewnych komórkach i typach patologii enzymy te działają stymulująco na proces śmierci komórkowej, zaś w innych upośledzają go znacznie, co może doprowadzać np. do akumulacji nowotworowych komórek [73,76,87,93,96,118]. Działalność kalpain może być tu skierowana wobec kluczowych, nieaktywnych białek prowadzących apoptozę (np. kaspaz czy rodziny Bcl-2), czy pośrednio przeciwko czynnikom, które mogą aktywować te ostatnie [118]. Tym samym kalpaina przeprowadza biomodulację kluczowych białkowych czynników i enzymów apoptotycznych, uaktywniając je lub niszcząc. Aktywne enzymy z grupy kaspaz mogą rozkładać kalpastatynę i nasilać aktywność kalpain [94,105]. Z drugiej strony, gdy aktywność kalpainy w komórce jest nadmierna, może też doprowadzać do całkowitej degradacji istotnych białek (w tym kaspaz) i upośledzać tym sposobem apoptozę.

W komórkach czerniaka, leczonych cytostatykiem indukującym ich apoptozę, aktywność kalpain wzrasta znacząco w szybkim czasie po podaniu leku, wraz z procesem apoptozy, świadcząc o wielkim zaangażowaniu enzymu kalpainy w procesie śmierci komórki [119]. Znaczenie pro-apoptyczne kalpain wykazano też w komórkach raka płuc [120,121]. Podobnie, w komórkach raka piersi, traktowanych genisteiną (cytostatycznym flawonoidem, który podwyższa stężenie jonów  $Ca^{2+}$  w komórkach), wykazano silną aktywację  $\mu$ -kalpainy i kierowanie komórki na szlak apoptotyczny w drodze kaspazo-zależnej [112].

Podwyższoną ekspresję genów kalpain wykazano w komórkach nerwiaka płodowego (neuroblastoma) [122] i różnego typu glejaków [123,124]. Powyższej nadekspresji i nadmiernej aktywności kalpain, towarzyszy wzmożona aktywność

pro-apoptotycznego białka Bax, oraz kaspazy-3, co sugeruje rolę kalpain w procesie śmierci. Wiadomo też, że w komórkach raka jelita grubego zarówno aktywność i ilość białka m-kalpaina, znacząco wzrasta, przy równoczesnym spadku ilości kalpastatyny. Nadaktywna m-kalpaina następnie może degradować proteolitycznie białko p53, kontrolujące proces apoptozy, co wpływa na brak śmierci komórek raka jelita i rozwój choroby [125].

Nadekspresję kalpaina oraz związaną z tym faktem zakłóconą apoptozę zaobserwowano w szeregu schorzeń hematologicznych i nowotworowych linii komórkowych [73,126]. W grupie białaczek, nadmierną aktywność  $\mu$ -kalpaina i jej wpływ na procesy patologiczne stwierdzono w nowotworowych komórkach przewlekłej białaczki B – limfocytarnej [73]. Nadaktywność  $\mu$ -kalpaina koreluje tu z silnie obniżoną aktywnością kaspazy-3, sugerując wzajemne relacje tych białek w procesie zahamowanej apoptozy. Silnie uaktywniona kalpaina I wpływa również na redukcję kalpastatyny i zachwianie równowagi w systemie CCS [127]. Próby modulacji aktywności kalpain, z zastosowaniem różnych inhibitorów, powodują wzrost zjawiska programowanej śmierci komórkowej [73], co wykazuje istotnie anty-apoptotyczną rolę kalpaina I w nowotworowych limfocytach B. Zważywszy na powyższe doniesienia, kalpaina mogą być potencjalnym celem terapii anty-nowotworowej i być kluczowe podczas diagnostyki chorób. Wpływ na aktywność, często nadmierną, w nowotworowych komórkach, poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów stanowi wyzwanie i cel w leczeniu tych chorób.

Podsumowując, zachowanie równowagi składników w systemie kalpaina - kalpastatyna jest ogromnie istotne, gdyż nadmiar któregoś z tych białek może doprowadzić do zmian w funkcjonowaniu całej komórki.

Natomiast udział ewentualnych zmian ilości i aktywności, a w konsekwencji rola białek systemu CCS w przebiegu redukcji apoptozy blastów ALL jest ciągle niedostatecznie wyjaśniona, stanowi zatem jeden z głównych celów badawczych niniejszej pracy. Wiadomo, iż zablokowanie aktywności kalpain, przez zastosowanie syntetycznego inhibitora, wywołuje zjawisko apoptozy w liniach komórkowych [128], również białaczkowych ALL [126,129]. Wobec powyższych faktów, istotnym wydaje się poszukiwanie zależności między aktywnością białek systemu kalpaina –

kalpastatyna w blastach ALL o zahamowanej apoptozie. Literatura medyczna zawiera braki odnośnie funkcjonowania tych enzymów, ewentualnego związku z apoptozą czy korelacji z białkami regulatorowymi (np. sorcyna) w komórkach ALL pobranych bezpośrednio ze szpiku pacjentów przed leczeniem. Dane literaturowe, sugerujące anty-apoptotyczną rolę kalpain, opierają się głównie na doświadczeniach z użyciem nowotworowych linii komórkowych [126], brak jednak doniesień w oparciu o blasty ALL *ex vivo*. Ocena poziomu białek kalpainy i kalpastatyny oraz próba modulacji ich aktywności może pomóc w lepszym poznaniu patomechanizmów choroby ALL, odkryciu nowych czynników ryzyka czy próby znalezienia innych celów terapeutycznych.

#### **1.4. Sorcyna – białko regulatorowe.**

Sorcyna jest małym, 22kDa białkiem; jej nazwa jest skrótem od angielskich słów *soluble resistance-related calcium-binding protein* (*sorcina*). Należy do białkowej rodziny penta-EF-hand (PEF) - peptydów wiążących jony wapnia [130-133].

##### **1.4.1 Rola i budowa sorcyny.**

Początkowo opisywana była jako białko V19 i wiązana silnie z komórkami chemicznymi i liniami komórkowymi wykazującymi wielolekooporność MDR (ang. *multidrug resistance*) [134]. Nadekspresja sorcyny udowodniona w kolejnych badaniach i liniach komórkowych (np. K562), zaczęła być łączona ze zmianami stężenia jonów wapnia w komórce i związaną z tym jej rolą [135]. Z kolei za nadekspresję sorcyny być może odpowiada wspólna amplifikacja genu *SRI* wraz z genami leżącymi blisko niego (np. silna amplifikacja genu *MDR1* kodującego P-glikoproteinę, związanego z wielolekową opornością), zatem to zjawisko wspólnej ekspresji wpływałoby na nadmierną ilość produktu białkowego sorcyny w komórkach MDR [136-139].

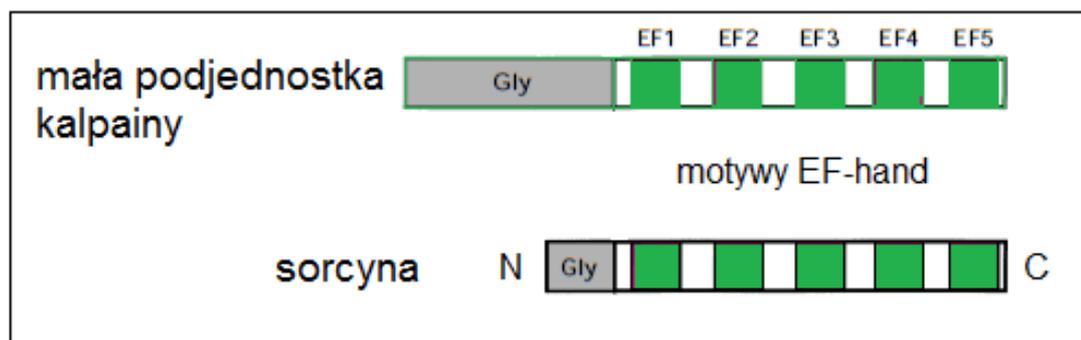
Obecność sorcyny i jej rola dotycząca wiązania jonów  $Ca^{2+}$  oraz funkcjonowania kanałów wapniowych została zauważona również w warunkach

fizjologicznych. Sorcyna jest znajdowana w rozlicznych typach tkanek, co świadczy o jej intensywnym zaangażowaniu w liczne procesy  $\text{Ca}^{2+}$ - zależne odnotowane m.in. w sercu, mięśniach (wiążanie się z receptorem ryanodynowym i podjednostką typu L w kanałach wapniowych), w mózgu, rdzeniu nadnerczy [132,140,141] czy erytrocytach [142].

Kliniczne znaczenie sorcyny, jako markera prognostycznego choroby, zostało wykazane w przebiegu ostrej białaczki szpikowej. W komórkach AML, o charakterze MDR, nadekspresja sorcyny korelowała z brakiem odpowiedzi na stosowaną terapię i brakiem remisji [139]. Również w licznych białaczkowych liniach komórkowych odkryto korelacje między nadekspresją sorcyny, a negatywną odpowiedzią na chemioterapię oraz zahamowaną apoptozą [143,144]. Jak dotychczas brak literaturowych danych na temat podobnych badań i zależności sorcyny w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej ALL u dzieci, co mogłoby się przyczynić do ustalenia nowych czynników rokowniczych przebiegu tej choroby.

Przy braku wapnia, sorcyna tworzy homodimery, gdzie pojedynczy monomer jest w stanie związać dwa jony wapnia. Pojawienie się jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , powoduje agregację oraz zmiany konformacyjne struktury peptydu [85,131,133]. Pojedynczy monomer sorcyny ma kulisty kształt, o wydłużonym końcu terminalnym N. Koniec C-terminalny zbudowany jest z licznych pętli oraz helis, które razem tworzą pięć motywów EF-hand sparowanych ze sobą. Ostatni motyw EF-hand (EF5) łączy się z analogicznym niesparowanym motywem drugiego monomeru sorcyny – całość tworzy asymetryczny homodimer białkowy [85,132].

Sorcyna wykazuje w swojej budowie silną homologię do domenowej budowy małej, regulatorowej podjednostki kalpaina, skład aminokwasów jest w 30% identyczny [85]. Koniec N-terminalny obu białek jest bogaty w glicynę i odpowiada za zdolność translokacji peptydów do membran, przy odpowiednim związaniu jonów wapnia za pomocą motywów EF-hand (rycina 5) [76,136,145]. Sorcyna (podobnie jak kalpaina) ma silnie konserwowaną ewolucyjnie strukturę aminokwasową [138,146,147]. Fakt ten, wraz z jej obecnością w licznych tkankach, świadczy o jej ważnej i wyspecjalizowanej funkcji w komórce.



**Rycina 5.** Podobieństwo strukturalne małej podjednostki regulatorowej kalpaina oraz sorcyny (za Sorimachi i wsp., [76], zmieniono).

Sorcyna, wiążąc wapń, wpływa na stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce, a poprzez to na procesy zależne od tego pierwiastka, w tym również aktywność kalpain. Ponadto, sorcyna posiada zdolność modulowania funkcji kanałów wapniowych świadcząc, iż może być ona zaangażowana w procesie transdukcji sygnału wapniowego. Z kolei rola tego sygnału (a tym samym pośrednio, sorcyny) jest ogromnie ważna dla procesu apoptozy. Wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje powstanie porów w błonie mitochondrialnej i uwolnienie do cytoplazmy cytochromu c, co wraz z oddziaływaniem białek pro-apoptotycznych rozpoczyna tworzenie apoptosomu i fazę programowanej śmierci komórki. Sorcyna działa też bezpośrednio na kaspazę 3, tym samym wywierając supresyjny efekt na apoptozę [148], wpływa też na poziom białek pro- i anty-apoptotycznych np. Bax i Bcl-2 [144]. Białka te są również udokumentowanymi substratami enzymu kalpaina [91,94,96,149,150].

Odpowiednio wysokie stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , jest też niezbędne dla funkcjonowania systemu CCS i biomodulacji przez nie substratów, często niezbędnych w czasie apoptozy. Zatem białka sorcyna i kalpaina, poza wspomnianą podobną budową strukturalną są również, przynajmniej pośrednio, zaangażowane w podobne, kluczowe procesy zachodzące w komórce. W świetle dostępnej literatury naukowej, brak jednak istotnych doniesień odnośnie wzajemnych zależności między białkami z rodziny kalpain a sorcyną, a zwłaszcza o istnieniu korelacji pomiędzy ich aktywnością w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej o zakłóconej apoptozie.

## 2. CELE PRACY

Ocena udziału białek systemu kalpaina - kalpastatyna oraz sorcyny w modulacji zdolności komórek ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) do apoptozy, poprzez:

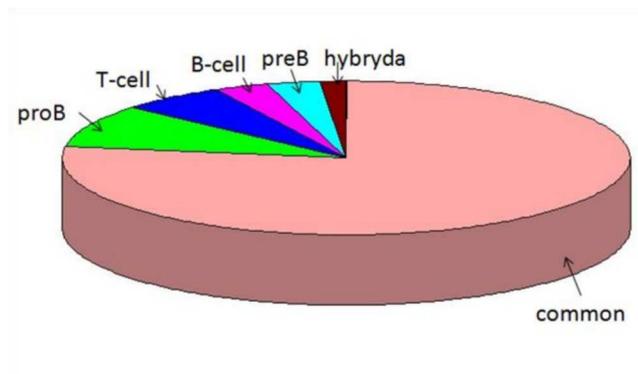
1. porównanie względnej ilości i aktywności kalpain oraz kalpastatyny w komórkach ALL i w komórkach szpiku wolnego od tej choroby
2. poszukiwanie korelacji uzyskanych wartości z podatnością na apoptozę komórek blastycznych od osób chorych na ALL
3. ocenę wpływu modyfikacji aktywności kalpain (*in vitro*) na zdolność wejścia komórek białaczkowych ALL w proces apoptozy
4. określenie ilości i aktywności sorcyny oraz ewentualnie korelacji z ilością i aktywnością białek systemu CCS

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Charakterystyka badanych grup.

Materiał badawczy w pracy stanowiły jednojądrzaste komórki pochodzące ze szpiku kostnego BM MNC (ang. *Bone Marrow Mononuclear Cells*), od następujących grup pacjentów:

1). **Ostra białaczka limfoblastyczna ALL.** W grupie 66 dzieci z ALL najmłodszy pacjent miał 2,5 miesiąca, zaś najstarszy 17,6 lat (mediana dla wieku 5,68 lat). Rozkład płci był równomierny - do grupy badawczej włączono 35 chłopców i 31 dziewczynek. Również rozkład wieku w zależności od płci pacjenta był podobny - mediana wieku chłopców to 6,05, a dziewczynek 5,67 lat. Pacjentów podzielono także na trzy grupy wiekowe: poniżej 1 roku życia, od 1 roku do 10 lat oraz powyżej 10 lat. Do grupy pacjentów najmłodszych należała tylko jedna osoba, zdecydowana większość to pacjenci starsi (dwie pozostałe grupy wiekowe: odpowiednio 49 oraz 16 osób badanych). Białaczka ALL wywodząca się z linii komórek B wystąpiła u 62 (93,9%) dzieci (tu 1 osoba z rozpoznaniem białaczki typu hybrydowego ALL/AML, pacjent włączony do grupy badanej, gdyż leczony schematem dla ALL), zaś z linii T tylko u 4 (6,1%) dzieci badanych. U 60 (90,9%) dzieci wystąpiła białaczka pochodząca z prekursorów B-komórkowych (7 proB, 51 common, 2 preB,), zaś u 2 (3%) dzieci białaczka dojrzała B-komórkowa. Rozkład powyższych rozpoznań fenotypów immunologicznych przedstawiono na rycinie 6:



**Rycina 6.** Rozkład typów immunologicznych nowotworu u 66 badanych pacjentów ALL. W grupie badanej podtyp pro-B wynosił 10,6% (n=7), common 77,3% (n=51), pre-B 3% (n=2), B-komórkowa B-cell 3% (n=2), oraz T-komórkowa T-cell 6,1% (n=4).

Wyszczególniono wstępne parametry kliniczne, oceniane jako negatywne rokowniczo. Zatem hiperleukocytoza wynosząca  $WBC >50000/\mu l$  wystąpiła u 12 (18,2%) pacjentów, stężenie hemoglobiny  $Hb < 7g\%$  u 20 (30,3%) pacjentów, a małopłytkowość  $PLT < 50000$  u 28 (42,4%) chorych. Zajęcie ośrodkowego układu nerwowego w stopniu CNS3 odnotowano u 6 (9,1%) chorych oraz w stopniu CNS2 u 1 (1,5%) chorego, u reszty 59 (89,4%) osób chorych nie obserwowano wstępnego zajęcia narządu.

Pacjentów kwalifikowano do grup ryzyka zgodnie z obowiązującym w Polskiej Pediatricznej Grupie ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków protokołem ALL-IC, w oparciu o trzy grupy ryzyka. W zależności od grup ryzyka: 20 pacjentów znalazło się w grupie standardowego ryzyka (SR), 30 średniego (IR), 11 w wysokiego (HR), zaś 5 nie zostało przydzielonych do powyższych grup.

Wśród 3 osób wystąpiła wznowa procesu nowotworzenia, 4 dzieci zmarło, reszta pacjentów znajduje się pod kontrolą lekarską.

2). Z oczywistych względów niemożliwe był uzyskanie próbek szpiku od zdrowych dzieci. W związku z tym **grupę porównawczą** (N=21) stanowili pacjenci Poradni Hematologii Dziecięcej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, którzy trafili pod opiekę Poradni z powodu problemów hematologicznych wymagających rozpoznania. Diagnostyka tych chorób wymagała pobrania szpiku, którego część posłużyła do niniejszych badań. W grupie, której komórki traktowano jako porównawcze do blastów ALL, na podstawie diagnostycznej biopsji szpiku kostnego wykluczono chorobę rozrostową (kryterium podstawowe).

Wiek dzieci wahał się od 3,5 do 17,9 lat (mediana wieku 6,5 lat). Rozkład płci równomierny - 11 chłopców oraz 10 dziewczynek (specyfika doboru grupy opisana poniżej). Większość stanowili tu pacjenci z małopłytkowością (6 osób), u których wykonano diagnostyczną biopsję krwi szpikowej, by wykluczyć chorobę nowotworową. Do grupy porównawczej zakwalifikowano również pacjentów z rozpoznaniem: leukopenii (3 pacjentów), neutropenii cyklicznej (3), sferocytozy (2), anemii niedoborowej (2) i hemolitycznej (2), mononukleozy (1), cytomegalii (1), kolagenozy (1).

Do grupy porównawczej włączono również dodatkowo grupę 13 pacjentów z ostrą białaczką szpikową AML. Z uwagi iż jest to białaczka o innej biologii, zdecydowano się na wyodrębnienie jej jako dodatkowej grupy porównawczej. Grupa ta charakteryzuje się niejednorodnym rozkładem płci - 11 chłopców i 2 dziewczynki, wiek pacjentów wynosił od 0,5 do 17,9 lat (mediana 10,9). Grupa ta została włączona tylko w kilka testów i analiz, stąd jej stosunkowo mała liczebność.

W badaniach własnych brano pod uwagę takie parametry kliniczne jak: płeć, wiek, rozpoznanie czy grupa ryzyka. Jak wspomniano, pacjenci byli podzieleni pod względem wieku na trzy grupy. Kwalifikowano ich też do trzech grup ryzyka: standardowego SR, pośredniego IR i wysokiego HR, zgodnie z obowiązującym protokołem ALL-IC. Ocena morfologiczna przeprowadzana była wg FAB (L1, L2, L3) oraz immunofenotypu. Oceniano również parametry wstępnego zaawansowania choroby, takie jak leukocytoza i blastoza wstępna, poziom hemoglobiny, liczba płytek krwi we krwi obwodowej czy odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym. Krew szpikowa pobrana od pacjentów stanowiła przede wszystkim materiał do rutynowych badań diagnostycznych (takich jak ocena mikroskopowa, ustalenie fenotypu immunologicznego, badania genetyczne i molekularne Kliniki Pediatrii), stąd często jej ilość była niewielka i niewystarczająca na wszystkie zaplanowane wcześniej doświadczenia pracy doktorskiej. Ilość szpiku uzyskiwanego na badania wahała się od 0,5 do 12 ml (średnia 2 ml); u pacjentów starszych możliwe było pobranie większej ilości krwi szpikowej, niż u licznej grupy młodszych. Ta sama próbka szpiku była również materiałem badawczym w projekcie naukowym G-3 (kierownik dr Anna Płoszyńska), ograniczając również pulę badanych przeze

mnie blastów białaczkowych. Tym samym dostępny materiał był często skąpy i niemożliwe było wykonanie całego panelu badań naukowych, również nie zawsze liczba komórek była wystarczająca do badań cytometrycznych i molekularnych. Te braki w materiale badawczym, tłumaczą, iż nie wszystkie testy są przeprowadzone w tej samej grupie osób chorych; część badań wykonana jest na pewnej grupie z osób włączonych do projektu, inne testy są wykonane już na blastach pochodzących od innych pacjentów, co za każdym razem odnotowano przy analizie wyników. Z oczywistych względów od małych pacjentów pobierana była tylko absolutnie minimalna ilość szpiku, zatem badania mogły być przeprowadzane tylko na tym materiale, który był dostępny po zakończeniu diagnostyki.

Wszyscy pacjenci znajdowali się pod opieką Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Anna Balcerska) oraz w ostatnim roku niniejszych badań również Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Na badania do pracy doktorskiej otrzymano zgodę nr 221/2007 Lokalnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Autorka składa serdeczne podziękowania prof. Annie Balcerskiej oraz dr Annie Płoszyńskiej, za zgodę na przeprowadzenie niniejszych badań, udostępnienie materiału badawczego oraz charakterystyki klinicznej badanych osób.

### **3.2 Immunofenotypizacja komórek uzyskanych od chorych z zastosowaniem markerów powierzchniowych.**

Szpik kostny pobierany był jałowo do próbek zawierających heparynę bez konserwantów w ilości 20 IU/ml szpiku. Celem wstępnej diagnostyki wykonywana była immunofenotypizacja pozyskanego od chorych materiału, z użyciem odpowiednich przeciwciał skierowanych przeciwko receptorom powierzchniowym komórek, metodą cytometrii przepływowej. W tym celu wykorzystywano przeciwciała sprzężone z odpowiednimi fluorochromami, według wzorca:

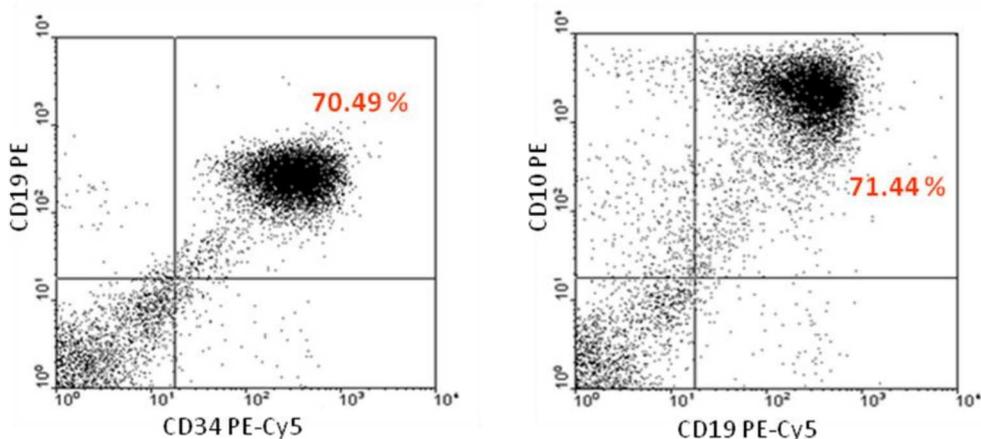
1. PE anti-CD10 oraz PE-Cy5 anti-19
2. PE anti-19 oraz PE-Cy5 anti-34,
3. PE anti-7 oraz PE-Cy5 anti-34,
4. PE anti-13 oraz PE-Cy5 anti-33.

Wszystkie przeciwciała były produkcji Becton Dickinson, USA.

Związanie się powyższych immunoglobulin do powierzchni badanych komórek pozwalało wstępnie ocenić fenotyp immunologiczny pobranego szpiku. Dodatkowo stosowano również przeciwciała PE anti-CD4 oraz PE-Cy5 anti-CD8, celem oceny czy próbka szpiku nie zawiera znacznych ilości krwi obwodowej. Kontrolę izotypową stanowiły immunoglobuliny, sprzężone z odpowiednimi fluorochromami, bez swoistości antygenowej.

Do próbki krwi szpikowej w ilości 30µl na próbkę cytometryczną (Falcon, Becton Dickinson, USA), dodawano po 5µl odpowiednich przeciwciał i inkubowano 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej próbki dodawano 2 ml roztworu do lizy (0,83% NH<sub>4</sub>Cl, 0,1%KHCO<sub>3</sub>), celem usunięcia erytrocytów i po 15 minutowej inkubacji komórki szpiku poddano wirowaniu (2 tys. obrotów/min. przez 5 minut – wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R) oraz płukaniu roztworem PBS (1,42% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 0,27% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 8,76% NaCl; 0,2% NaN<sub>3</sub>). Przygotowane w ten sposób komórki analizowano z użyciem cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson, USA). Standardowo, blasty białaczkowe wywodzące się z linii limfocytów B wykazywały fenotyp CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> i stanowiły nie mniej niż 70-80% jądrzastych komórek szpiku, stąd nie było konieczności dodatkowego ich oczyszczania do molekularnych testów białek CCS i RNA (rycina 7).

Wykonanie powyższej oceny cytometrycznej miało na celu bardzo wstępną analizę immunologiczną komórek szpiku kostnego w dniu pobrania materiału oraz ocenę proporcji blastów białaczkowych do ewentualnych komórek zdrowych w badanym materiale. Analiza ta nie miała mocy szpitalnego badania diagnostycznego, za każdym razem jako ostateczną diagnozę i rozpoznanie choroby uważana była tylko i wyłącznie opinia lekarzy z Kliniki Pediatrii.



**Rycina 7.** Przykładowy wynik ustalania immunofenotypu CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> komórek próbki szpiku kostnego, z zastosowaniem przeciwciał wiążących się do markerów powierzchniowych komórki. Podana analiza wstępna pozwala ocenić liczbę blastów na ponad 70% w badanym szpiku.

### 3.3 Izolacja komórek jednojądrzastych ze szpiku.

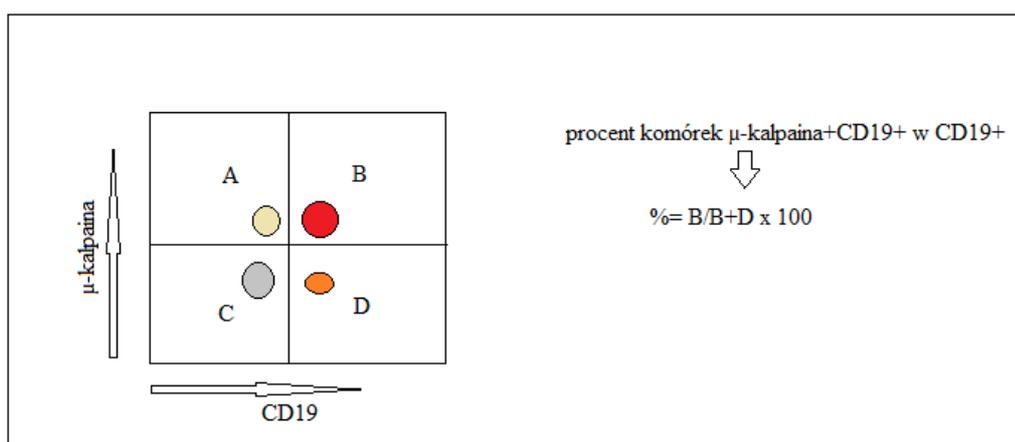
Szpik kostny pobrany do próbek zawierających heparynę, rozcieńczano dwukrotnie medium hodowlanym RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) zawierającym 50U/ml penicyliny oraz 50µg/ml streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA). Następnie nakładano badaną próbkę szpiku na Ficoll-Histopaque (Sigma Chemical Co., USA), w proporcji 3 Ficoll: 7 materiał i wirowano 30 minut przy 2000 obr/min. Komórki jednojądrzaste znajdujące się między osoczem, a warstwą Histopaque zbierano do dalszych badań i po dwukrotnym płukaniu buforem RPMI z dodatkiem antybiotyków, liczono przy użyciu kamery hematologicznej typu Neubauera. Wyizolowane blasty dzielono do dalszych testów *ex vivo* oceny ilości białek systemu CCS po 300 tysięcy na próbkę (opis poniżej) oraz porcjowano do zamrożenia na późniejsze badania molekularne. Pelety komórek zawierające 2 lub 4

miliony blastów, poddawano głębokiemu mrożeniu w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Analiza ilości $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy oraz kalpastatyny w jednojądrzastych komórkach szpiku (blasty ALL oraz komórki grupy porównawczej).

W celu określenia ilości  $\mu$ - i m-kalpainy, jak również ich wewnątrzkomórkowego inhibitora kalpastatyny, posłużono się techniką cytometrii przepływowej. W tym celu wyliczono procent komórek ALL o fenotypach  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, jak również średnią intensywność fluorescencji MFI (ang. *Mean Fluorescence Intensity*) znacznika PE łączącego się z przeciwciałem przeciwko powyższym białkom systemu kalpainowego w cytoplazmie komórek CD19<sup>+</sup>.

Procent komórek CD19<sup>+</sup> zawierających wewnątrzkomórkową  $\mu$ -kalpainę, wiążącą się ze znakującym ją przeciwciałem, obliczano względem całkowitej liczby komórek CD19<sup>+</sup> (by wyeliminować efekt logicznie podwyższonej ilości odsetka komórek CD19<sup>+</sup> u pacjentów ALL w stosunku do kontroli), zgodnie z ryciną 8:



**Rycina 8.** Graficzne przedstawienie sposobu wyliczenia odsetka procentowego komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w populacji wszystkich komórek CD19<sup>+</sup>

Do oznaczenia względnej ilości białek systemu kalpainowego wewnątrz komórek CD19<sup>+</sup> użyto mysich, monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko:  $\mu$ -kalpainie (przeciwciało 1 - nr katalogowy 550935, Becton Dickinson, USA oraz przeciwciało 2 - ab16680, Abcam, Wielka Brytania), m-kalpainie (ab3588, Abcam, Wielka Brytania) oraz kalpastatynie (ab12217, Abcam, Wielka Brytania). Powyższe przeciwciała nie są sprzężone z fluorochromami; zastosowano więc szczurze przeciwciało monoklonalne, skierowane przeciwko mysim immunoglobulinom, złączone z barwnikiem R-fikoerytryną (R-PE), (nr katalogowy 550083, Becton Dickinson, USA), by możliwa była detekcja powyższych nieoznakowanych przeciwciał w wyniku dwustopniowego wyznakowania. W tym celu wyizolowane blasty ALL lub komórki szpiku grupy porównawczej rozdzielano po 300 tysięcy na próbkę i utrwalano 2% roztworem paraformaldehydu przez 15 minut, w temperaturze 4°C. Następnie komórki płukano roztworem PBS, a następnie permeabilizowano mieszaniną PBS z 0,25% saponiną, po czym dodawano do kolejnych próbek po 5  $\mu$ l przeciwciał przeciwko obu kalpainom oraz kalpastatynie. Komórki z przeciwciałami inkubowano 30 minut, w ciemności, na lodzie. Po tym czasie płukano je kolejny raz roztworem PBS z 0,25% saponiną i dodawano 2-rzędowe szczurze przeciwciało koniugowane z fluorochromem, w ilości po 5  $\mu$ l na próbkę. Po kolejnej 30-minutowej inkubacji (w ciemności, na lodzie), komórki wypłukano roztworem PBS z dodatkiem saponiny, a po odwirowaniu przeprowadzono drugie płukanie samym roztworem PBS. Następnie wyznakowano receptory powierzchniowe błony komórkowej - w tym celu do każdej próbki dodano po 5  $\mu$ l odpowiednio koniugowanych przeciwciał anty-CD19 (oraz anty-CD34 lub CD10), po czym inkubowano jak powyżej. Nadmiar niezwiązanych przeciwciał usunięto poprzez dwukrotne płukanie 2 ml roztworu PBS. Tak przygotowane komórki posłużyły do cytometrycznej oceny ilości białek systemu kalpainowego w badanych próbkach.

Analogicznie wykonano negatywną kontrolę izotypową, gdzie w identycznych warunkach do zawiesiny komórek dodano oczyszczone mysie immunoglobuliny tej samej klasy, ale bez swoistości antygenowej (Becton Dickinson, USA), a następnie szczurze przeciwciało sprzężone z PE. Podobnej kontroli izotypowej użyto wobec komórek, w których oceniano ekspresję receptora CD19<sup>+</sup>.

W badaniach konieczne było użycie dwóch różnych przeciwciał skierowanych przeciwko  $\mu$ -kalpainie (dane powyżej), w związku z faktem, iż firma Becton Dickinson przestała produkować produkt, niezbędny do planowanych testów, po wykonaniu prawie połowy zaplanowanych doświadczeń. Analizę wyników otrzymanych z wykorzystaniem obu przeciwciał przeprowadzono osobno w celu wykrycia ewentualnych różnic w sile barwienia wykrywanego antygeny, zaznaczając przy wykresach, która immunoglobulina była zastosowana w testach. Przeciwciała stosowane w początkowych etapach pracy, określano dalej w rozdziale Wyniki, jako **przeciwciało 1**, zaś produkt który zastąpił je, opisywane jest jako **przeciwciało 2**.

### 3.5 Ocena apoptozy w blastach ALL.

Proces apoptozy ulega w blastach ALL znacznemu zahamowaniu, co wraz z intensywną proliferacją doprowadza do niekontrolowanego rozplemu komórek blastycznych i rozwoju nowotworu. Zahamowanie apoptozy odpowiada w równej mierze, jak intensywna proliferacja, za kumulację komórek nowotworowych w szpiku kostnym [5,8,12,13].

W tej pracy oceniano apoptozę zachodzącą spontanicznie w blastach ALL *ex vivo* poprzez zastosowanie technik cytometrycznych z użyciem Aneksyny V oraz sondy JC1. W celu oceny bezpośredniego udziału aktywności kalpainy w zahamowaniu apoptozy blastów ALL, wielkość apoptozy w blastach oceniano także po ich 24-godzinnej inkubacji *in vitro* z dodatkiem inhibitora IV kalpain.

#### 3.5.1 Pomiar apoptozy spontanicznej w komórkach ALL oraz nie-ALL z zastosowaniem Aneksyny V.

Apoptozę spontaniczną, zarówno w blastach ALL, jak i nienowotworowych komórkach CD19<sup>+</sup>, mierzono jako zdolność powierzchni komórek do wiązania się z PE-Aneksyną V (Becton Dickinson, USA). Badano w ten sposób utratę polaryzacji błony komórkowej, jako jeden z etapów śmierci komórkowej, prowadzącej do pojawienia się w jej zewnętrznej warstwie fosfatydyloseryny, z którą łączy się Aneksyna V [151,152]. Stosowano również 7-amino-aktynomycynę D (7-AAD,

Becton Dickinson, USA), która interkaluje między zasady DNA komórek o uszkodzonych błonach komórkowych (apoptotycznych i nekrotycznych). Komórki połączone tylko z Aneksyną V określamy jako wczesno-apoptotyczne, zaś gdy dołącza do nich również 7-AAD jako późno-apoptotyczne.

Blasty ALL, wyizolowane (zgodnie z opisem w części 3.3.) i wyznakowane poprzez związanie na powierzchni błony przeciwciała FITC-anty-CD19 (inkubacja 30 minut z przeciwciałem w ilości 5µl, płukanie roztworem PBS), zawieszano w buforze wiążącym Aneksyny V (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>; Becton Dickinson, USA). Bufor 10 razy stężony rozcieńczano przed użyciem, zgodnie z zaleceniami producenta, do stężenia roboczego 1-krotnego (przez dodanie do jednej części buforu wyjściowego dziewięciu części destylowanej wody). Blasty w stężeniu 1x10<sup>5</sup>, zawieszano w 100µl buforu wiążącego i dodawano po 5µl roztworu PE Aneksyny V oraz 7-AAD. Po inkubacji (15 minut, w ciemności w temperaturze pokojowej), do próbek dodawano 400µl buforu wiążącego i dokonywano odczytu cytometrycznego.

### **3.5.2 Hodowle komórkowe z zastosowaniem inhibitora IV kalpaina: ocena wpływu zahamowania aktywności kalpaina na spontaniczną apoptozę blastów ALL.**

Blasty ALL wyizolowane zgodnie z podaną wyżej procedurą zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) zawierającym 10% surowicy cielęcej płodowej (FCS, Sigma Chemical Co., USA), 2mM L-glutaminy (Sigma Chemical Co., USA), 50U/ml penicyliny oraz 50µg/ml streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA). Następnie przenoszono je w ilości 2x10<sup>6</sup>/ml na dołek do sterylnej płytki hodowlanej (Becton Dickinson, USA) i inkubowano w 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 100% wilgotności przez 24 godziny. Do poszczególnych dołków hodowlanych dodawano inhibitor IV kalpaina w różnych stężeniach; kontrolne blasty ALL hodowano równolegle bez dodatku inhibitora. Inhibitor IV (*synthetic tripeptide aldehyde*, sekwencja białkowa Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F, gdzie Z= benzyloksykarbonylo-, Calbiochem, Wielka Brytania) jest silnie działającym związkiem, zdolnym do przenikania przez błony komórkowe i nieodwracalnego zablokowania aktywności kalpaina. W badaniach stosowano różne

stężenia inhibitora w zakresie od 1  $\mu$ M do 8  $\mu$ M, by ocenić efekt jego dawki na proces depolaryzacji membrany mitochondrium, oceniany cytometrycznie z użyciem sondy JC-1.

### **3.5.3 Pomiar zmiany potencjału błony mitochondrialnej z zastosowaniem sondy JC1 w blastach ALL *ex vivo* oraz w 24 godzinnych hodowlach komórkowych *in vitro*.**

Oceniając rolę systemu kalpaina-kalpastatyna w procesie apoptozy blastów ALL wykorzystano pomiar depolaryzacji błony mitochondrialnej ocenianej cytometrycznie w komórkach blastycznych barwionych fluorochromem JC1. Barwnik kationowy JC1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny; Molecular Probes) zastosowany do wyznakowania zdrowych, proliferujących komórek jest wykrywany zarówno jako forma monomeryczna (fluoryzująca zielono) w cytoplazmie komórek oraz liczne czerwono fluoryzujące agregaty w mitochondriach. W komórkach apoptotycznych, na skutek spadku potencjału błonowego mitochondriów, utrudniona jest akumulacja JC1 w ich wnętrzu i agregacja sondy, zatem w tychże komórkach dominują monomery JC1, rozsiiane w cytoplazmie [64,152,153].

Blasty ALL hodowane 24 godziny (z dodatkiem inhibitora IV kalpain lub bez) zbierano z dołków hodowlanych, płukano roztworem PBS, znakowano powierzchniowe receptory CD19 stosując odpowiednie przeciwciało, zgodnie z opisaną powyżej procedurą. Następnie komórki w ilości  $5 \times 10^5$  zawieszano w 500  $\mu$ l roztworu PBS i inkubowano z 2  $\mu$ l barwnika kationowego JC1 o stężeniu 2mg/ml, w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Później komórki płukano trzykrotnie roztworem PBS i poddawano odcytowi cytometrycznemu. Identyczną inkubację blastów ALL z JC1 i odczyt cytometryczny wykonano dla tych samych komórek bezpośrednio po wyizolowaniu jednojądrzastych komórek ze szpiku kostnego. Oceniano więc względną wielkość potencjału membranowego mitochondriów w blastach również *ex vivo*, jako miarę wyjściowego poziomu apoptozy spontanicznej w hodowanych dalej blastach.

### **3.6 Cytometria przepływowa.**

Fenotyp receptorów powierzchniowych blastów, ilość białek systemu kalpaina-kalpastatyna oraz natężenie procesu apoptozy oceniano z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Używano cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson, USA), w którym dla każdej badanej próbki zliczano 20 tysięcy komórek używając oprogramowania CellQuest (BD, USA). Wyniki cytometryczne analizowano przy pomocy programu komputerowego WinMDI v.2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute, USA).

### **3.7 Ocena poziomów ekspresji genów białek systemu kalpaina-kalpastatyna oraz sorcyny techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR).**

#### **3.7.1 Izolacja całkowitego RNA.**

Z przechowywanych (-80°C) blastów ALL oraz komórek grupy porównawczej (porcje po 2 miliony komórek) przeprowadzano izolację całkowitego RNA za pomocą odczynnika TRI-REAGENT (Sigma Chemical, Co., USA).

Próbki odwirowywano z szybkością 2500 obr./min. przez 3 minuty (wirówka Sigma 2K15), dodawano 1 ml odczynnika TRI-REAGENT do każdej próbki i inkubowano wytrząsając w temperaturze pokojowej przez 5 min. Następnie dodawano 200 µl mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego (Sigma Chemical Co., USA). Równocześnie przygotowywano nowe próbki z 500 µl izopropanolu (Sigma Chemical, Co., USA), które przechowywano w temp. -20°C. Po zwirowaniu próbek (szybkość 13000 obr./min. przez 30 minut), zbierano czystą wodną warstwę górną zawierającą RNA wolne od białka oraz DNA, przenoszono do probówek z przygotowanym wcześniej izopropanolem i umieszczano na noc w temperaturze -80°C.

Następnie próbki poddawano wirowaniu (13000 obr./min. przez 30 minut w temp. 4°C) celem zebrania osadu wytrąconego RNA. Usuwano supernatant, a do pozostałego na dnie osadu RNA dodawano 1 ml 75% alkoholu etylowego (POCH

„Chemia”, Gliwice) i energicznie mieszano w celu oczyszczenia RNA. Próbkę odwirowywano (13000 obr./min. przez 10 minut w temp. 4°C) i usuwano supernatant, powtarzając powyższą procedurę. Tak wyflukane próbki wysuszono przy użyciu wirówki próżniowej (JW Electronic, Polska) w temp. 30°C przez 15 min. Stężenie uzyskanego RNA oceniano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

### **3.7.2 Reakcja syntezy cDNA.**

Przy użyciu RNA, uzyskanego w powyższy sposób, przeprowadzano reakcję syntezy komplementarnego DNA (cDNA) standardową techniką odwrotnej transkrypcji, stosując zestawy ImProm-II™ Reverse Transcription System, PROMEGA oraz PCR Core System II, PROMEGA.

Pierwszy etap syntezy cDNA to łączenie matrycowego RNA (stężenie końcowe ok. 0,02 µg/5 µl mieszaniny reakcyjnej) i primera cDNA oligo-dT w stężeniu końcowym 0,5 µg/5 µl mieszaniny (stężenie wyjściowe 500µg/ml, Promega, USA). Probówki inkubowano w 70°C (Thermo Block TDB-120, Biosan, Łotwa) przez 5 min. i po tym czasie natychmiast schładzano na lodzie przez kolejne 5 min. Następnie próbki wirowano przez 10 sekund, aby zebrać kondensat. Probki trzymano na lodzie do momentu dodania mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji.

Odwrotna transkrypcja przeprowadzana była przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy (100 µl, o stężeniu 5 u/µl; Promega, USA) w obecności inhibitora rybonukleazy (RNasin® o stężeniu 40 u/µl, Promega, USA), mieszaniny nukleotydów (dNTP o stężeniu 10 mM każdy rodzaj nukleotydów, Promega, USA), chlorku magnezu (MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 25 mM, Promega, USA), buforu do reakcji (ImProm-II™ Bufor Reakcyjny 5 x stężony, Promega, USA) oraz wody wolnej od nukleaz (Promega, USA). Końcowe stężenia poszczególnych odczynników w mieszaninie reakcyjnej przygotowano zgodnie za zaleceniami producenta zestawu.

Kolejny etap to przyłączanie enzymu, gdy przygotowane wcześniej próbki z matrycą RNA (stężenie ok. 0,02 µg/5 µl) i primerem cDNA oligo-dT mieszano z mieszaniną do syntezy cDNA, a następnie umieszczano w temperaturze 25°C na 5 min. Etap zwany wydłużaniem przeprowadzano inkubując próbki w temperaturze 42°C przez 60 min, a następnie 15 min. w 70°C, aby inaktywować odwrotną

transkryptazę. Wytworzone cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania łańcuchowej reakcji polimerazy.

### 3.7.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).

Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR (ang. *polimerase chain reaction*) dla genów białek systemu kalpainowego, sorcyny oraz genu referencyjnego dehydrogenazy 3-fosfogliceraldehydowej *GAPDH* została przeprowadzona za pomocą termocyklera Master Cycler Personal (Eppendorf). Sekwencje primerów dla powyższych genów zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer3 Input, swoistość sekwencji sprawdzono używając programu NCBI BLASTn.

Użyto następujących par primerów do reakcji PCR, przy założeniu że:

**P**- sekwencja sensowna i **L**- sekwencja antysensowna:

- dla genu kalpastatyny *CAST*-

**P: 5'-AAGACCTCGATGATGCCTTG-3'**

**L: 5'-TCACTGGTTTGTCCTGTCCA-3'**,

wielkość produktu to 201 par zasad.

- dla genu  $\mu$ -kalpainsy *CAPN1*-

**P: 5'-CCTGCTTGAGAAGGCCTATG-3'**

**L: 5'-GGTCCACGTTGTTCCACTCT-3'**,

wielkość produktu to 389 par zasad.

- dla genu m-kalpainsy *CAPN2*-

**P: 5'-AGGCATACGCCAAGATCAAC-3'**

**L: 5'-GGATGCGGATCAGTTTCTGT-3'**,

wielkość produktu to 306 par zasad.

-dla genu sorcyny *SRI*-

**P: 5'-TGCTGTAGCTGGACAGGATG-3'**

**L: 5'-AGCATTGAAACCATAAGCCG-3'**,

wielkość produktu to 126 par zasad.

-dla genu dehydrogenazy 3-fosfogliceraldehydowej *GAPDH*-

**P: 5'-GGCGTCTTCACCACCATGG -3'**

**L: 5'-TGCTGATGATCTTGAGGCTG-3'**,

wielkość produktu to 148 par zasad.

Wszystkie, powyższe primery były produkcji firmy DNA Gdańsk II, Gdańsk.

Reakcję przeprowadzono z użyciem następujących odczynników: buforu do reakcji (Bufor Reakcyjny 10 x stężony, bez MgCl<sub>2</sub>, Promega, USA), chlorku magnezu (MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 25 mM, Promega, USA), mieszaniny nukleotydów (dNTP, o stężeniu każdego rodzaju nukleotydów równym 10 mM, Promega, USA), termostabilnej polimerazy Taq (o stężeniu 5 u/μl, Promega, USA) oraz wody wolnej od nukleaz (Promega, USA), które zmieszano z uzyskanym 1 μl cDNA oraz primerami (po 0,5μl każdego primera). Końcowe stężenia poszczególnych odczynników w mieszaninie reakcyjnej przygotowano zgodnie za zaleceniami producenta zestawu.

Optymalna liczba cykli oraz temperatura przyłączania zostały wytypowane po serii doświadczeń. Ostatecznie zastosowano następujące warunki reakcji: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 3 minuty, 30 cykli w czasie których odbywała się: krótka denaturacja przez 30 sekund w temperaturze 94°, przyłączanie w temperaturze 55°C przez 1min, wydłużanie w temperaturze 72°C przez 1min. Po ostatnim cyklu następowała terminacja reakcji w temperaturze 72°C przez 5min. Próbkę po zakończeniu reakcji przechowywane były w temperaturze 4°C.

### **3.7.4 Elektroforeza agarozowa.**

Do wykrycia i względnej ilościowej oceny produktów RT-PCR zastosowano metodę rozdziału elektroforetycznego w 1,6% żelu agarozowym (agarozą- Sigma Chemical Co., USA) z bromkiem etydyny (2 μl 10mg/ml, Sigma Chemical Co.,

USA) z buforem TBE (108g Tris - Bio-Rad Laboratories, Niemcy; 55g kwas borowy- POCh „Chemia”, Gliwice; 0,5M EDTA- POCh „Chemia”, Gliwice; dopełnione woda do 1l, pH=8,3). Próbki z dodatkiem 2  $\mu$ l buforu obciążającego (Sigma Chemical Co., USA), nanoszono w ilości 14  $\mu$ l/studzienkę; równocześnie prowadzono rozdział wzorca masowego 50-3000bp (Sigma Chemical Co., USA). Elektroforetyczny rozdział produktów prowadzono w aparacie do elektroforezy SUBMINI (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska), przy stałym napięciu 90V przez około 60 minut. Po przeprowadzeniu elektroforezy fluorescencję indukowano światłem UV i rejestrowano w aparacie do archiwizacji żeli GDS-8000 System (UVP Bioimaging System, Wielka Brytania). Uzyskane obrazy zapisywano komputerowo w formie cyfrowej.

### **3.7.5. Analiza densytometryczna żeli.**

Analiza densytometryczna, dzięki której możliwe jest porównanie względnych poziomów aktywności genów, została przeprowadzona przy pomocy programu komputerowego Scion Image 36 (National Institutes of Health, USA, ([http://www.scioncorp.com/pages/scion\\_image\\_windows.htm](http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm)).

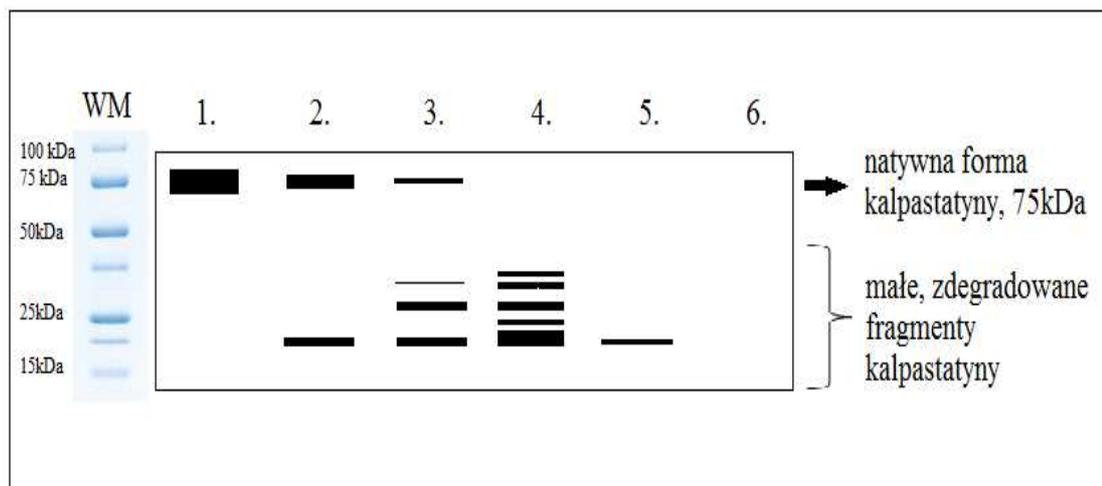
Wykorzystano ekspresję genu referencyjnego (*GAPDH*) jako standard (100%) do którego porównywano poziom ekspresji pozostałych genów systemu CCS oraz sorcyny.

## **3.8 Pomiar aktywności enzymu $\mu$ -kalpainy poprzez detekcję fragmentów degradacji kalpastatyny z użyciem techniki Western blot.**

Metoda, opisana przez Autorkę [127], opiera się na założeniu pomiaru aktualnej, chwilowej aktywności enzymu poprzez detekcję produktów jego proteolizy. Pomiar ten różni się znacznie od oceny całkowitej aktywności enzymu mierzonej techniką zymografii kazeinowej, która jest proporcjonalna do stężenia badanego enzymu w komórce [73,154]. Obie metody dostarczają innych danych; metoda mierzenia aktywności chwilowej mówi o aktywności fizjologicznej w

komórkach *ex vivo*, wydaje się więc dostarczać pełniejszych informacji w kontekście badań kalpajny i kalpastatyny w blastach ALL.

Oszacowanie endogennej aktywności  $\mu$ -kalpajny w blastach ALL, odbywa się poprzez pomiar ilości wykrywanej kalpastatyny oraz jej immunoreaktywnych fragmentów, używając techniki Western blot. Metoda opiera się na fakcie, iż kalpastatyna jest naturalnym, endogennym inhibitorem enzymu  $\mu$ -kalpajny, który wymaga proteolitycznego cięcia przez enzym do pełnego uaktywnienia się roli inhibitora. W sytuacji nadmiernej aktywności kalpajny, inhibitor może ulegać nadmiernej proteolizie, doprowadzając z czasem do degradacji natywnej kalpastatyny oraz powstania jej małych fragmentów białkowych. Natywna forma kalpastatyny, o masie 70 kDa, jest najczęściej wykrywaną formą białkową w ludzkich komórkach krwi [97], zaś masa małych fragmentów kalpastatyny wynosi ok. 30-50 kDa. Przy długotrwałym procesie i silnej aktywności kalpajny, może dojść do całkowitej eliminacji kalpastatyny, pozostawiając tylko zdegradowane nieduże produkty proteolizy (rycina 9). Zarówno forma natywna, jak i fragmenty peptydowe kalpastatyny mogą być wykrywane z użyciem chemiluminescencji w technice Western blot, co w pośredni sposób dostarcza informacji o aktywności enzymu kalpajny w badanych blastach ALL [127].



**Rycina 9.** Schemat przedstawiający detekcję produktów proteolizy kalpastatyny jako metodę oceny endogennej aktywności kalpajny. Studzienki od 1-6 przedstawiają rosnącą aktywność enzymu kalpajny- od najniższej (studzienka 1- znaczna ilość natywnej formy kalpastatyny, brak małych fragmentów) do najwyższej (studzienka 6- brak detekcji kalpastatyny, wszystkie fragmenty i forma natywna uległy zdegradowaniu). Studzienki od 2-5 przedstawiają schematycznie pośrednie stadia aktywności enzymu; stopniowe znikanie formy natywnej inhibitora, pojawianie się niedużych fragmentów rozpadu, a później ich rozpad wraz ze wzrostem aktywności kalpajny.

### **3.8.1 Przygotowanie lizatów komórkowych.**

Blasty ALL oraz komórki kontrolne, zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , zawieszano w  $20\mu\text{l}$  buforu lizującego (Complete Lysis-M, EDTA-free, Roche) zawierającego zestaw inhibitorów proteaz (jodoacetamid, leupeptyna, aprotynina, PMSF (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)), a następnie wytrząsano przez 10 minut i odwirowywano przy 2000 obr/min. przez 15 minut. Następnie do lizatu komórek dodawano po  $5\mu\text{l}$  buforu obciążającego (0,5mM Tris-HCl, 10% glicerol, 10% SDS, 5%  $\beta$ -2-merkaptioetanol, 1% błękit bromofenolowy) i umieszczano w  $100^{\circ}\text{C}$  na 5 minut. Po kolejnym odwirowaniu (13000 obr/min. przez 3 minuty) próbki były gotowe do naniesienia na żel poliakrylamidowy.

### **3.8.2 Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford.**

Oznaczanie białka w próbkach wykonywano standardową metodą Bradford, stosując odczynnik Bradford (Sigma Chemical Co., USA) zgodnie z klasyczną procedurą [155]. Odczytano wartości ekstynkcyjności przy długości fali 450 nm, a następnie przy 590 nm, za pomocą aparatu BioPhotometer (Eppendorf). Krzywą wzorcową, z której odczytano wartości białka całkowitego w badanych lizatach, sporządzono używając roztworów 0,1%, 0,01%, 0,001% BSA.

### **3.8.3 Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE.**

Białka ulegały rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) zgodnie z założeniami metody wg Laemmli [156]. Żel składał się z dwóch warstw: żelu górnego, zagęszczającego 4,5% i dolnego, rozdzielającego 10%.

Żel dolny składał się z: 3,3ml 30% mieszaniny akrylamid/bisakrylamid (Sigma Chemical Co., USA), 2,5 ml buforu dolnego (1,5mM Tris/HCl pH 8,8, woda), 4,1 ml wody, 0,1 ml 10% SDS (BioRad, USA) oraz dodatku katalizatorów: 0,05 ml 10% nadsiarczan amonu (APS) (Sigma Chemical Co., USA) i 0,005 ml TEMED (BioRad, USA). Żel górny składał się z: 0,75 ml 30% mieszaniny

akrylamid/bisakrylamid, 1,25ml buforu górnego (0,5M Tris/HCl pH 6,8, woda), 2,8 ml wody, 0,05ml 10% SDS oraz 0,03 ml APS i 0,005 ml TEMED.

Lizaty komórkowe, w ilości odpowiadającej 20 $\mu$ g białka całkowitego oraz białkowy wzorzec masowy (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard, All Blue, BioRad) nanoszone były ostrożnie na żel. Rozdział przeprowadzano w buforze elektrodowym (25mM Tris/HCl, 192mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3, woda), przy napięciu 190V, przez około 1 godzinę przy użyciu aparatu do elektroforezy poliakrylamidowej (Mini Protean II<sup>TM</sup>, BioRad, USA). Po zakończeniu elektroforezy z aparatu wyjmowano żel, płukano go 15 minut w buforze transferowym (25mM Tris, 192mM glicyna, 5% metanol, pH 8,3), celem przygotowania do transferu na membranę.

#### **3.8.4 Western blotting.**

Elektrotransfer rozdzielonych białek z żelu na błonę nitrocelulozową (PROTRAN NITROCELLULOSE, 0,45 $\mu$ m, Schleicher&Schuell, Germany) przeprowadzano przez 15 minut w warunkach półsuchych przy napięciu 15V (aparat TRANS-BLOT Semi Dry, BioRad, USA). Po zakończeniu transferu membranę blokowano przez 1 godzinę w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w TBS (Tris-buffered saline) z dodatkiem 0,05% Tween 20, celem uniknięcia niespecyficznego wiązania się przeciwciał. Następnie błonę płukano sześciokrotnie, za każdym razem wymieniając roztwór, buforem płuczącym (0,05% Tween 20 w PBS), by usunąć nadmiar roztworu blokującego.

Membranę umieszczano w roztworze specyficznych I-rzędowych przeciwciał skierowanych przeciwko: kalpastatynie (mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiej kalpastatynie, 1mg/ml; Abcam, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:500, sorcynie (mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko ludzkiej sorcynie, 0,5mg/ml; Invitrogen, USA) w rozcieńczeniu 1:1000 i  $\beta$ -aktynie, stosowanej jako białko referencyjne (mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko ludzkiej  $\beta$ -aktynie, 0,5mg/ml; Abcam, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:1000. Inkubację z przeciwciałami prowadzono całą noc, z wytrząsaniem, w temperaturze +4°C.

Następnego dnia, po dokładnym godzinnym wypłukaniu roztworu niezwiązanych przeciwciał I-rzędowych, błonę poddawano inkubacji z II-rzędowym przeciwciałem anti-IgG, sprzężonym z peroksydazą chrzanową HRP (ang. *Horseradish Peroxidase*), (przeciwciało królicze poliklonalne, skierowane przeciwko mysim IgG, 2mg/ml; Abcam, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:2000, przez 2 godziny, w temperaturze pokojowej. Po 120-minutowej inkubacji, membranę dokładnie płukano buforem płuczającym, zalewano na 5 minut 3 ml roztworem wywołującym chemiluminescencję (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). Przygotowaną w ten sposób błonę nitrocelulozową poddawano ekspozycji na kliszy rentgenowskiej (Primax RTG-B, Polska). Ilość wykrywanego białka kalpastatyny - formy natywnej oraz immunoreaktywnych, małych fragmentów białkowych, jak również sorcyny, w odniesieniu do białka referencyjnego  $\beta$ -aktyny, określano densytometrycznie na utrwalonych i poddanych archiwizacji kliszach.

### **3.9 Analiza statystyczna.**

Analizę statystyczną wyników wykonano przy pomocy programu STATISTICA, wersja 8 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Założenia o normalności rozkładu sprawdzano przy pomocy testów: Kołmogorowa-Smirnova z poprawką Lillieforsa i Shapiro-Wilka. Do analizy wyników użyto testów nieparametrycznych: U Manna-Whitney'a, dla dwóch grup niezależnych, testu ANOVA Kruskala-Wallisa dla wielu grup niezależnych. Przy ustalaniu korelacji pomiędzy dwoma badanymi parametrami stosowano test korelacji R Spearmana, z 95% przedziałem ufności.

Na wykresach przedstawiających różnice między badanymi grupami zaznaczone są mediany, kwartale oraz rozstęp danych. Znamienności statystyczne pomiędzy dwiema zmiennymi oznaczane są jako p (różnice między zmiennymi istotne przy  $p < 0,05$ ).

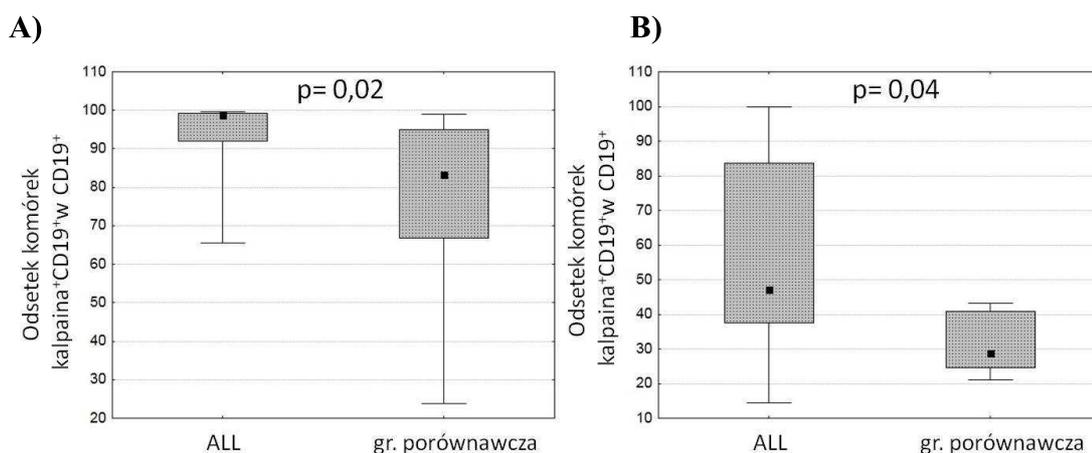
## **4. WYNIKI**

### **4.1 Ocena ilości i aktywności $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy oraz kalpastatyny w blastach ALL oraz limfocytach CD19 grupy porównawczej.**

Zgodnie z założeniami w pracy celami, postanowiono porównać ilości białek systemu kalpaina - kalpastatyna w blastach ostrej białaczki limfoblastycznej i w limfocytach CD19<sup>+</sup> z grupy porównawczej. W celu określenia ilości  $\mu$ - i m-kalpainy, jak również ich wewnątrzkomórkowego inhibitora - kalpastatyny, posłużono się techniką cytometrii przepływowej, zgodnie z procedurami zawartymi w rozdziale Materiały i Metody. Wyniki wyrażono jako odsetki komórek ALL o fenotypach  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> oraz jako średnią intensywność fluorescencji MFI znacznika PE łączącego się z przeciwciałem przeciwko powyższym białkom systemu kalpainowego w cytoplazmie komórek CD19<sup>+</sup>. Ten ostatni parametr pozwala na względną ilościową ocenę zawartości (stężenia) badanego białka w analizowanych komórkach.

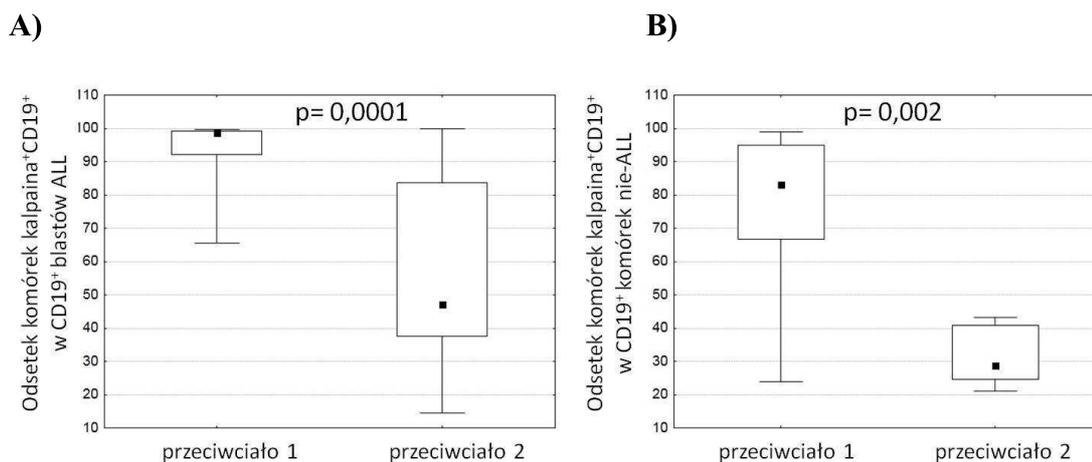
#### **4.1.1 Podwyższony odsetek limfoblastów B CD19<sup>+</sup> zawierających enzym $\mu$ -kalpainę w stosunku do komórek CD19<sup>+</sup> grupy porównawczej.**

Zgodnie z założeniem pracy postanowiono sprawdzić cytometrycznie różnice w odsetku komórek CD19<sup>+</sup> zawierających  $\mu$ -kalpainę w materiale ze szpiku kostnego dzieci chorych na ALL i w szpiku pochodzącym od kontrolnej grupy dzieci. Wykazano, iż odsetek komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> wśród blastów białaczkowych ALL jest znamienne wyższy w porównaniu do limfocytów B grupy porównawczej ( $p < 0,05$ ) niezależnie od rodzaju zastosowanego przeciwciała przeciwko  $\mu$ -kalpainie - rycina 10.



**Rycina 10.** Porównanie odsetka komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w populacji komórek CD19<sup>+</sup> wśród pacjentów ALL oraz grupy kontrolnej z użyciem **przeciwciała 1 przeciwko  $\mu$ -kalpainie** (A: grupa ALL to 11 pacjentów, grupa porównawcza 9) oraz **przeciwciała 2** (B: grupa ALL N= 21, zaś grupa porównawcza N=8).

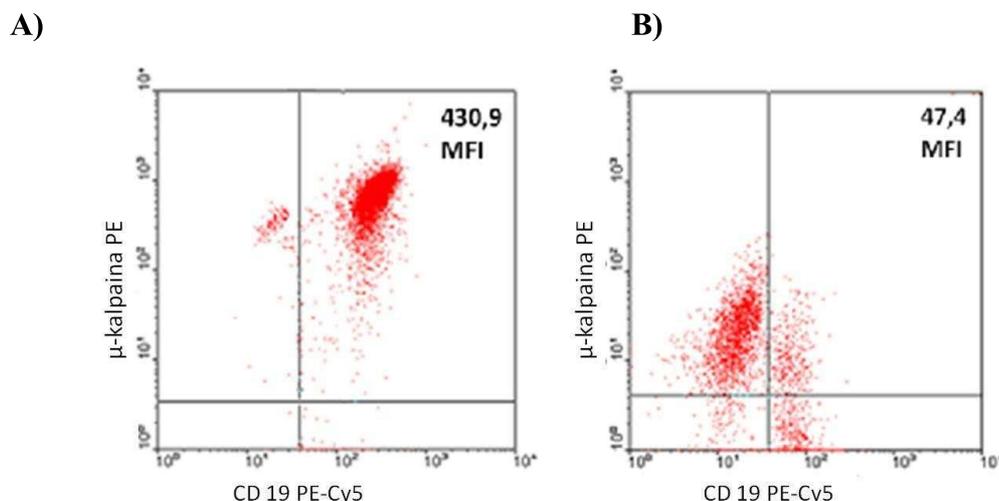
Jak wspomniano w rozdziale Materiały i Metody, w trakcie realizacji badań firma BD (Becton Dickinson, USA) zakończyła produkcję kluczowego odczynnika, jakim było oczyszczone mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko ludzkiej  $\mu$ -kalpainie (nr katalogowy 550935). Ponieważ przeprowadzone z użyciem tego odczynnika badania dotyczyły 11 chorych na ALL i 9 kontroli, pomimo osiągnięcia statystycznej znamienności różnicy w odsetkach komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup> pomiędzy obiema grupami zdecydowano się na wykonanie analogicznych oznaczeń w dwóch nowych, porównywalnych liczbowo grupach (ALL i nie-ALL), z udziałem drugiego przeciwciała dostępnego na rynku firmy Abcam (mysie monoklonalne [15C10] przeciwciało przeciwko  $\mu$ -kalpainie, nr katalogowy ab16680). Stwierdzono, że zastosowanie obydwu przeciwciał prowadzi do wykazania tego samego zjawiska, t.j. istotnie wyższego odsetka komórek kalpaina<sup>+</sup> wśród blastów ALL niż wśród komórek CD19<sup>+</sup> od dzieci z grupy kontrolnej (rycina 11) pomimo znacznych (istotnych statystycznie) różnic liczbowych w wynikach uzyskanych z zastosowaniem tych dwóch odczynników.



**Rycina 11.** Porównanie odsetka komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w CD19<sup>+</sup> przy zastosowaniu **przeciwciała 1** przeciw  $\mu$ -kalpainie, zarówno w blastach ALL (**A**: przeciwciała 1 sprawdzano w N=11, przeciwciała 2 w N=21 ALL), jak i limfocytach B CD19<sup>+</sup> porównawczej grupy kontrolnej (**B**: przeciwciała 1 w N=9 oraz przeciwciała 2 w N=8 nie-ALL).

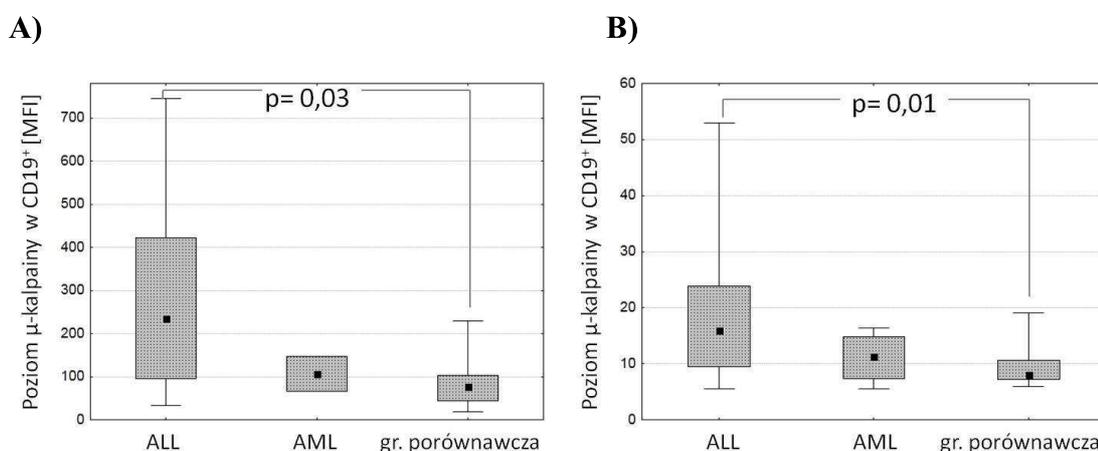
#### 4.1.2 Porównanie zawartości $\mu$ -kalpainy w blastach ALL i w komórkach CD19<sup>+</sup> grupy porównawczej.

Porównanie ilości  $\mu$ -kalpainy ocenianej poprzez pomiar wartości fluorescencji MFI przeciwciała związanego wewnątrzkomórkowo z enzymem, przeprowadzono w blastach ALL oraz limfocytach B grupy porównawczej. Przykładowy, reprezentatywny wykres dwuparametrowy (dot plot) pokazujący wartość MFI  $\mu$ -kalpainy w komórkach CD19<sup>+</sup> osoby z ALL oraz z grupy kontrolnej okazano na rycinie 12.



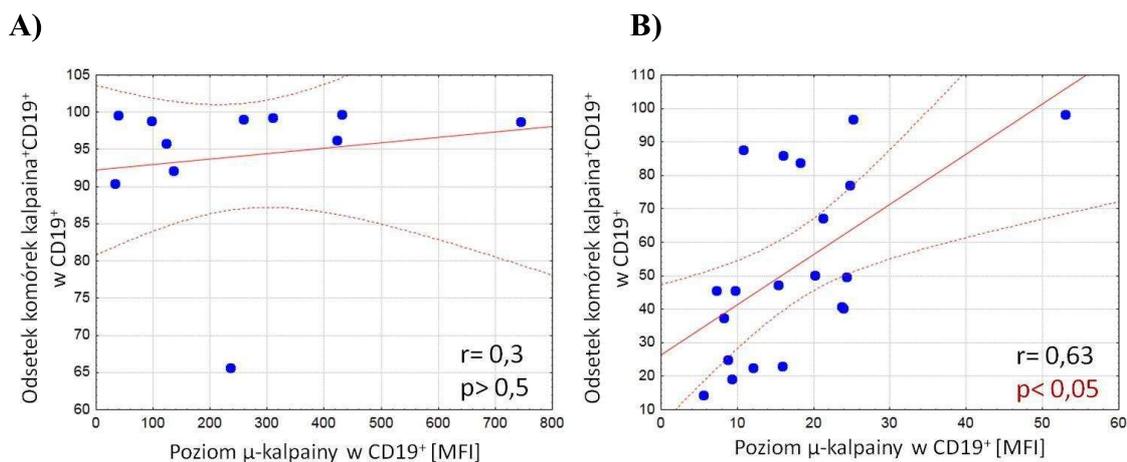
**Rycina 12.** Przykładowy wykres dwuparametrowy wartości MFI  $\mu$ -kalpainy w komórkach CD19<sup>+</sup> ALL (**A**) oraz grupy kontrolnej (**B**).

Badanie to wykazało istotne statystycznie podwyższenie ilości białka  $\mu$ -kalpajny w limfoblastach ALL (istotność niezależna od zastosowanego przeciwciała anty-kalpajnie, ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej (rycina 13). W analizie brano pod uwagę również, porównawczo komórki  $CD19^+$  pochodzące z krwi szpikowej pacjentów AML. Wykazano, że zawartość  $\mu$ -kalpajny w blastach AML nie różniła się istotnie względem grupy kontrolnej ( $p > 0,05$ ). Obserwacja ma charakter trendu, bez istotności statystycznej, z uwagi na zbyt małą grupę badawczą (rycina 13A: N= 2 i B: N= 4).



**Rycina 13.** Porównanie poziomu  $\mu$ -kalpajny w komórkach  $CD19^+$  ALL, AML oraz grupy porównawczej przy zastosowaniu **przeciwciała 1** (A: grupa ALL to 11 pacjentów, grupa AML 2 pacjentów, grupa porównawcza 9) **oraz przeciwciała 2** (B: ALL N=21, AML N=4, kontrola= 8), różnice między grupą ALL i kontrolną są wysoce istotne statystycznie.

Wysoki poziom białka  $\mu$ -kalpajny i udział procentowy komórek o fenotypie  $\mu$ -kalpajno-dodatnim w blastach  $CD19^+$  ALL jest ze sobą skorelowany, co wykazano na rycinie 14. Zależność jest istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ), co wykazano dla liczniejszej grupy pacjentów przy użyciu przeciwciała 2 (rycina 14B), brak takiej istotności dla przeciwciała 1, być może z uwagi na mniej liczną badaną grupę ALL (rycina 14A). Zależności nie odnotowano również w grupie porównawczej (nie-ALL) oraz grupie AML (prawdopodobnie z powodu stosunkowo bardzo małej liczebności grupy); nie pokazano na rycinach.

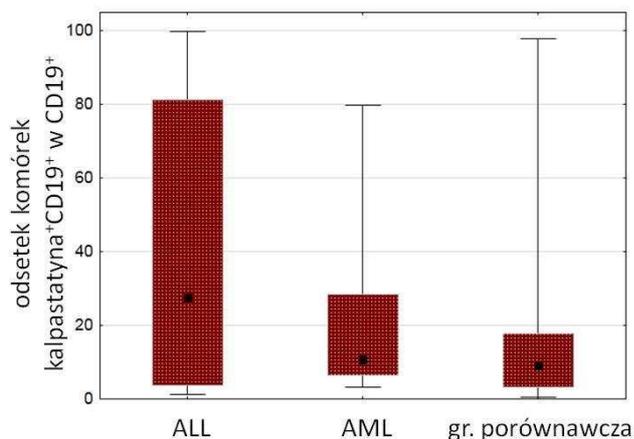


**Rycina 14.** Brak korelacji odsetka komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w CD19<sup>+</sup> z jego poziomem MFI w blastach ALL, z użyciem **przeciwciała 1**, przy N=11 (A) oraz istnienie powyższej korelacji ( $p < 0,05$ ) przy zastosowaniu **przeciwciała 2**, N=20 (B).

#### 4.1.3 Porównanie odsetka komórek zawierających wewnątrzkomórkowy inhibitor kalpaina - kalpastatynę w blastach ALL i komórkach CD19<sup>+</sup> grupy porównawczej.

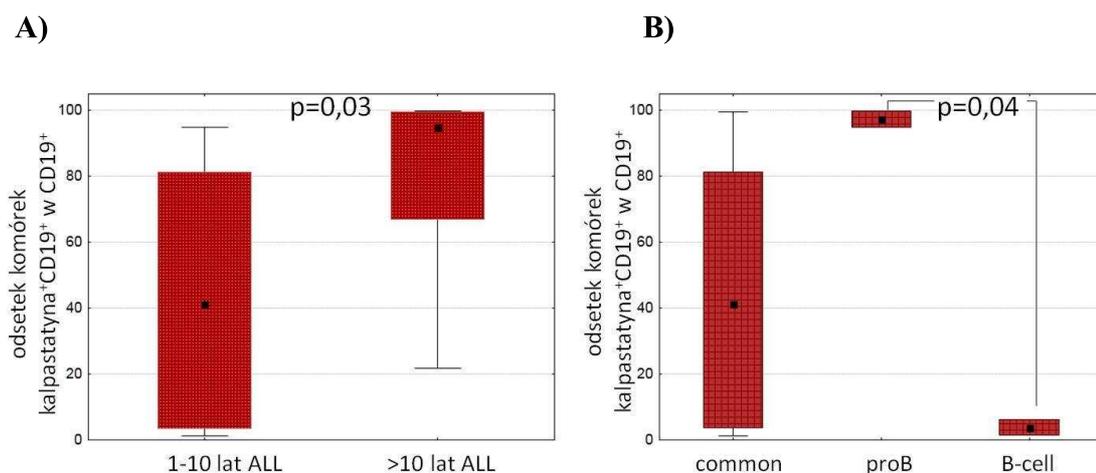
Oszacowanie ilości białka kalpastatyny w komórkach badanych jak i porównawczych jest ogromnie ważne z uwagi na fakt, iż kalpaina i kalpastatyna powinny występować w odpowiednich, fizjologicznych (stechiometrycznych) proporcjach, gwarantujących sprawne funkcjonowanie układu kalpainowego. Wykazany na wcześniejszych rycinach wysoce podwyższony poziom i aktywność  $\mu$ -kalpaina, wskazuje na zakłóconą równowagę ilościową enzymu w badanym systemie białkowym; podobną tendencję w blastach białaczkowych ALL przejawia również kalpastatyna, której ilość jest silnie heterogenna, lecz wyższa w porównaniu do komórek grupy porównawczej (obserwacja na granicy istotności statystycznej  $p = 0,06$ ) (rycina 15).

Ilość kalpastatyny w AML jest porównywalna do jej ilości w grupie kontrolnej (rycina 15), lecz widocznie niższa niż w blastach ALL (bez istotności statystycznej).



**Rycina 15.** Ocena odsetka komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w populacji komórek CD19<sup>+</sup> od pacjentów ALL (N=30), AML (N=6) oraz grupy kontrolnej (N=17); między grupą ALL a kontrolą różnice na granicy istotności ( $p=0,06$ ), wskazujące na wyższy poziom inhibitora w blastach białaczkowych.

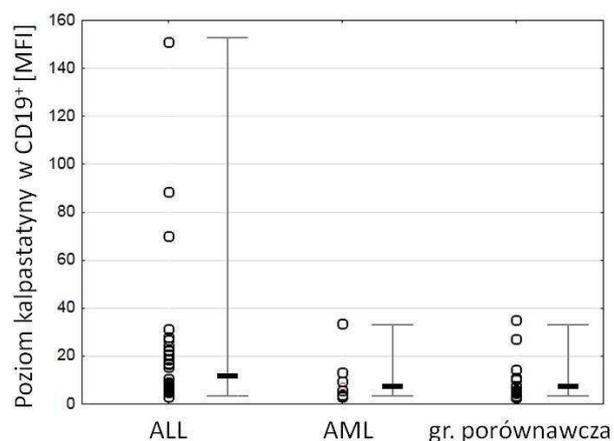
Dodatkowo oceniano, celem rozróżnienia dość heterogennej grupy blastów ALL, jaka grupa spośród badanych pacjentów charakteryzuje się wyższym procentem komórek wykazujących obecność kalpastatyny wśród badanych komórek CD19<sup>+</sup>. Brano pod uwagę wiek pacjentów i fenotyp immunologiczny blastów. Zgodnie z analizą przedstawioną na rycinie 16, znacząco wyższy odsetek komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> występuje wśród starszych pacjentów ALL, czyli w grupie wiekowej powyżej 10 lat, niż wśród pacjentów w przedziale od 1-10 lat ( $p= 0,03$ ); w zestawieniu zabrakło pacjentów ALL młodszych niż 1 rok. Najwyższym odsetkiem komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> charakteryzują się również pacjenci o fenotypie immunologicznym typu pro-B, zaś najniższym pacjenci o fenotypie ALL B-cell, różnica jest znamienna statystycznie ( $p= 0,04$ ), typ common ALL stanowi grupę o pośredniej, zróżnicowanej ilości odsetka badanych komórek (rycina 16). Procent komórek o fenotypie kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> wydaje się nie mieć statystycznie istotnej znamienności z płcią, parametrami klinicznymi czy grupą ryzyka ALL.



**Rycina 16 A:** Porównanie dwóch grup wiekowych wśród pacjentów ALL (grupa 1-10 lat N= 21 oraz grupa powyżej 10 lat N=5) pod względem zawartości procentowej komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w puli komórek CD19<sup>+</sup>, gdzie odsetek ten jest istotnie wyższy wśród starszych pacjentów. **B:** Udział odsetka komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w poszczególnych typach immunologicznych ALL common (N=21), proB (N=2) i B-cell (N=2).

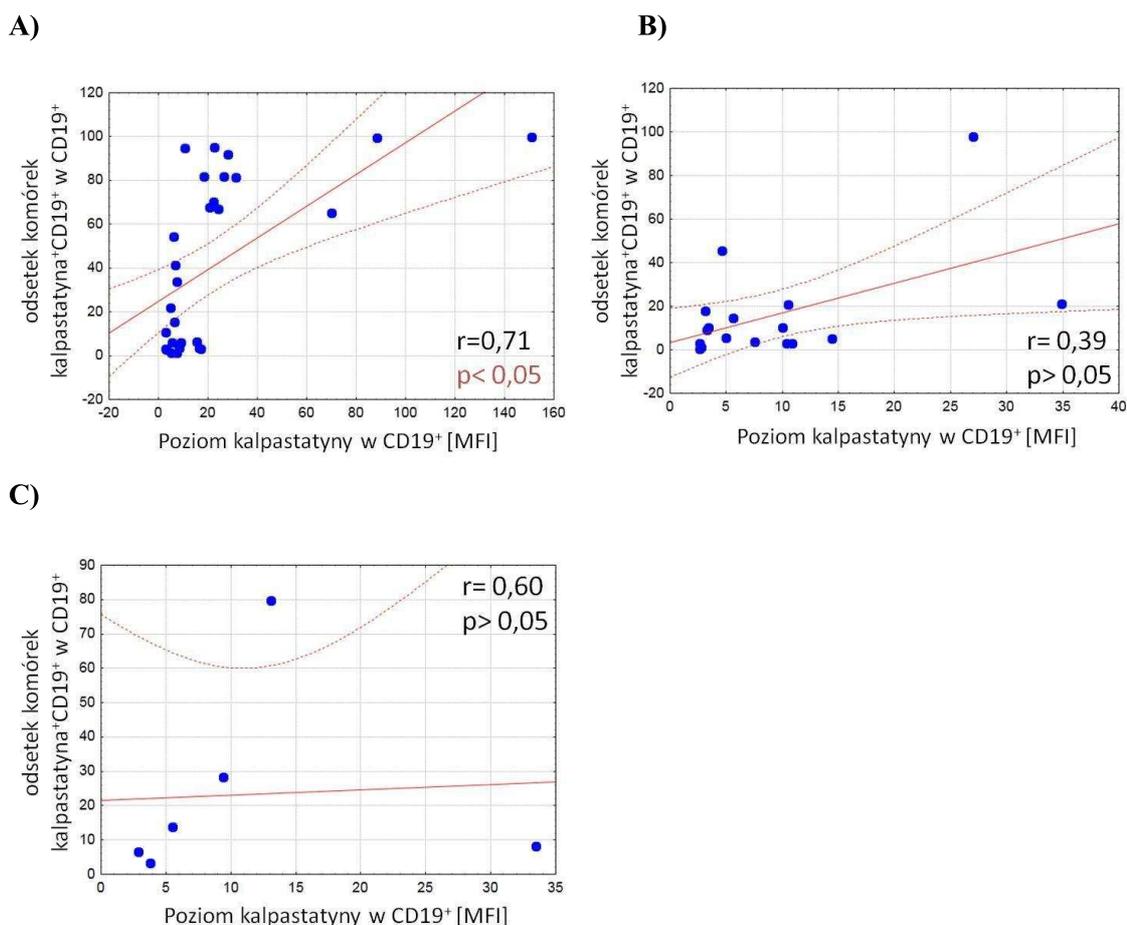
#### 4.1.4 Porównanie ilości kalpastatyny w komórkach CD19<sup>+</sup> ALL oraz AML i kontroli.

Parametrem, który przedstawia bardziej obrazowo zakłóconą aktywność systemu kalpainowego w blastach ALL jest średnia intensywność fluorescencji (MFI) dla znacznika przeciwciała anty-kalpastatyna, odpowiadająca względnej ilości badanego białka (rycina 17). Poziom kalpastatyny w blastach ALL jest podwyższony względem grupy porównawczej (obserwacja na granicy istotności statystycznej  $p=0,052$ ) oraz komórek AML (bez osiągnięcia poziomu istotności). Mimo tendencji do podwyższenia poziomu białka kalpastatyny względem kontroli, w porównaniu do ogromnie podwyższonego poziomu MFI dla  $\mu$ -kalpainy widać silne dysproporcje w stosunku inhibitora i enzymu, co może przekładać się na niestabilność i zakłócenie funkcji danego systemu białkowego.



**Rycina 17.** Ocena poziomu inhibitora kalpastatyny w grupach: ALL (N=30), AML (N=6) i grupie porównawczej (N=17). Tendencja do podwyższonego poziomu kalpastatyny w blastach ALL w porównaniu do grupy porównawczej ( $p=0,052$ ).

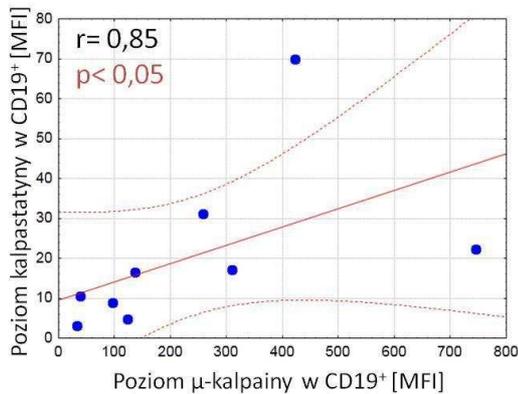
Postanowiono więc po pierwsze sprawdzić, czy wzrost proporcji komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> wśród komórek CD19<sup>+</sup> jest skorelowany z poziomem białka kalpastatyny (MFI). Wyniki przedstawione na rycinie 18 wskazują, iż taka korelacja występuje tylko w blastach ALL, osiągając statystyczną istotność ( $p < 0,05$ ), zaś zarówno w grupie kontrolnej jak i AML, nie ma takiej zależności.



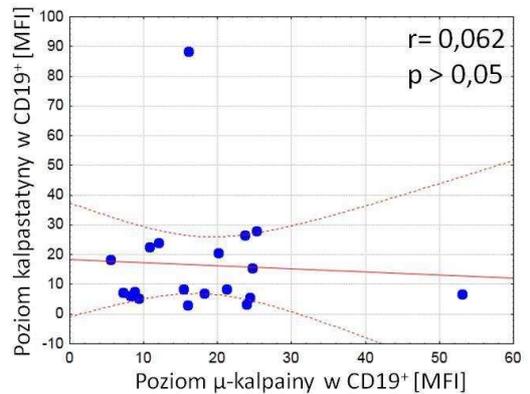
**Rycina 18.** Korelacja odsetka komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w CD19<sup>+</sup> i ekspresji kalpastatyny w CD19<sup>+</sup> (mierzone jako jej MFI) w blastach białaczkowych ALL, N=30, jest istotnie statystyczna (**A**), zaś w grupie porównawczej N=17 (**B**) i AML N=6 (**C**) nie ma takiej zależności.

Następnie sprawdzono, czy występuje związek między wykazanim, silnie podwyższonym poziomem  $\mu$ -kalpainy a poziomem kalpastatyny w blastach ALL. Powyższą korelację, potwierdzoną znamiennością statystyczną ( $p<0,05$ ), wykryto tylko w pierwszej grupie 9 pacjentów ALL (rycina 19A), gdzie zastosowano do oznaczeń cytometrycznych przeciwciało 1 przeciwko  $\mu$ -kalpainie. Korelacji nie wykryto również wśród grupy kontrolnej (przy zastosowaniu obu przeciwciał); nie pokazano.

A)



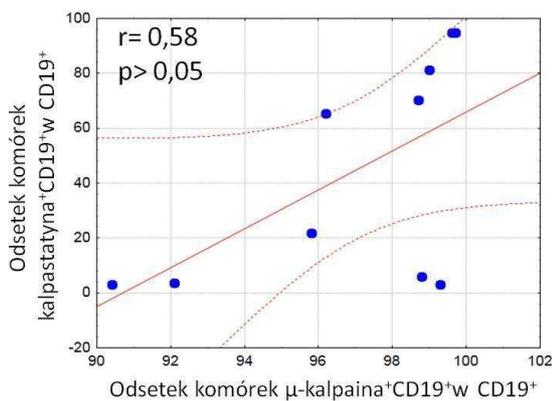
B)



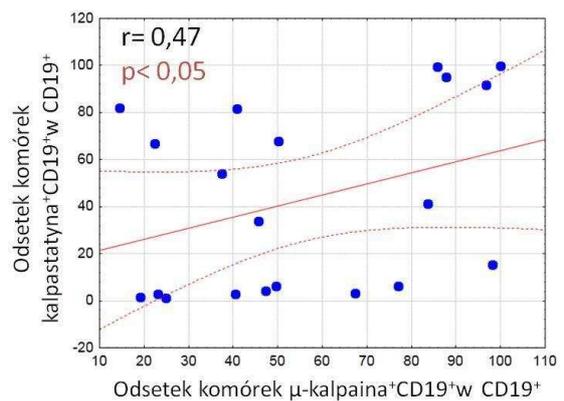
**Rycina 19 A:** Zależność korelacyjna między poziomem kalpastatyny i  $\mu$ -kalpainy w blastach  $CD19^+$  ALL,  $N=9$ , stosowano **przeciwciało 1**. **B:** Brak takiego związku (stosowano **przeciwciało 2**),  $N=19$ .

Następnie sprawdzano, czy odsetki komórek o fenotypie kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> i  $\mu$ -kalpain<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w blastach ALL są ze sobą skorelowane (rycina 20); zależność sprawdzano dla obu przeciwciał przeciw  $\mu$ -kalpainie, wykazując istotność statystyczną w przypadku przeciwciała 1. Istotnej korelacji nie wykazano także dla w/w odsetków w grupie porównawczej (nie pokazano).

A)



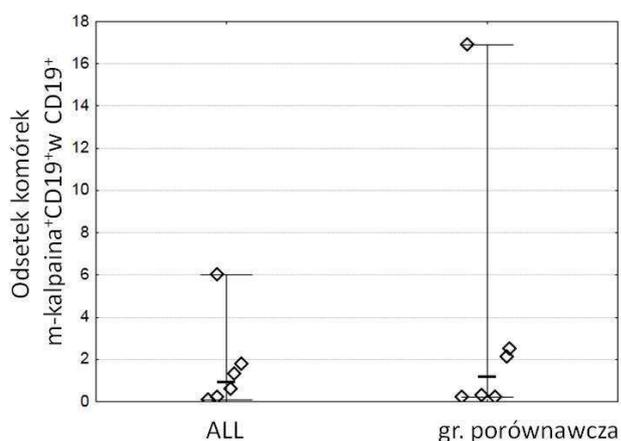
B)



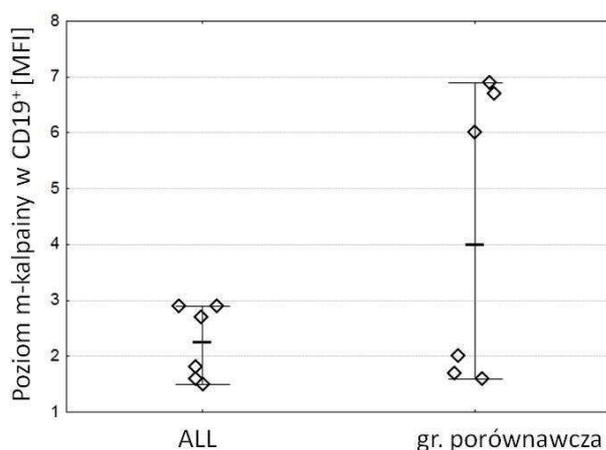
**Rycina 20.** Tendencja korelacyjna między odsetkiem komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> i  $\mu$ -kalpain<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w blastach ALL  $CD19^+$  przy zastosowaniu **przeciwciała 1** przeciwko  $\mu$ -kalpainie przy  $N=9$  (A) oraz statystycznie istotna korelacja przy zastosowaniu **przeciwciała 2**,  $p<0,05$ ,  $N=20$  (B).

#### 4.1.5 Ocena odsetka komórek o fenotypie m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> wśród CD19<sup>+</sup> grupy ALL i porównawczej oraz poziomu MFI dla enzymu.

Procent komórek CD19 zawierających wewnątrzkomórkowy enzym m-kalpainę jest znikomo niski zarówno w grupie ALL, jak i grupie traktowanej jako kontrola (rycina 21). Również poziom enzymu mierzony poprzez jego MFI, wskazuje na bardzo niski poziom m-kalpainsy w badanych komórkach, ilość ta nie odbiega w sposób znaczący od kontroli ( $p > 0,05$ ), (rycina 22).

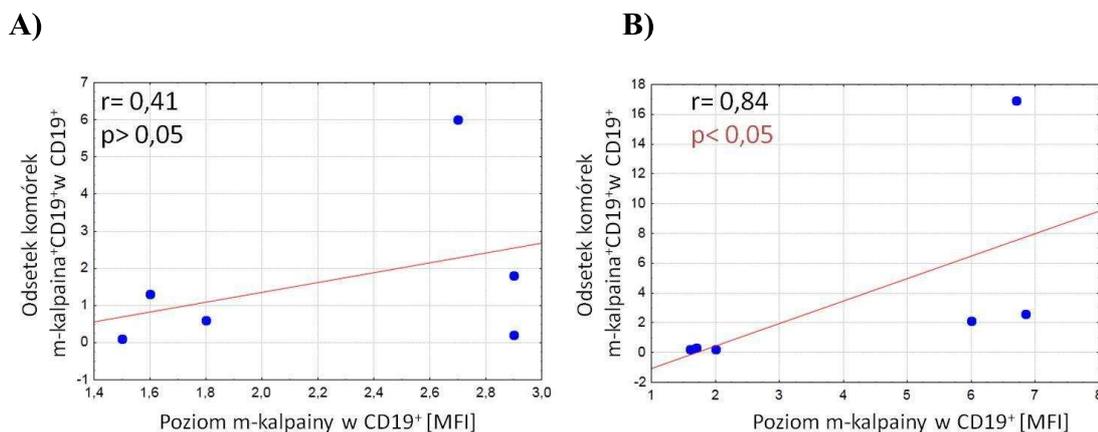


**Rycina 21.** Znikomo niskie wartości odsetków komórek m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w populacji komórek CD19<sup>+</sup> (grupa ALL N=6, grupa porównawcza N=6),  $p > 0,05$ ; brak różnic statystycznych między grupami.



**Rycina 22.** Brak różnic między stosunkowo niskim, wykrywanym poziomem enzymu m-kalpainsy w populacji komórek CD19<sup>+</sup> blastów ALL (N=6), jak i grupą porównawczą (N=6),  $p > 0,05$ .

Stwierdzono również, lecz tylko w przypadku grupy porównawczej, iż poziom MFI dla m-kalpainy w komórkach CD19<sup>+</sup> koreluje z odsetkiem komórek m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w puli CD19<sup>+</sup>; obserwacja potwierdzona istotnością statystyczną ( $p < 0,05$ ). Brak takiej korelacji dla blastów CD19<sup>+</sup> ALL (rycina 23).



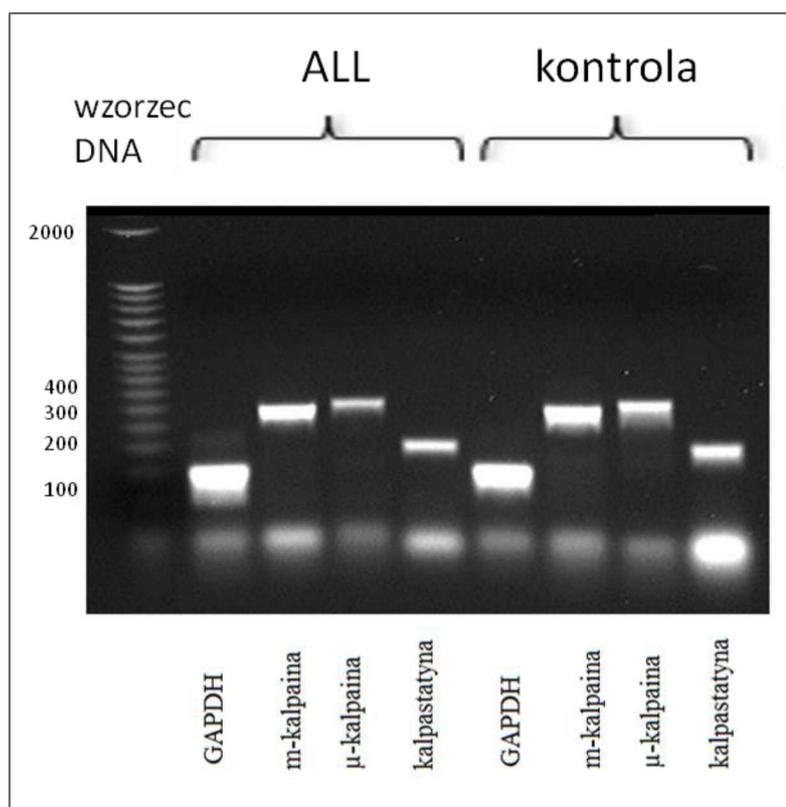
**Rycina 23.** Brak korelacji między odsetkiem komórek m-kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> a poziomem m-kalpainy w CD19 [MFI] w grupie ALL (N=6) (A), zaś w grupie porównawczej wartości te wykazują korelację o znaczeniu statystycznym, N=6 (B).

Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki wskazują na silne dysproporcje w systemie białkowym kalpaina – kalpastatyna. Przy ocenie ilości i zawartości  $\mu$ -kalpainy w blastach CD19<sup>+</sup> wykazano, iż są one wysoce podwyższone w porównaniu do komórek CD19<sup>+</sup> pochodzących od grupy porównawczej, wyniki osiągają różnice istotne statystycznie. Z kolei odsetek komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> oraz MFI kalpastatyny są silnie heterogenne, z trendem w kierunku wyższych wartości w blastach ALL niż dane grupy porównawczej (obserwacje na granicy istotności statystycznej). Dodatkowo wiadomo, iż najwyższą zawartością odsetka kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> cechują się blasty pochodzące od pacjentów starszych (grupa wiekowa powyżej 10 lat) czy fenotypie immunologicznym typu pro-B. W części grupy badanej blastów ALL, osiągnięto istotne statystycznie korelacje między poziomem i aktywnością enzymu kalpainy oraz inhibitora kalpastatyny, lecz nie dla grupy komórek traktowanych jako porównawcze. Sprawdzone również odsetek komórek i zawartość białka m-kalpainy w blastach, wykazując iż są one znikomo niskie i nie odbiegają znacząco od kontrolnych. Powyższe wyniki wskazują na

zakłóconą równowagę ilościową enzymu kalpainy względem swojego inhibitora w badanym układzie, co może przekładać się na niestabilność i zakłócenie funkcji danego systemu białkowego.

#### 4.2 Ekspresja genów dla kalpastatyny, $\mu$ -kalpainy oraz m-kalpainy w blastach ALL oraz komórkach grupy nie-ALL.

W poprzednim rozdziale wykazano istnienie różnic w ilości białek kalpainy i kalpastatyny pomiędzy blastami ALL, a komórkami CD19<sup>+</sup> pochodzącymi z grupy porównawczej. W związku z tym, w kolejnym etapie badań sprawdzano, czy różnice te dotyczą również ekspresji genów powyższych białek w grupie chorych oraz kontrolnej, czy też pojawiają się dopiero po etapie transkrypcji i dotyczą tylko produktu białkowego.



**Rycina 24.** Ekspresja genów dla białek kalpastatyny,  $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy w blastach CD19<sup>+</sup> ALL oraz komórkach grupy porównawczej nie-ALL. Przykładowy wynik badania RT-PCR reprezentatywny dla 28 doświadczeń dla ALL oraz 5 kontroli (opis w tekście).

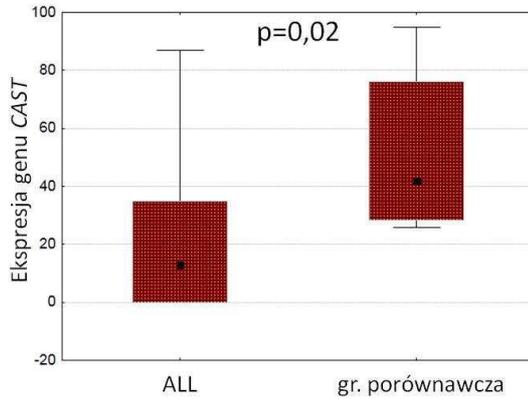
Wielkość ekspresji poszczególnych genów oceniano za pomocą metody densytometrycznej i wyrażano jako stosunek do ekspresji genu referencyjnego *GAPDH* (traktowany jako standard 100%).

Ilość zamplifikowanego produktu genu dla kalpastatyny (gen *CAST*) dla komórek ALL była dwukrotnie niższa niż dla komórek grupy porównawczej, a zaobserwowana różnica była istotna statystycznie (rycina 25A,  $p < 0,05$ ). Badana w opisywanych doświadczeniach grupa ALL to w większości komórki pochodzące od pacjentów o typie immunologicznym common, dla którego również poziom białka kalpastatyny (mierzony cytometrycznie jako pomiar MFI) wskazywał obniżoną tendencję do obecności wewnątrzkomórkowej tegoż białka.

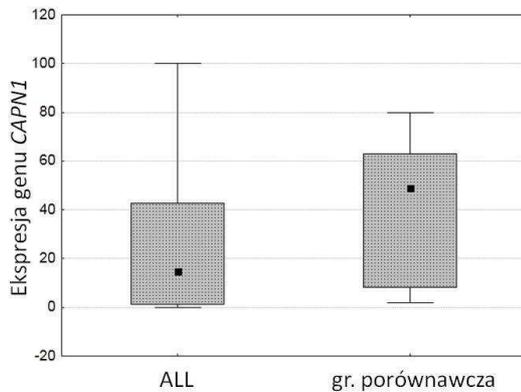
Ekspresja genów obu kalpain (gen *CAPN1* i *CAPN2*) nie różni się istotnie w grupach ALL i kontrolnej, aczkolwiek zaobserwowano tendencję w kierunku niższych poziomów ekspresji genów obydwu kalpain w blastach ALL (rycina 25B i C).

Ekspresja genów *CAPN1* i *CAPN2* jest ze sobą skorelowana i współczynnik ten osiąga istotność statystyczną,  $p < 0,05$  zarówno wśród komórek pochodzących od pacjentów ALL, jak i grupie komórek kontrolnych (rycina 26). Wynik ten również świadczy, iż na etapie transkrypcji obydwu genów nie ma istotnych różnic między grupą badaną ALL, a grupą porównawczą.

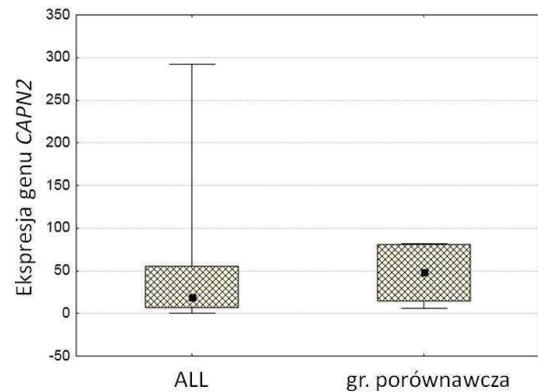
**A)**



**B)**

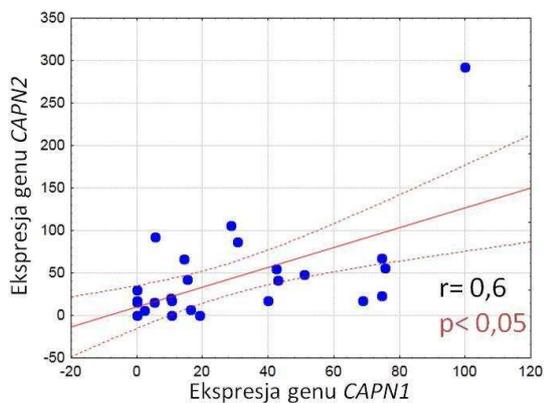


**C)**

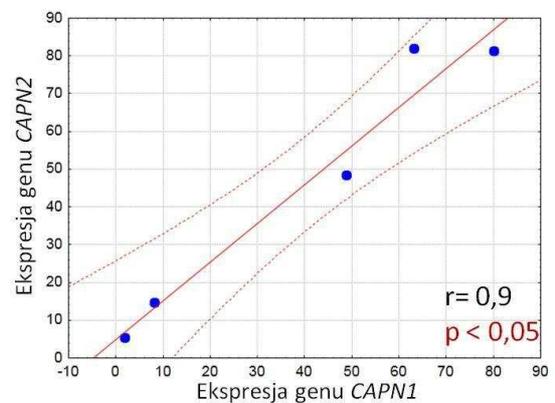


**Rycina 25.** Ekspresja genu *CAST* (A) jest znamienne obniżona względem grupy porównawczej. Brak różnic wielkości ekspresji genów  $\mu$ - i  $m$ -kalpajny (geny *CAPN1* i *CAPN2*) (B i C), w grupie ALL  $N=28$  i grupie porównawczej  $N=5$ . Ekspresja genów *CAST*, *CAPN1*, *CAPN2* jest wyrażona jako stosunek do (% wielkości ekspresji) genu referencyjnego *GAPDH*, którego ekspresję mierzono w tych samych komórkach.

**A)**



**B)**



**Rycina 26.** Korelacja ekspresji genów dla  $m$ - i  $\mu$ -kalpajny zarówno wśród blastów ALL  $N=28$  (A) oraz komórek grupy porównawczej  $N=5$  (B). Zależności są znamienne statystycznie  $p<0,05$ . Ekspresję badanych genów wyrażono jak na ryc. 25.

Podsumowując, w powyższym rozdziale porównano wielkości ekspresji poszczególnych genów  $\mu$ -kalpainy, m-kalpainy oraz kalpastatyny wyrażonej względem genu referencyjnego *GAPDH*. Wykazano, iż aktywność transkrypcyjna genu kalpastatyny (gen *CAST*) w blastach ALL jest istotnie niższa niż dla komórek grupy porównawczej. Doświadczenia te wykonano głównie z użyciem blastów ALL o fenotypie common, zatem powyższa zależność jest obowiązująca szczególnie w odniesieniu do tego typu fenotypu immunologicznego. Natomiast ekspresja genów obu kalpain (*CAPN1*, *CAPN2*) nie różni się znacząco w grupach ALL i kontrolnej.

### 4.3 Ocena wpływu $\mu$ -kalpainy na apoptozę w nowotworowych blastach ALL.

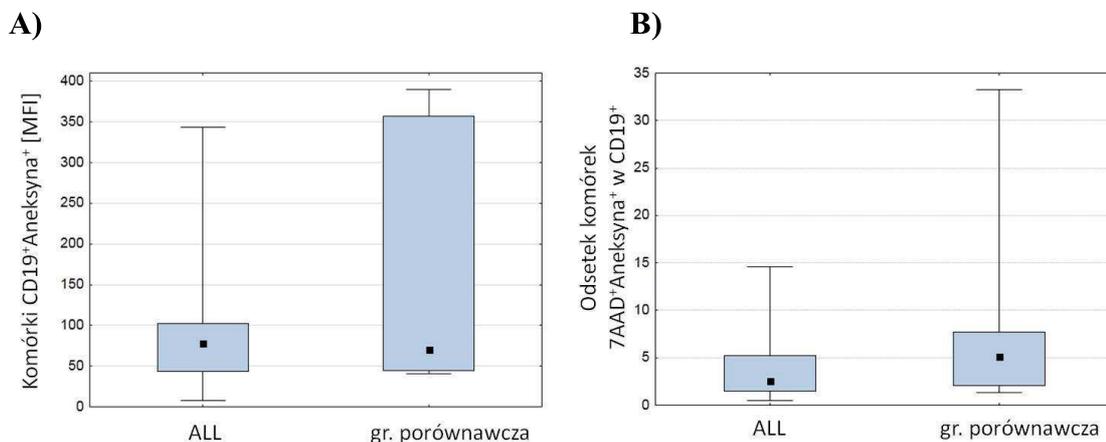
W pracy sprawdzano, czy istnieje związek między ilością i aktywnością enzymów systemu kalpainowego, a apoptozą w blastach ALL. W celu oceny poziomu spontanicznej apoptozy posłużono się pomiarem liczby komórek wiążących sprzężoną z PE Aneksynę V i 7-AAD, co pozwala na odróżnienie komórek wczesno-apoptotycznych ( $An^+7\text{-AAD}^-$ ) od późno-apoptotycznych ( $An^+7\text{-AAD}^+$ ) i nekrotycznych ( $An^-7\text{-AAD}^+$ ).

Oceniano również poziom wczesnej apoptozy za pomocą sondy potencjału mitochondrialnego JC1 - badano w ten sposób apoptozę *ex vivo* oraz po 24 godzinach inkubacji z inhibitorem kalpain, oceniając *in vitro* wpływ modulacji aktywności kalpain na wystąpienie śmierci komórkowej blastów ALL.

#### 4.3.1 Różnice w poziomie apoptozy *ex vivo* a związek z wysoką aktywnością $\mu$ -kalpainy.

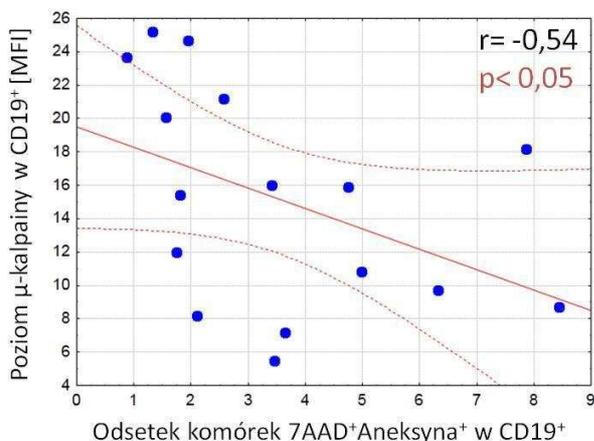
Apoptozę w komórkach blastycznych wyizolowanych bezpośrednio ze szpiku oceniano zarówno jako odsetek komórek wiążących Aneksynę V, jak i jako intensywność MFI tego znacznika. Na tej podstawie stwierdzono bardzo niski poziom spontanicznej apoptozy w badanym materiale. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w poziomie spontanicznej apoptozy pomiędzy blastami ALL i

komórkami CD19<sup>+</sup> szpiku z grupy porównawczej (prawdopodobnie z uwagi na niewielką liczebność tej ostatniej), a jedynie trend do niższych odsetków i poziomu wiązania Aneksyny V dla komórek ALL (rycina 27).



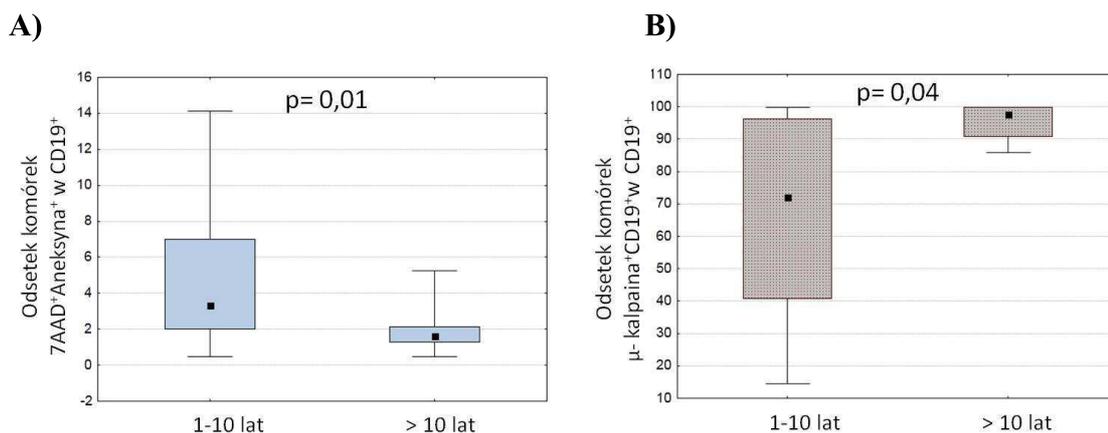
**Rycina 27.** Porównanie parametru MFI znacznika Aneksyny V (A) oraz odsetka komórek wiążących zarówno 7-AAD i Aneksynę V (B), w blastach ALL względem komórek grupy porównawczej, brak istotności statystycznej ( N=7 dla grupy porównawczej, zaś grupa ALL N=42).

Bardzo istotne było sprawdzenie czy zjawisko obniżonej apoptozy może mieć związek z poziomem i aktywnością  $\mu$ -kalpajny w blastach (silnie podwyższonymi względem porównawczych komórek B). Poniższa ujemna korelacja, przedstawiona graficznie na rycinie 28, dokumentuje taką zależność, wyrażoną znamiennością statystyczną ( $p < 0,05$ ).

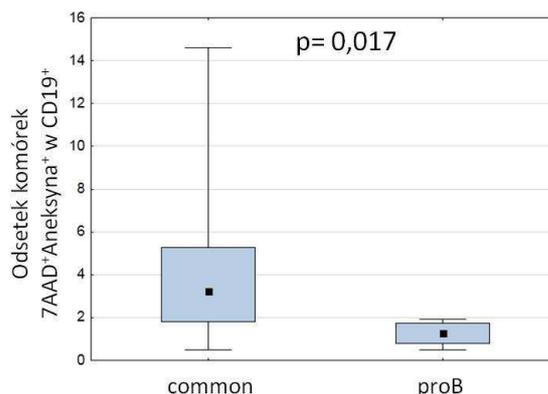


**Rycina 28.** Ujemna korelacja wskazująca na odwrotną zależność między ilością  $\mu$ -kalpajny w blastach (MFI), a zdolnością do apoptozy blastów ALL ocenianą jako odsetek komórek 7AAD<sup>+</sup>Aneksyna<sup>+</sup>, przy istotności statystycznej  $p < 0,05$ , N=16.





**Rycina 30.** Apoptoza blastów ALL pacjentów młodszej i starszej grupy wiekowej (**A**) oraz porównanie odsetka komórek kalpajno-dodatnich (**B**) w obu grupach wiekowych ALL. **A:** dla grupy 1-10 lat N=28 i grupa >10 lat N=10 oraz **B:** grupa 1-10 lat N=22 oraz grupa >10 lat N=4. Obie ryciny wykazują istotność statystyczną przy  $p < 0,05$ .



**Rycina 31.** Znamienne różny ( $p < 0,05$ ) odsetek komórek o fenotypie późnej apoptozy Aneksyna<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup> w zależności od fenotypu immunologicznego ALL (przy ALL common N= 35 oraz proB N=4).

Podsumowując, stwierdzono obniżoną apoptozę spontaniczną w badanych blastach ALL. Wykazano zależność zahamowania apoptozy od poziomu i aktywności enzymu μ-kalpajny w blastach. Korelacja ta, potwierdzona istotnością statystyczną, wskazuje na odwrotną zależność między wysokością poziomu kalpajny, a zdolnością do śmierci komórkowej ALL. Stwierdzono też ujemną korelację między apoptozą, a wiekiem badanych pacjentów ALL. Wykazano znaczące różnice w uleganiu apoptozie między blastami ALL pochodzącymi z młodszej grupy pacjentów, a pochodzącymi ze

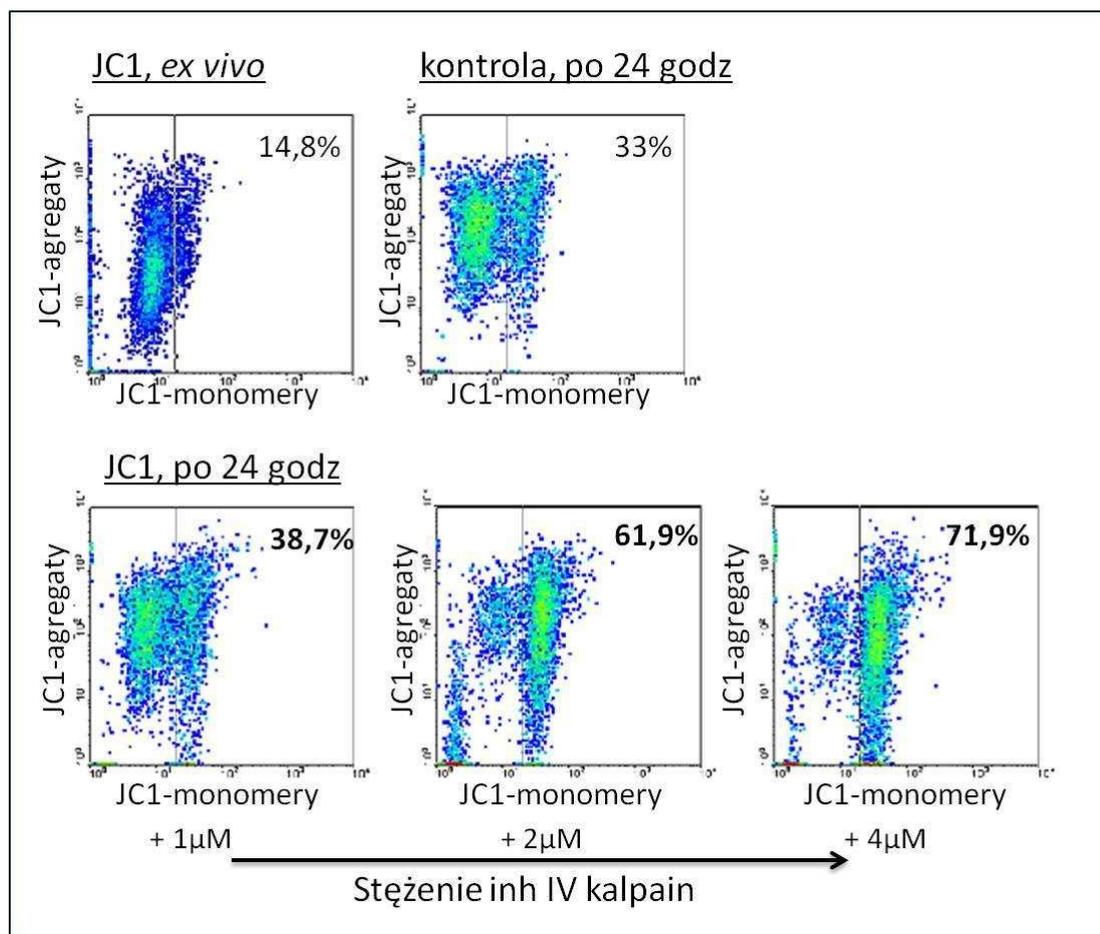
starszej grupy – grupy te różnią się również aktywnością  $\mu$ -kalpainy oraz ilością kalpastatyny w blastach. Również fenotyp immunologiczny typu pro-B opisuje pacjentów z silnie zahamowaną apoptozą, w stosunku do pacjentów z grupy common. Zatem, być może, brak apoptozy związany jest właśnie z faktem nadmiernie zaaktywowanej kalpainy w tych blastach.

#### **4.4 Wpływ zahamowania aktywności $\mu$ -kalpainy *in vitro* na proces apoptozy w blastach ALL.**

Następnym celem niniejszej pracy była próba wywołania zmian w poziomie apoptozy blastów ALL poprzez chemiczną modulację działania kalpainy w tych komórkach za pomocą peptydowego inhibitora.

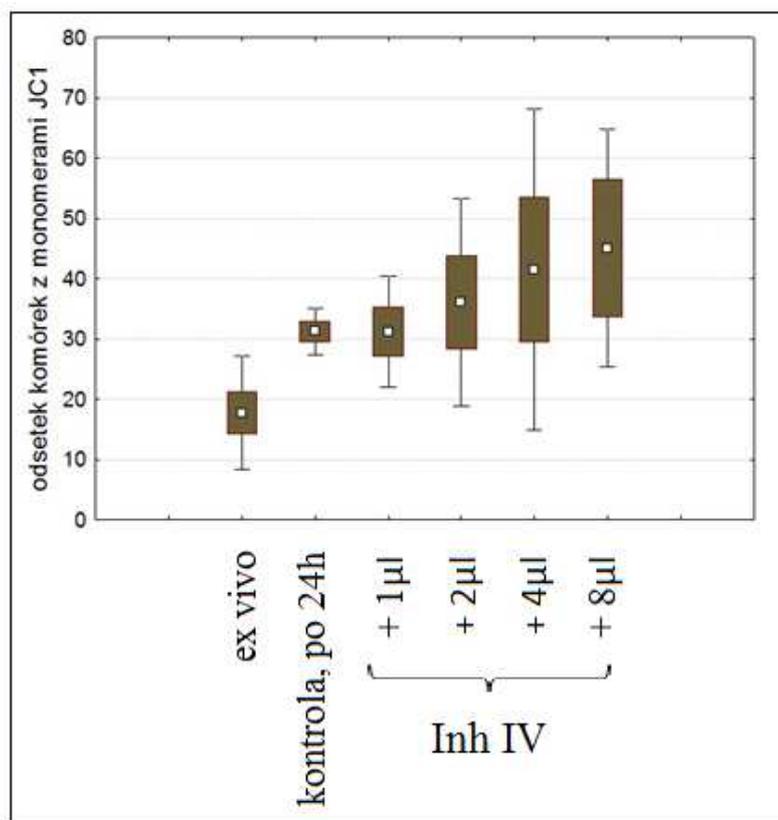
Depolaryzacja mitochondriów w blastach ALL inkubowanych przez 24 godziny z dodatkiem inhibitora IV kalpain oceniana była przy użyciu kationowej sondy JC1 (patrz Materiały i Metody). Zdecydowano się na ten związek z uwagi na jego zdolność do przenikania przez błonę komórkową, stosunkowo wysoką specyficzność wobec kalpainy oraz udowodnione w literaturze jego działanie hamujące na enzym [127,157]. W doświadczeniu posłużono się różnymi stężeniami inhibitora IV, by ocenić również efekt dawki. Poziom apoptozy oceniano *ex vivo* - natychmiast po otrzymaniu próbki szpiku oraz po 24 godzinach hodowli *in vitro* - zarówno w komórkach z dodatkiem inhibitora IV, jak i grupie kontrolnej tych samych blastów inkubowanych bez inhibitora.

Wykazano znaczny wzrost odsetka komórek zawierających monomeryczną formę sondy JC1, świadczący o nasilonej depolaryzacji mitochondriów (wzroście stopnia apoptozy), wśród blastów poddanych działaniu inhibitora IV kalpain (rycina 32).



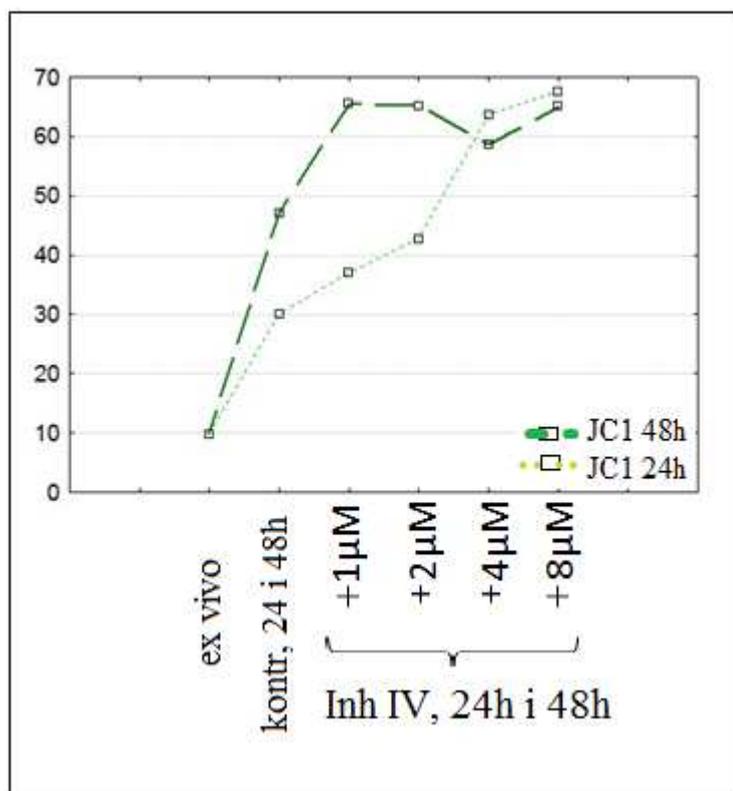
**Rycina 32.** Przykładowy wynik analizy cytometrycznej zmian potencjału mitochondrialnego (fluorescencja monomerów JC1- oś odciętych i agregatów- oś rzędnych) w blastach ALL kontrolnych *ex vivo*, kontroli po 24 godzinach oraz inkubowanych z inhibitorem IV (inh IV) w stężeniach 1, 2, 4μM przez 24h. Odsetki komórek, w których nastąpiła znaczna depolaryzacja mitochondriów naniesiono na rysunku.

Podsumowanie wyników doświadczeń, wykazujących zależność apoptozy blastów ALL wywołanej inkubacją z inhibitorem IV od wysokości jego stężenia w zakresie 1-8 μM pokazano na rycinie 33.



**Rycina 33.** Wzrost odsetka komórek z przewagą monomerów JC1 wskazujący na efekt depolaryzujący mitochondria (pro-apoptotyczny) przy 24 godzinnej inkubacji blastów z rosnącymi stężeniami inhibitora IV kalpaina. Wykres przedstawia średnie wartości, ramki oznaczają błąd standardowy, a wąsy odchylenie standardowe; dane dla 6 pacjentów ALL.

Dodatkowo, blasty pojedynczego pacjenta ALL, od którego udało się uzyskać wystarczającą ilość materiału biologicznego, inkubowano z różnymi stężeniami inhibitora IV przez 24 i 48 godzin. Wyniki przedstawione na rycinie 34, wskazują iż dłuższa inkubacja z niskim (1-2  $\mu\text{M}$ ) stężeniem inhibitora IV daje taki sam efekt, jak krótsza z wysokim (4-8  $\mu\text{M}$ ) stężeniem (zależność i od dawki, i od czasu działania). Doświadczenie wykonano tylko raz, lecz obiecujące wyniki wskazują, iż należy powtórzyć badania na większej ilości próbek, celem potwierdzenia (także statystycznego) tej obserwacji. Determinującym czynnikiem jest tu jednak dostępność niezwykle cennego materiału o odpowiednio wysokiej leukocytozie szpiku.



**Rycina 34.** Porównanie efektu stężenia (1-8  $\mu\text{M}$ ) i czasu działania (24 lub 48 godzin) inhibitora IV kalpaina na depolaryzację mitochondriów w blastach ALL - monomery JC1. Wykres przedstawia wyniki pochodzące od jednego pacjenta ALL.

Podsumowując, w celu oceny możliwego wpływu modulacji działania kalpaina w blastach  $\text{CD19}^+$  pacjentów z ALL na ich apoptozę zastosowano inhibitor IV kalpaina, w stężeniach  $1\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $4\mu\text{M}$  i  $8\mu\text{M}$ . Zaobserwowano znaczny wzrost odsetka komórek zawierających monomeryczną formę sondy JC1, świadcząca o wzroście stopnia apoptozy w blastach poddanych działaniu 2 – 8  $\mu\text{M}$  inhibitora. Wykazano też, iż efekt zależy zarówno od stężenia dodanego inhibitora (udowadniając, że dawki wyższe mocniej oddziałują na enzym  $\mu$ -kalpainę), jak i od czasu jego działania.

#### **4.5 Ocena rzeczywistej aktywności $\mu$ -kalpainy w badanych komórkach ALL.**

We wcześniejszym fragmencie pracy pokazano wyniki przedstawiające względne ilości kalpain oraz kalpastatyny wykrywanej cytometrycznie w komórkach ALL oraz kontrolnych. Zastosowana metoda daje dobrą informację o względnych ilościach (stężeniach) badanych białek, ale nie może być użyta do oceny aktywności proteolitycznej kalpain, co było kolejnym etapem mojej pracy. W związku z tym jako miernik rzeczywistej aktywności kalpainy w blastach ALL zastosowano własną metodę, która zakłada, że ilość natywnej kalpastatyny oraz produktów jej proteolitycznej degradacji zależy bezpośrednio od aktywności kalpainy w komórce [127]. Względną ilość kalpastatyny i jej fragmentów oceniono techniką Western blot. Technika ta umożliwia detekcję i odróżnienie poszczególnych fragmentów kalpastatyny o różnych masach cząsteczkowych, opisując pośrednio aktualną aktywność  $\mu$ -kalpainy w badanych komórkach na zasadzie „im wyższa aktywność proteolityczna, tym więcej produktów proteolitycznej degradacji kalpastatyny da się wykryć w próbce” [127]. Alternatywną metodą jest zymografia kazeinowa [73], jednak technika ta umożliwia jedynie pomiar całkowitej dostępnej aktywności kalpainy w próbce, która jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu w komórce [73], nie dając jednak żadnej informacji na temat aktywności chwilowej w komórkach izolowanych *ex vivo*.

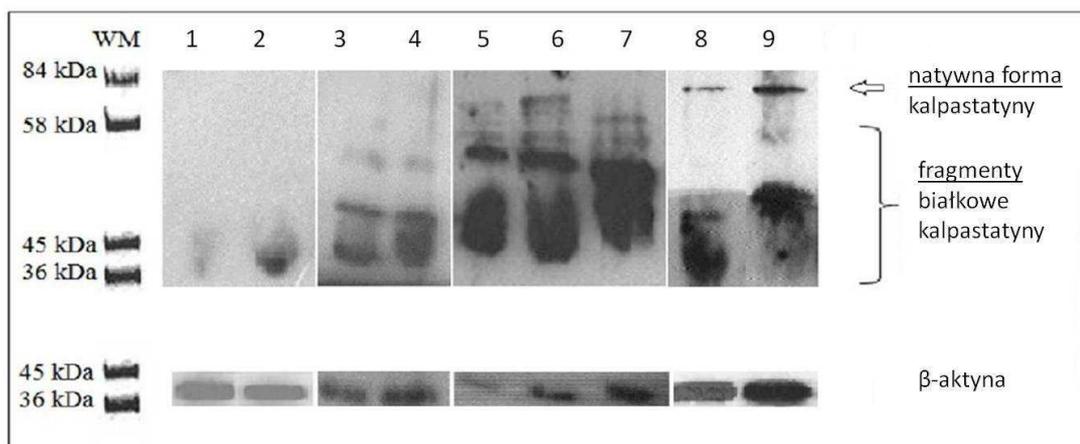
W doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem lizatów komórek ALL, otrzymano zróżnicowane wyniki, różne wielkościowo fragmenty białkowe kalpastatyny - od immunoreaktywnych małych fragmentów ok. 20kDa, poprzez formy pośrednie 30, 50 kDa, do formy natywnej ok. 70 kDa. Pojawiające się formy małe świadczyć mogą o silnej działalności proteolitycznej kalpainy w danym materiale, stąd wyniki podzielono na poszczególne grupy, odpowiadające aktywności kalpainy (Tabela 2). Zestawienie przedstawia, iż większość (27) spośród 37 przypadków ALL wykazywało aktywność kalpainy określaną w tej tabeli jako dużą do maksymalnej. Ciekawym faktem jest, że nie wykryto w żadnym z badanych przypadków ALL samej tylko formy natywnej kalpastatyny, co sugerowałoby brak endogennej aktywności

kalpaina w blastach. Jako grupę porównawczą potraktowano lizaty komórek AML oraz komórki pochodzące od pacjentów nie-ALL.

<b>Grupy kalpastatyny</b>	<b>ilość przypadków ALL</b>
<b>Grupa 6 – maksymalna aktywność</b> ( <u>brak</u> kalpastatyny natywnej i produktów degradacji)	6
<b>Grupa 5 – bardzo duża aktywność</b> ( <u>tylko 1</u> produkt degradacji o małej masie cząsteczkowej)	14
<b>Grupa 4 – duża aktywność</b> ( <u>brak</u> formy natywnej, 2 lub więcej produktów degradacji o małej m.cz.)	7
<b>Grupa 3 – średnia aktywność</b> (forma natywna + 2 lub więcej produktów degradacji o <u>małej</u> m.cz. )	3
<b>Grupa 2 – mała aktywność</b> (forma natywna + 1 - 2 produktów degradacji o <u>małej</u> m.cz.)	4
<b>Grupa 1 – bardzo mała aktywność</b> (forma natywna + nieliczne produkty degradacji o <u>pośredniej</u> m.cz.)	3

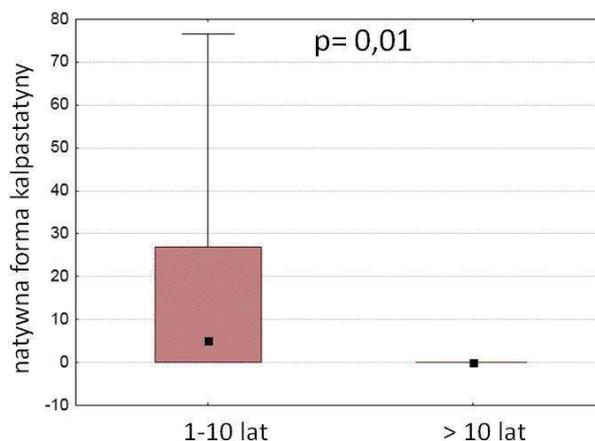
**Tabela 2.** Zestawienie liczb pacjentów, u których blasty wykazywały różny poziom aktywności kalpaina mierzonej degradacją kalpastatyny (patrz schemat na rycinie 9).

Rozkład poszczególnych prążków na żelu, odpowiadających natywnej kalpastatynie oraz produktom jej proteolitycznego rozkładu o malejącej masie cząsteczkowej przedstawia rycina 35, jako przykładowy wynik dla przeprowadzonych doświadczeń. Jako białko referencyjne posłużyła  $\beta$ -aktyna, względem której ustalono densytometrycznie poziom białka kalpastatyny.



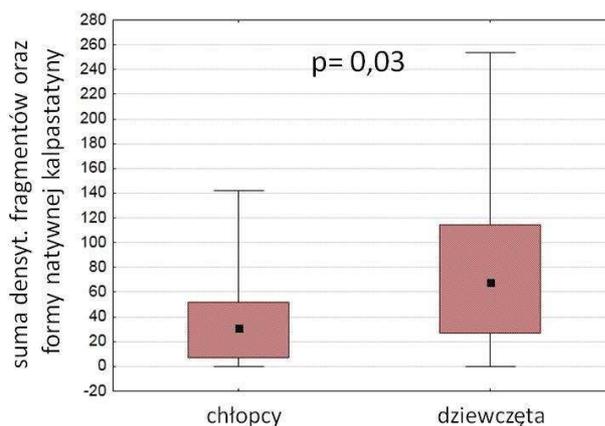
**Rycina 35.** Zestawienie przykładowych wyników doświadczeń, w których w badanym materiale wykryto zróżnicowaną aktywność kalpajny ocenianą na podstawie stopnia degradacji kalpastatyny. Ścieżki 1-2: bardzo duża endogenna aktywność proteolityczna, 3-4: duża aktywność; 5-7: pośrednia i 8-9: niska aktywność proteolityczna kalpajny. Jako białko referencyjne wykorzystano β-aktynę. Obraz reprezentatywny dla 37 pacjentów ALL badanych z użyciem tej techniki.

Sprawdzano również czy aktywność kalpajny w blastach ALL, mierzona stopniem degradacji substratu (natywna kalpastatyna) różni się w grupach wiekowych, otrzymując istotną statystycznie obserwację mówiącą, iż u dzieci starszych (>10 lat) brak całkowicie tej formy białka, co odpowiada wyższej aktywności kalpajny (rycina 36). W tejże grupie wiekowej udowodniono wcześniej również znacznie podwyższony poziom enzymu kalpajny, a także zahamowaną zdolność do ulegania apoptozie. Tym samym wyniki tego ostatniego doświadczenia potwierdzają tezę mówiącą, iż za zredukowaną do zera obecność formy natywnej inhibitora odpowiada nadmierna aktywność proteolityczna kalpajny, która również może wpływać na zahamowanie apoptozy w blastach ALL pochodzących od tych pacjentów.



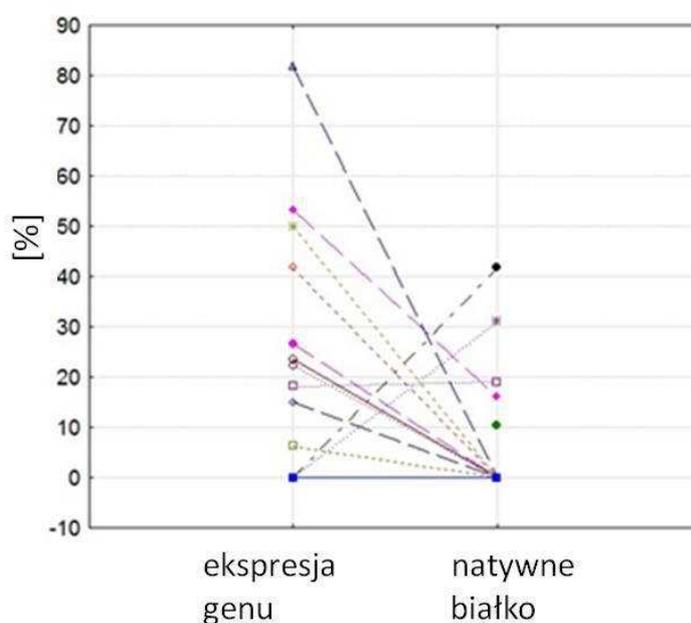
**Rycina 36.** Endogenna aktywność kalpainy w blastach ALL mierzona stopniem degradacji kalpastatyny (ubytkiem formy natywnej) jest znacząco większa u starszych pacjentów (wiek > 10 lat) (pacjenci 1-10 lat N=27 oraz pacjenci >10 lat N=10).

Ponieważ płeć pacjenta może być jednym z czynników ryzyka w ALL [29], interesujące było sprawdzenie czy pacjenci różniący się płcią mają również inny poziom kalpastatyny (a więc różną aktywność kalpainy). Otrzymane wyniki wskazują, iż rzeczywiście blasty chłopców z ALL cechują się mniejszą zawartością zarówno fragmentów białkowych kalpastatyny, jak i formy natywnej białka (rycina 37), różnica jest znacząca statystycznie. Ten wynik świadczy o wyższej aktywności proteolitycznej kalpainy u chłopców niż u dziewcząt z ALL.



**Rycina 37.** Istotnie niższa zawartość kalpastatyny, zarówno formy natywnej jak i jej zdegradowanych fragmentów peptydowych, w blastach ALL pacjentów płci męskiej, przy N=16 chłopców i 21 dziewcząt. Wartość liczbową kalpastatyny, podano jako wartość densytometryczną w odniesieniu do białka  $\beta$ -aktyny (jako standard 100%).

W celu sprawdzenia, czy poziom ekspresji genu kalpastatyny koreluje z ilością wykrywanego techniką Western blot natywnego białka, wykonano zestawienie przedstawione na rycinie 38. W większości par gen-białko, ekspresja genu jest wysoka, zaś odpowiadający jej poziom natywnego białka jest wyraźnie obniżony. Przyczyny tego zjawiska należy upatrywać w działaniu nadaktywnej  $\mu$ -kalpajny, która degraduje natywną formę swego inhibitora, z każdą rundą aktywności proteolitycznej zmniejszając jego dostępną ilość i prowadząc do powstania peptydowych produktów degradacji.



**Rycina 38.** Zestawienie poziomu ekspresji genu oraz obecności natywnej formy białka kalpastatyny w tych samych blastach ALL pochodzących od 13 pacjentów ALL. Ekspresję genu kalpastatyny podano jako procent ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*, natomiast poziom białka jako procent ilości białka referencyjnego  $\beta$ -aktyny.

Wykorzystując własną, wcześniej opublikowaną metodę, dokonano oceny rzeczywistej aktywności  $\mu$ -kalpajny w badanych komórkach ALL za pomocą względnej ilościowej oceny natywnej formy kalpastatyny oraz produktów jej proteolitycznego rozkładu przez kalpajny. Otrzymane wyniki wskazują na silną, ale zróżnicowaną aktywność proteolityczną kalpajny w blastach pochodzących od wszystkich pacjentów z ALL. Porównanie ilości pozostałej natywnej formy kalpastatyny pokazuje tendencję w kierunku jej mniejszej ilości (a więc większej aktywności kalpajny) w blastach ALL

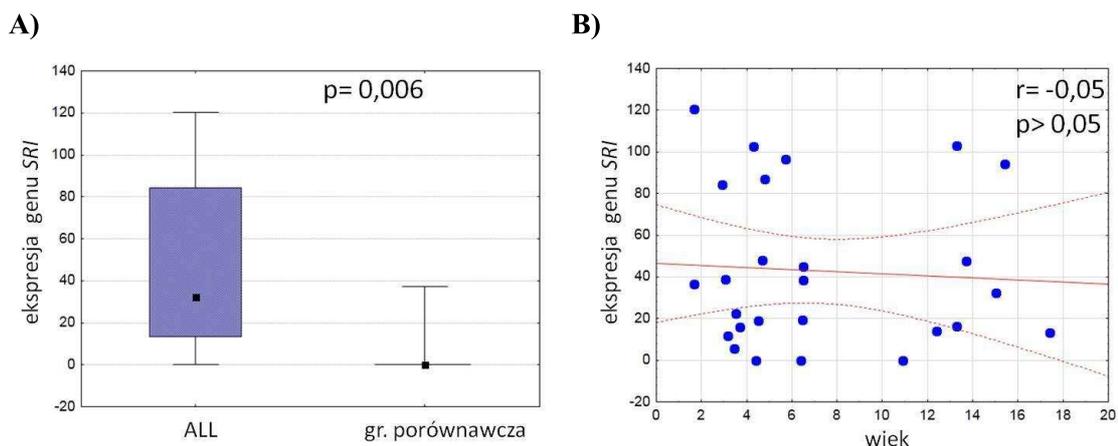
względem komórek grupy porównawczej. Wykazano też, że blasty chłopców z ALL zawierają istotnie mniej, zarówno fragmentów białkowych kalpastatyny, jak i formy natywnej; aktywność kalpainy jest więc w blastach pacjentów – chłopców wyższa niż u dziewczynek. Udowodniono też, iż u pacjentów starszych niż 10 lat brak całkowicie natywnej formy kalpastatyny, co wobec wykazanej wcześniej nadaktywności  $\mu$ -kalpainy w tej grupie, może mieć silny związek przyczynowo - skutkowy.

#### **4.6 Ocena ekspresji genu i poziomu białka sorcyny w blastach ALL oraz próba oszacowania zależności między sorcyną a systemem białkowym kalpaina-kalpastatyna.**

W ostatniej części doświadczalnej, niniejszej pracy oceniano wielkość ekspresji genu *SRI* oraz ilość białka sorcyny w blastach ALL oraz komórkach grupy kontrolnej. Podjęto się również próby znalezienia związku między badanym białkiem, a elementami systemu kalpaina - kalpastatyna.

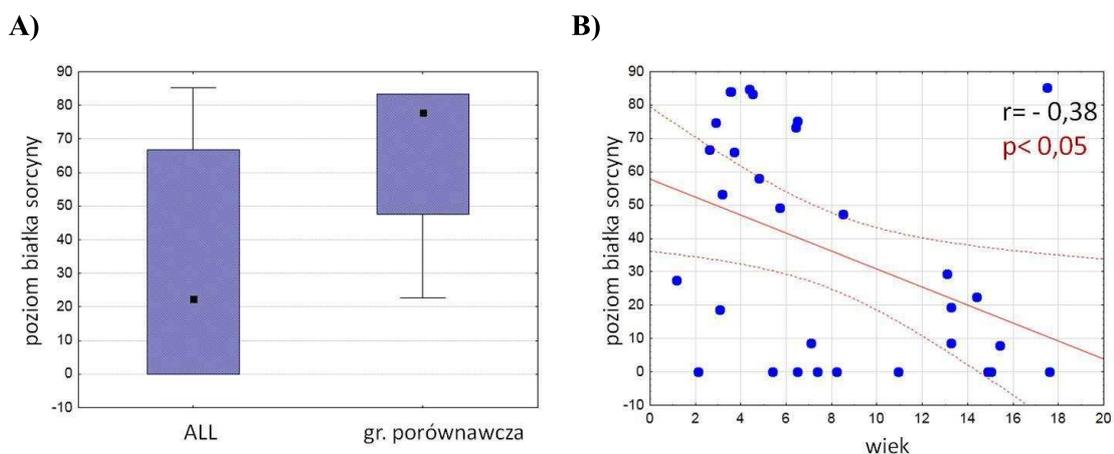
##### **4.6.1 Ocena poziomu ekspresji genu *SRI* i ilości białka sorcyny w komórkach ALL oraz grupy porównawczej.**

Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji genu *SRI* między blastami białaczkowymi a komórkami porównawczymi. Zależność, przy  $p=0,006$  (rycina 39A), wskazuje na znaczącą nadekspresję genu sorcyny w komórkach ALL w porównaniu do komórek  $CD19^+$  z grupy porównawczej. Warto dodać, że ekspresja genu *SRI* w grupie kontrolnej wynosiła w większości przeprowadzonych doświadczeń 0 (z tylko jednym wyjątkiem, nie wpływając na zmianę poziomu istotności różnicy). Nie wykryto różnic w ekspresji genu *SRI* w blastach ALL w zależności od płci, wieku (rycina 39B), fenotypu immunologicznego, czy innych parametrów klinicznych.



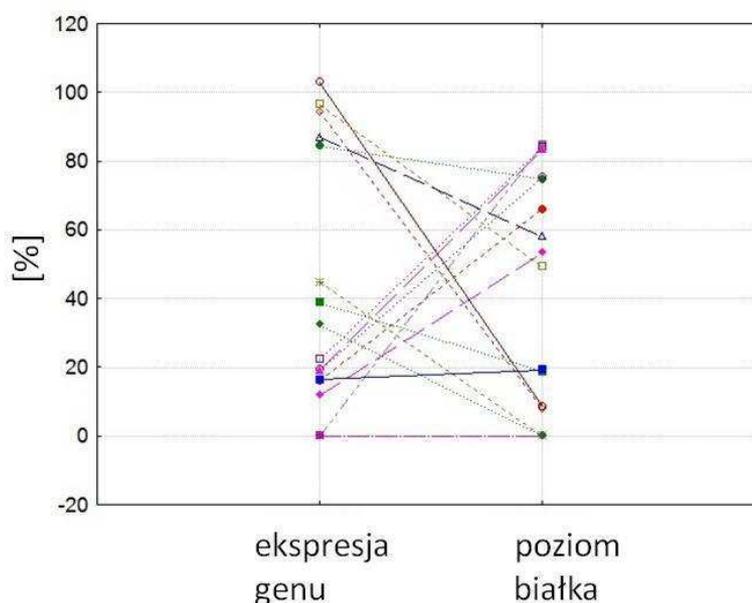
**Rycina 39.** Wysoki poziom ekspresji genu sorcyny (*SRI*) w blastach ALL oraz znikomo niski w komórkach porównawczych, przy istotności  $p < 0,05$ , dla blastów  $N = 27$  oraz grupy porównawczej  $N = 6$  (A) oraz brak korelacji między ekspresją genu a wiekiem pacjenta ALL (B).

Po wykazaniu istotnych różnic w poziomie ekspresji genu *SRI*, postanowiono ocenić poziom ilości wykrywanego białka sorcyny techniką Western blot. Przy porównaniu poziomu sorcyny w lizatach ALL i grupy porównawczej nie zarejestrowano istotnej różnicy w ich ilości. Grupa porównawcza stanowiła 4 próbki pochodzące od osób nie-ALL, w porównaniu do licznej grupy lizatów z blastów, co może być przyczyną braku znamienności statystycznej obserwowanych różnic (rycina 40A). Wykazano również, iż w lizatach ALL ilość białka sorcyny koreluje ujemnie z wiekiem pacjentów - w blastach młodszych pacjentów ALL poziom białka sorcyny jest wyższy (rycina 40B). Nie wykazano związku poziomu białka sorcyny z płcią, czy parametrami klinicznymi.



**Rycina 40.** Porównanie poziomu białka sorcyny w lizatach pochodzących z komórek ALL oraz grupy porównawczej nie wykazuje różnic istotnie statystycznych (A:  $N = 33$  lizatów ALL oraz 4 nie-ALL), zaś poziom białka sorcyny wykazuje znamiennej ujemnej korelację, przy  $p < 0,05$ , z wiekiem pacjentów ALL (B).

Następny etap stanowiła próba znalezienia zależności między poziomem ekspresji genu SRI a ilością białka sorcyny. Rycina 41 wskazuje, iż brak bezpośredniego związku między tymi wielkościami – znaczna ekspresja genu nie zawsze koreluje z podwyższonym poziomem białka w blastach, nie w każdym badanym przypadku są one na porównywalnych poziomach. Można zaobserwować podział na grupę pacjentów, u których, mimo znacznej wielkości ekspresji genu SRI, ilość białka sorcyny w blastach ALL jest niska, oraz grupę o odwrotnej tendencji, a więc o niskiej ekspresji genu, ale dużym poziomie białkowego produktu.



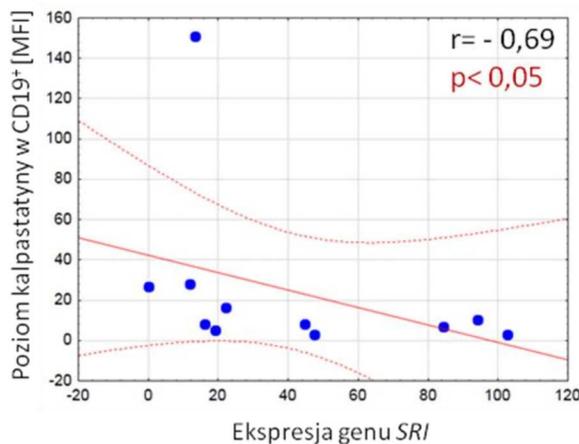
**Rycina 41.** Brak bezpośredniego związku między poziomami ekspresji genu *SRI* i białka sorcyny w blastach ALL (wyznaczono 16 par gen - białko sorcyny zestawione na rycinie), wyniki dla genu sorcyny *SRI* podano jako procent ekspresji genu referencyjnego *GAPDH* oraz dla poziomu białka jako procent ilości białka referencyjnego  $\beta$ -aktyny.

#### 4.6.2 Zależności między sorcyną a białkami systemu kalpainowego w ludzkich komórkach ALL.

Celem kolejnego etapu pracy była próba oszacowania czy istnieje wykrywalna i potwierdzona istotnością statystyczną korelacja między elementami systemu kalpainowego, a sorcyną.

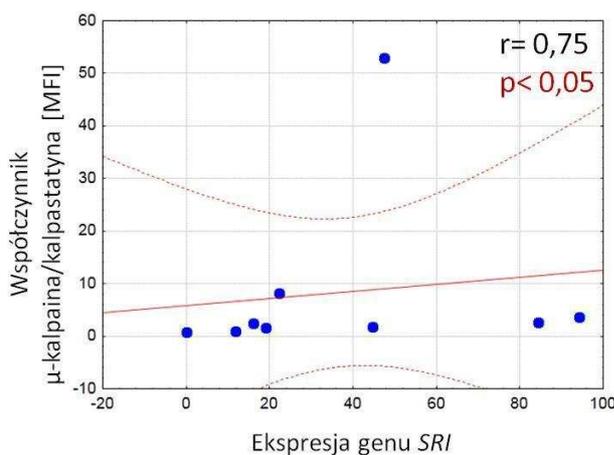
Wykazano, iż występuje istotna, ujemna korelacja między ekspresją genu sorcyny, a ilością kalpastatyny w blastach ALL (oceniając ją jako jej MFI); w

komórkach o dużej ilości wewnątrzkomórkowej kalpastatyny, ekspresja genu sorcyny jest niska (rycina 42).



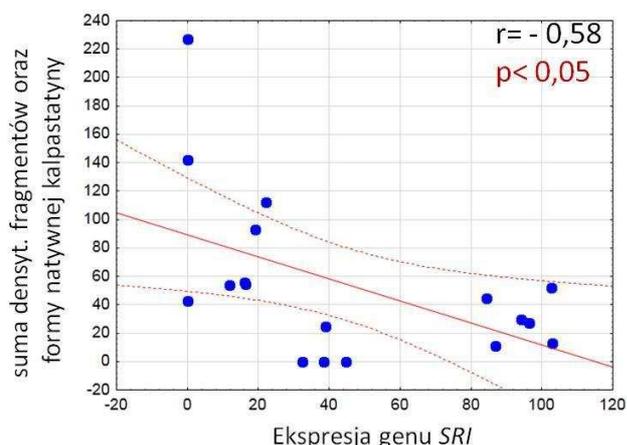
**Rycina 42.** Korelacja ujemna między ilością kalpastatyny [MFI] a ekspresją genu sorcyny w blastach ALL, przy  $p < 0,05$  i  $N=11$ .

Także, jeśli z ekspresją genu sorcyny korelowano wartość stosunku określonych cytometrycznie (MFI) poziomów  $\mu$ -kalpajny do kalpastatyny, wykazano istnienie statystycznie istotnej ( $p < 0,05$ ) korelacji dodatniej, zgodnie z którą wraz ze wzrostem aktywności enzymu kalpajny, rośnie ekspresja sorcyny w blastach ALL (rycina 43).



**Rycina 43.** Korelacja dodatnia między współczynnikiem proporcji [MFI]  $\mu$ -kalpajny do kalpastatyny a ekspresją sorcyny w blastach ALL, przy  $p < 0,05$  i  $N=9$ .

Zestawienie ekspresji genu sorcyny z poziomem aktywności kalpainy mierzonym stopniem degradacji kalpastatyny, przedstawia rycina 44. Jak widać, spadkowi ilości białka kalpastatyny i fragmentów jej degradacji towarzyszy wzrost ekspresji genu sorcyny, również ta korelacja jest znamienna statystycznie ( $p < 0,05$ ). Zależności takiej nie zanotowano w komórkach pochodzących od grupy porównawczej, co może świadczyć o specyficznej zależności pomiędzy aktywnością kalpainy, a ekspresją *SRI* w patologicznych blastach ALL. Niestety nie udało się zaobserwować podobnych zależności pomiędzy aktywnością kalpainy, a poziomem sorcyny mierzonym techniką Western blot, być może z powodu małej grupy badanych i znacznego rozrzutu wyników.



**Rycina 44.** Ujemna korelacja między ekspresją genu *SRI*, a sumą fragmentarycznej formy białkowej i natywnej kalpastatyny,  $N=17$ , przy  $p < 0,05$ .

**Podsumowując, w tym rozdziale wykazano znacząco wysoką nadekspresję genu sorcyny w blastach ALL w porównaniu do grupy kontrolnej, w której w większości przeprowadzonych doświadczeń nie wykazano wcale ekspresji dla genu *SRI*. Wysokiej aktywności *SRI* nie towarzyszył istotny wzrost produktu białkowego. Świadczyć to może o fakcie, że gen *SRI* nie jest aktywny w nienowotworowych limfocytach B, natomiast jego aktywacja może mieć znaczenie w patomechanizmie ALL. Wykazano również, iż w lizatach ALL ilość białka sorcyny koreluje ujemnie z wiekiem pacjentów - w blastach młodszych pacjentów poziom sorcyny jest istotnie wyższy. Warto tu odnotować fakt, iż w blastach młodszych pacjentów ALL poziom  $\mu$ -kalpainy i jej aktywność**

**endogenna nie są tak wysokie jak w komórkach nowotworowych pochodzących od starszych pacjentów.**

**Udowodniono, iż ekspresja genu sorcyny koreluje ujemnie, w stopniu znacznym, z aktywnością kalpainy i ilością kalpastatyny w blastach ALL, gdyż w komórkach o dużej ilości kalpastatyny i o wysokim współczynniku ilości  $\mu$ -kalpainy do kalpastatyny, ekspresja genu sorcyny jest niska.**

## 5. DYSKUSJA

Białaczki są najczęstszym typem nowotworów krwi w dziecięcej grupie pacjentów, a wśród nich zdecydowanie najczęściej występuje ostra białaczka limfoblastyczna (ALL). Patofizjologia choroby dotyczy masowego zajęcia szpiku kostnego młodymi, niedojrzałymi i funkcjonalnie uszkodzonymi limfoblastami linii B lub T, z czasem może dojść do wyparcia prawidłowych procesów krwiotworzenia i idących za tym dramatycznych skutków w organizmie [2,16,158]. Przyczyny choroby, mimo intensywnych badań, ciągle pozostają nieznane. Można podejrzewać pewne korelacje z czynnikami endogennymi jak predyspozycje genetyczne, czy inne zespoły chorobowe; postuluje się też wpływ czynników egzogennych jak szkodliwe warunki środowiskowe, promieniowanie, substancje chemiczne. Nie jasna jest też potencjalna rola przebytych infekcji bądź ich braku w etiologii ALL, zgodnie z poglądami Greaves i wsp. [37,42,44].

Intensywny rozwój badań i zastosowanie nowoczesnej polichemioterapii wraz z leczeniem dodatkowym, zwiększyło znacznie liczbę wyleczeń wśród dziecięcych pacjentów ALL. Mimo imponującego sukcesu terapeutycznego, który nastąpił w ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat, cały czas występuje grupa pacjentów ALL, u których stosowane leczenie nie odnosi skutku, dochodzi do wznowy choroby, czy wystąpienia poważnych skutków ubocznych [2,158,159,160]. Fakt ten wymusza konieczność naukowych poszukiwań nowych czynników prognostycznych, mechanizmów patogenetycznych czy potencjalnych celów terapeutycznych. Oprócz znanych parametrów stosowanych przy diagnostyce ALL, jak wiek i płeć pacjenta, wielkość wstępnej leukocytozy, wczesna odpowiedź na leczenie, obecność resztkowej choroby nowotworowej MRD, coraz większy nacisk kładzie się na markery molekularne – genetyczne i białkowe. Wśród nowych czynników prognostycznych zaczyna się dostrzegać i intensywnie badać czynniki zaangażowane zarówno w proces nadmiernej, nowotworowej proliferacji blastów ALL, angiogenezę, jak też związane ze zjawiskiem zahamowanej apoptozy tych komórek. Do takich innowacyjnych czynników progresji choroby, bazujących na zjawisku zakłóconej równowagi między proliferacją a śmiercią komórkową, zalicza się ostatnio poziom białek rodziny Bcl-2 czy IAP np. surwiwiny i białka Livin [13,29,52]. Potencjalnym celem w poszukiwaniach nowych markerów

prognostycznych oraz poznania patomechanizmów ALL może stać się również system kalpaina – kalpastatyna, jako białka których aktywność reguluje między innymi procesy śmierci komórki [13,94]. Kalpainsy są cysteinowymi proteazami, które do swojej pełnej aktywności wymagają odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Najbardziej znane białka tego systemu to  $\mu$ -kalpaina i m-kalpaina, które charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa w budowie, różni je natomiast wymagana ilość jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do uaktywnienia. W skład systemu wchodzi również specyficzny, endogenny inhibitor enzymu - kalpastatyna. System kalpaina – kalpastatyna funkcjonuje w układzie dokładnie regulowanej równowagi wewnątrzkomórkowej; tylko odpowiednie proporcje i właściwości poszczególnych składników gwarantują pełną funkcjonalność systemu [76,77,81]. Zachowanie tej wewnątrzkomórkowej równowagi składników systemu kalpaina-kalpastatyna jest bardzo istotne z uwagi na liczne funkcje jakie pełnią kalpainsy w komórkach – od udziału w mechanizmach proliferacji i różnicowania komórek, poprzez modulację wielu typów sygnałów wewnątrzkomórkowych, do apoptozy i śmierci komórki. Wykazano, że zaburzenia w obrębie systemu kalpainowego (niewłaściwa aktywność proteolityczna kalpain) związane są z wieloma patologiami komórkowymi; udział kalpain odnotowano w szeregu schorzeń neurodegeneracyjnych, chorób mięśni, a także w chorobach nowotworowych [73,77,79,94,106,107,113,119]. Kalpainsy postulowane są zarówno jako białka doprowadzające, poprzez oddziaływania bezpośrednie (np. na kluczowe białka procesu śmierci komórki), bądź w sposób pośredni do apoptozy, z drugiej strony zaznacza się też ich silną rolę anty-apoptotyczną. Sprzeczność tę można wytłumaczyć zależnością od schorzenia, z którym jest związana, być może również miejscem zachodzących oddziaływań (typem tkanki); w stopniu szczegółowym kwestia ta pozostaje niejasna. Sprawą kluczową jest również podkreślenie faktu, iż kalpainsy nie działają na większość swoich substratów w sposób destruktywny, lecz jedynie przeprowadzając częściową proteolizę. Często ta ograniczona proteoliza dokonana przez kalpainę, uaktywnia substrat umożliwiając jego działanie w komórce. Właśnie w ten sposób regulowana jest aktywność kalpastatyny, która dopiero po proteolitycznej modyfikacji przez kalpainę, może stać się w pełni funkcjonalnym inhibitorem enzymu [76,95,96]. Wspomniane relacje pomiędzy mechanizmem molekularnym apoptozy, a aktywnością kalpain w komórkach polegają między innymi na fakcie, iż aktywna

kalpaina może dokonać zarówno ograniczonej (aktywującej) proteolizy kaspazy 3 – stymulując proces apoptozy, jak też całkowicie zdegradować tę kaspazę, hamując bądź uniemożliwiając apoptozę. Na dodatek, aktywna kaspaza 3 może proteolitycznie modulować zarówno aktywność kalpainy, jak też wpływać na kalpastatynę [73,94].

Pętla sprzężeń zwrotnych w obrębie systemu kalpaina – kalpastatyna może jednak ulec zachwianiu i doprowadzić do zakłócenia naturalnych procesów proliferacji i apoptozy w komórce.

Wspomniana wyżej praca zespołu Witkowski i wsp. [73] wykazała, że nadmierna ilość i aktywność  $\mu$ -kalpainy może być przyczyną zniesionej zdolności do apoptozy limfocytów białaczkowych w przewlekłej białaczce limfocytarnej B-CLL. W tej pracy postawiono więc hipotezę o możliwości udziału zaburzeń w systemie kalpaina - kalpastatyna w patogenezie i oporności na apoptozę blastów w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci (ALL). Sprawdzenie poprawności tej hipotezy stanowiło jej główny cel badawczy. Przeprowadzone badania wykazały, że hipoteza była poprawna i że nadmierna endogenna aktywność  $\mu$ -kalpainy w blastach ALL jest odpowiedzialna za zmniejszoną skłonność tych komórek do ulegania spontanicznej apoptozie.

## **I. Ocena ilości i aktywności systemu kalpaina – kalpastatyna w blastach ALL**

Podczas badań wykazano, po pierwsze podwyższony odsetek białaczkowych limfoblastów CD19<sup>+</sup> zawierających znaczne ilości  $\mu$ -kalpainy w porównaniu do limfocytów CD19<sup>+</sup> pochodzących od grupy porównawczej. Także średnia intensywność fluorescencji (MFI) będąca cytometrycznym miernikiem ilości  $\mu$ -kalpainy w blastach ALL jest znacznie podwyższona w stosunku do obserwowanej dla komórek B od dzieci z grupy porównawczej. Wydaje się, iż ten ostatni parametr pozwala na dokładniejszą, choć nadal względną, ilościową ocenę zawartości i stężenia badanego białka w analizowanych komórkach, niż sama wartość odsetka komórek o fenotypie kalpaina<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>. Jak wspomniano wyżej, nadmierna aktywność proteolityczna  $\mu$ -kalpainy postulowana jest w przebiegu różnych patologii, także niektórych białaczek. Badania zespołu Witkowski i wsp. [73] wykazały znaczną rolę  $\mu$ -kalpainy w przebiegu przewlekłej białaczki B-limfocytarnej osób starszych;

kalpaina została tam odnotowana jako enzym silnie zaangażowany w patomechanizm choroby (głównie przez wpływ na prewencję apoptozy) i ulegający znacznej nadaktywności. Wyniki niniejszych badań również wskazują na znaczne, statystycznie istotne podwyższenie ilości tego samego enzymu i podwyższenie jego stężenia w blastach ALL.

W niniejszych badaniach wzięto pod uwagę również, porównawczo, komórki CD19<sup>+</sup> pochodzące ze szpiku dzieci z ostrą białaczką szpikową (AML). Wykazano, że zawartość  $\mu$ -kalpainy w blastach AML nie różniła się istotnie względem grupy porównawczej (u której diagnostyczne nakłucie szpiku wykluczyło rozrostową chorobę hematologiczną). Wynik ten, zwłaszcza w zestawieniu z wcześniejszą, cytowaną pracą dotyczącą kalpain w B-CLL [73], może świadczyć, iż wzrost stężenia kalpainy jest swoisty dla białaczek, wywodzących się z linii limfoblastycznych, a nie dla wszystkich typów nowotworów hematologicznych. Obie białaczki (ALL i AML) różnią się też bardzo zdolnością do apoptozy; według doniesień Schuler i wsp. [69] apoptoza w ALL jest znacznie silniej zahamowana niż w przebiegu AML, poziom kaspazy 3 jest też cztery razy wyższy w komórkach AML [161]. Zatem całe zjawisko prewencji apoptozy w komórkach nowotworowych AML może być związane z innymi mechanizmami, a nie z aktywnością kalpain, tak jak w ALL.

Kwestią wartą krótkiego omówienia jest również fakt zastosowania dwóch różnych przeciwciał skierowanych przeciwko  $\mu$ -kalpainie (przyczyna opisana w rozdziale Materiały i Metody oraz częściowo w Wynikach). Wykazano, mianowicie że zjawisko istotnie wyższego odsetka komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup> wśród blastów ALL, niż wśród komórek CD19<sup>+</sup> od dzieci z grupy porównawczej, nie zależy od doboru przeciwciała przeciwko  $\mu$ -kalpainie, pomimo znacznych różnic liczbowych w wynikach uzyskanych z zastosowaniem tych dwóch odczynników. Ze względu na tę wymuszoną sytuację zadbano o utrzymanie proporcjonalnej grupy komórek ALL i nie-ALL badanych zarówno jednym, jak i drugim przeciwciałem, biorąc to również pod uwagę przy wszystkich obliczeniach analitycznych. Uzyskane wyniki, wymuszone zaniechaniem produkcji odczynnika w trakcie realizacji opisanych badań, pokazują tę samą tendencję; są one więc dodatkowym potwierdzeniem istnienia zjawiska wzrostu stężenia enzymu w blastach ALL.

Zastanawiać może czemu wśród dwóch przeciwciał monoklonalnych, mających teoretycznie tę samą specyficzność, jedno wykazuje wartość badanego parametru dwa razy wyższą od drugiego? Odpowiedzią może być zastosowanie w produkcji przez dwie firmy, dwóch różnych klonów (dla przeciwciała 1 – klon B27D8, zaś dla przeciwciała 2 - 15C10) oraz fakt, iż mimo że teoretycznie przeciwciała wykrywają to samo, firmy nie podają czy wykrywane peptydy składowe kalpainy są identyczne. Jeśli zastosowane przeciwciała rozpoznają odmienne peptydy w obrębie cząsteczki  $\mu$ -kalpainy możliwe jest, że dostępność obydwu peptydów jest różna i/lub różne jest powinowactwo przeciwciał do obydwu epitopów; w każdym przypadku można by było oczekiwać różnych (a więc takich, jak zaobserwowane w tej pracy) wyników oznaczeń wykonanych z użyciem obydwu odczynników.

W blastach ALL sprawdzano również poziom drugiej z ubikwitycznych kalpain, czyli m-kalpainy. Wykazano, iż odsetek komórek CD19 zawierających m-kalpainę jest znikomo niski zarówno w grupie ALL, jak i grupie traktowanej jako kontrola. Również poziom enzymu mierzony poprzez jego MFI, wskazuje na bardzo niski poziom m-kalpainy w badanych komórkach; ilość ta nie odbiega w sposób znaczący od kontroli (rycina 22). Wyniki te są podobne do obserwacji m-kalpainy w komórkach B-CLL [73], gdzie również poziom m-kalpainy nie ulegał wzrostowi w nowotworowych komórkach, lecz nawet ulegał obniżeniu względem komórek zdrowych. Wyniki te mogą świadczyć o fakcie, iż m-kalpaina zdaje się nie odgrywać istotnej roli w patomechanizmie ALL, w przeciwieństwie do  $\mu$ -kalpainy. Oczywiście, by enzym cechował się znaczną aktywnością, wcale nie jest wymagane zwiększenie jego ilości, lecz brak różnic między grupą ALL, a nie-ALL może potwierdzać tezę o niewielkim wpływie tej izoformy enzymu na procesy chorobowe w nowotworowych blastach dziecięcych.

Oszacowując ilości/stężenia składników systemu kalpainowego w limfoblastach ALL, nie można pominąć kalpastatyny – endogennego inhibitora kalpainy. Kalpastatyna występuje razem z kalpainami w tych samych komórkach, wpływając na aktywność enzymu poprzez związanie się poszczególnych domen kalpainy z subdomenami inhibitora i zachodzącą następnie inhibicję kompetycyjną. W tych badaniach, odsetek blastów kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, pokazuje wartości wyższe w porównaniu do komórek porównawczych, lecz grupa ta jest silnie heterogenna.

Znaczne zróżnicowanie w obrębie badanej grupy blastów ALL wpływa prawdopodobnie na powyższy wynik, świadcząc iż część wśród badanych część osób nie miała wcale kalpastatyny, większość miała poziom niewielki, tylko u paru osób jej ilość była podwyższona (widoczne znaczne odchylenia wokół wartości średniej). Należy tu jednak wspomnieć, że kalpastatyna jest substratem kalpainy, który nie tylko jest przez nią aktywowany, ale ulega proteolitycznej degradacji, co może być wykorzystane do pomiaru endogennej aktywności enzymu [127].

Następnie postanowiono rozbić tę mało jednolitą grupę w zależności od parametrów klinicznych, czy prognostycznych. Wykazano, iż znacząco wyższy odsetek komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> występuje wśród starszych pacjentów ALL, czyli w grupie wiekowej powyżej 10 lat, niż wśród pacjentów w przedziale od 1-10 lat; w zestawieniu zabrakło pacjentów najmłodszych (mniej niż 1 rok) (rycina 16A). Dodatkowo stwierdzono też, że procent blastów kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> związany jest istotnie z fenotypem immunologicznym, gdzie najwyższy odsetek łączy się z fenotypem pro-B, a najniższy z dojrzałym B-komórkowym (rycina 16B). Typ common ALL stanowi grupę o pośredniej, zróżnicowanej ilości odsetka badanych komórek. Fenotyp immunologiczny białaczek ALL dojrzałych B- i T-komórkowych, może być negatywnym parametrem rokowniczym (względem białaczek progenitorowych ALL) [2,9,16]; interesujące jest, iż w tym właśnie dojrzałym typie B-cell stwierdzono najniższy odsetek blastów kalpastatyna<sup>+</sup>. Z kolei wiek, w którym zdiagnozowano ALL u pacjenta odgrywa znaczną rolę w rokowaniu klinicznym; zespół Pui i wsp. [9] twierdzi, iż dzieci w wieku 1 – 9 lat uzyskują lepsze perspektywy wyleczeń, niż grupa pacjentów poniżej pierwszego roku życia, bądź starszych niż 10 lat. Podsumowując, w wynikach własnych wykazano różnice odsetka komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> w blastach osób różnych grup wiekowych, zatem parametr ten wydaje się zmieniać wraz z wiekiem oraz w grupach ryzyka pacjentów.

Zawartość kalpastatyny mierzona jako MFI w blastach ALL, podobnie jak odsetek komórek wykazany powyżej, pokazuje jej podwyższoną ilość względem grupy porównawczej (obserwacja na granicy istotności statystycznej), charakteryzującej się znacznym rozrzutem wyników. Mimo tendencji do podwyższenia poziomu białka kalpastatyny względem kontroli, w porównaniu do ogromnie podwyższonego poziomu MFI (stężenia)  $\mu$ -kalpainy, widać znaczne

przesunięcie proporcji składników układu inhibitor – enzym na rzecz tego ostatniego, co może przekładać się na zakłócenie funkcji systemu kalpaina - kalpastatyna prowadzące do nadmiernego wzrostu aktywności proteolitycznej. Wykazano, iż odsetek komórek kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> koreluje z jej ilością ocenianą jako MFI, a więc może być wykorzystywany jako miernik ilości enzymu w badanych komórkach. Zawartość enzymu i inhibitora oraz odsetki komórek je zawierających korelują ze sobą w blastach ALL, pomimo że badane próbki wykazywały silnie zróżnicowany poziom kalpastatyny. Wynik ten można interpretować jako znacznie zróżnicowaną aktywność proteolityczną kalpainy w blastach pochodzących od różnych pacjentów.

Po wykazaniu wysoce podwyższonym poziomie  $\mu$ -kalpainy, wskazującym na zakłóconą równowagę ilościową enzymu w badanym systemie proteolitycznym, postanowiono sprawdzić czy różnice te dotyczą również ekspresji genów tychże białek. Postawiono pytanie badawcze – czy podwyższona ilość białka zależy od nasilonej ekspresji genów powyższych białek i czy ekspresja ta różni się w grupie chorych ALL i porównawczej? Otrzymane powtarzalne wyniki badań techniką RT-PCR wskazują, iż ilość zamplifikowanych produktów genów *CAPN1* i *CAPN2* ( $\mu$ -kalpaina oraz *m*-kalpaina) nie różni się znacząco w grupach ALL i kontrolnej, obserwowany jest jedynie trend w kierunku niższych poziomów ekspresji genów obydwu kalpain w blastach ALL (rycina 25 B, C). Różnice w ilości kalpain pojawiają się zatem w blastach ALL na etapie translacji lub obróbki potranslacyjnej, a nie zależą od nasilonej transkrypcji. Z kolei poziom ekspresji genu kalpastatyny (*CAST*) był dwukrotnie niższy w blastach ALL niż dla komórek kontrolnych. Należy tu podkreślić, iż w większości były to komórki pochodzące od pacjentów o typie immunologicznym common (jako, iż jest to jeden z najczęstszych fenotypów w dziecięcych ALL [16]). Wcześniej wykazano, iż również dla tego fenotypu, poziom białka kalpastatyny (mierzony cytometrycznie jako MFI) wskazywał obniżoną tendencję do obecności wewnątrzkomórkowej tegoż białka; obserwacje ekspresji genu i poziomu białka są więc zgodne.

Przedyskutowania wymaga tutaj postulowany w literaturze fakt, iż nie zawsze poziom białka koreluje dodatnio z wielkością ekspresji swojego genu, co w pewnym stopniu mogłoby wyjaśniać brak korelacji poziomu transkryptu mRNA z ilością jego białka, zwłaszcza dla  $\mu$ -kalpainy. Boyd i wsp. [162] postulują, iż ogromne znaczenie

w poszukiwaniu nowych markerów prognostycznych ma wielkość ekspresji pewnych genów, konieczna jest jednak również detekcja kodowanych przez nie białek, gdyż nie zawsze wystąpi między nimi wprost proporcjonalna zależność. Podobnie twierdzi zespół Gygi i wsp. [163] udowadniając, iż proste założenie proporcji transkryptu mRNA do ilości białka jest niewystarczające i nie zawsze wykazuje korelację. Podczas procesów różnicowania w komórkach szpiku czy białaczkowych liniach komórkowych związek między ekspresją pewnych genów, a ich poziomem peptydów jest często nie większy niż 40 procent [164,165]. Również badania dotyczące zależności gen – białko w przebiegu chorób nowotworowych [166] potwierdzają, iż często brak powyższych korelacji, co może się wiązać z licznymi regulacjami i modyfikacjami na poziomie potranslacyjnym, co zatem nie może być widoczne na poziomie transkrypcyjnym.

Powyższe fakty mogłyby przynajmniej częściowo wyjaśnić znaczne zmiany w ilości enzymu kalpainy w blastach ALL, w porównaniu do wykrywanego poziomu ekspresji genu. Dodatkowym czynnikiem zakłócającym relację między ekspresją genu i ilością białka jest w przypadku systemu kalpaina – kalpastatyna fakt, iż kalpastatyna jest substratem kalpainy i może być przez nią aktywnie degradowana [127].

## **II. Ocena endogennej aktywności proteolitycznej $\mu$ -kalpainy poprzez detekcję produktów degradacji kalpastatyny**

Stwierdzenie różnic w ilości/stężeniu  $\mu$ -kalpainy i kalpastatyny pomiędzy blastami ALL i nienowotworowymi komórkami CD19<sup>+</sup> jest interesujące, ale nie mówi nic o tym, czy proteaza była aktywna w badanych blastach. W związku z tym po oszacowaniu ilości białka i poziomu ekspresji genów systemu kalpaina – kalpastatyna zdecydowano się na ocenę aktywności enzymu w badanych blastach ALL. W tym celu posłużono się własną metodą pośredniego oszacowania aktywności kalpainy poprzez jej działanie na swój inhibitor (opisano dokładnie w części Materiały i Metody). Metoda ta, według Mikosik i wsp. [127] zakłada ocenę aktualnej, chwilowej aktywności enzymu poprzez detekcję produktów proteolizy kalpastatyny. Wiedząc, że kalpastatyna jest naturalnym substratem kalpainy, występującym w tych samych komórkach [81,91,95] sposób ten wydaje się logicznie

uzasadniony i nie wymaga dodatku żadnych czynników ingerujących (np. w postaci syntetycznego substratu), mogących wpływać na funkcjonowanie systemu. Dzięki zastosowaniu techniki Western blot otrzymano nie tylko ilościowe, densytometrycznie obliczone wartości poziomu białka kalpastatyny, ale również dodatkowe informacje, mówiące pośrednio o aktywności kalpainy. Zazwyczaj przy pomiarze aktywności kalpain badacze decydują się na detekcję samej kalpainy – jej formy 80kDa (enzym nieaktywny) i ok. 78kDa (aktywna forma, po proteolitycznym nacięciu) [162,167]. Równie często stosowana jest technika zymografii kazeinowej [73,87,154], która ocenia jednak całkowitą dostępną aktywność kalpainy, proporcjonalną do jej stężenia w badanym materiale. Często też stosuje się pomiar proteolizy konkretnego substratu kalpainy, podanego do środowiska doświadczalnego, np. fodryny [91,168]. Z kolei zespół Naiapour i wsp. przeprowadza detekcję aktywności kalpainy z użyciem fluorescencyjnego substratu i cytometrii przepływowej [169], a Rosser i wsp. dokonuje mikroskopowej detekcji fluorescencji [170]. Wszystkie te techniki pomiaru kalpainy niosą cenne informacje odnośnie aktywności enzymu, jednak zastosowanie wewnętrznego substratu (endogennej kalpastatyny), bez konieczności dodawania go do środowiska hodowli, pozwala zmierzyć nie całkowitą dostępną aktywność kalpainy, ale chwilową aktywność, taką jaka była wewnątrz komórek ALL. W pracy zatem zdecydowano się zastosować ten sposób pomiaru aktywności proteolitycznej kalpainy, jako niosący dodatkowe informacje i nie wymagający ingerencji syntetycznych substratów.

Otrzymano wyniki mówiące o występującej w blastach ALL znacznej aktywności proteolitycznej kalpainy wobec jej endogennego inhibitora, co potwierdza detekcja licznych fragmentów peptydowych kalpastatyny, oprócz formy natywnej tego białka (która w przypadku wyższej aktywności kalpainy jest nieobecna). Wartym podkreślenia jest fakt, iż nie wykryto w żadnym z badanych przypadków ALL samej tylko formy natywnej kalpastatyny (zawsze obecne były małe immunoreaktywne peptydy – produkty degradacji natywnego inhibitora). Można założyć zatem, że w każdym lizacie komórkowym pochodzącym z blastów ALL wyjściowa aktywność proteolityczna kalpainy była relatywnie wysoka. W części badanych próbek nie obserwowano ani natywnej formy kalpastatyny, ani też produktów jej degradacji. Wynik ten mógłby świadczyć, iż kalpastatyna z jakichś niejasnych przyczyn nie jest w tych blastach w ogóle produkowana lub przeciwnie,

iż enzym - kalpaina jest tu tak aktywny, iż substrat - kalpastatyna, ulega nie tylko delikatnej proteolizie, lecz jest kompletnie zdegradowany. Pierwszą możliwością – brak produkcji kalpastatyny – można wykluczyć dzięki stwierdzeniu znacznej aktywności transkrypcyjnej genu *CAST* w blastach. Można więc założyć, iż podczas pętli sprzężeń zwrotnych w układzie kalpainowym, w sytuacji gdy enzym jest nadaktywny następuje stopniowe trawienie domen kalpastatyny; również zgodnie z Porn-Ares i wsp. [95] wyczerpywanie się kalpastatyny może być wynikiem zwiększonej aktywności kalpainy. Inhibitor posiada cztery powtórzone domeny, z których każda jest zdolna do inhibicji kalpain, aczkolwiek najbardziej efektywna w tym procesie jest domena I, zaś najmniej wydajna domena III [89]. Zatem gdy ilość inhibitora zaczyna się zmniejszać i poszczególne domeny ulegają odcięciu, tym samym kalpastatyna traci swe inhibicyjne oddziaływanie wobec enzymu, którego nadaktywność zaczyna się kierować wobec innych elementów białkowych komórki. Wśród nich znajdują się również te związane z apoptozą, być może więc dochodzi do ich zniszczenia i zatrzymania zjawiska śmierci komórkowej. Według Sazontowa i wsp. [92] efekt destrukcyjny wobec kalpastatyny może wywierać kalpaina 2 (m-), lecz nie kalpaina 1 (μ-). Jednak w blastach ALL o stwierdzonej nadaktywności μ-kalpainy ta właśnie izoforma zdaje się być odpowiedzialna za degradację kalpastatyny.

Nie tylko kalpaina może wywierać efekt destrukcyjny na kalpastatynę i ograniczać jej ilość. Według danych literaturowych [91,105] kalpastatyna może też ulegać fragmentacji przez kaspazę 3 w różnych typach tkanek. Wzajemne relacje między kalpainami i kaspazami są postulowane w literaturze [61,91,96]. Jednak w blastach ALL, szczególnie o obniżonej apoptozie, wątpliwym się wydaje by następowała tak silna nadaktywność kaspazy, mogących zredukować kalpastatynę do niewielkich peptydowych fragmentów. Jak wspomniano wyżej, aktywność kaspazy 3 w ALL jest stosunkowo bardzo niska, podobnie jak w B-CLL [73]. Bardziej prawdopodobne jest, iż kaspazy, podobnie jak kalpastatyna, mogą tu ulegać degradacji proteolitycznej (np. przez nadmiernie aktywną kalpainę) i tym samym dezaktywacji.

W pracy wykazano również zależność mówiącą o istotnej statystycznie różnicy w ilości natywnej kalpastatyny (a więc w aktywności kalpainy) w zależności od wieku pacjenta (rycina 36). Aktywność kalpainy w blastach ALL, mierzona

stopniem degradacji kalpastatyny, jest istotnie wyższa u pacjentów starszych niż 10 lat. Ważne jest przypomnienie, że w tej grupie wiekowej udowodniono również znacznie podwyższony poziom stężenia enzymu  $\mu$ -kalpainy (rycina 30B), a także zahamowaną zdolność do ulegania apoptozie. Zestawienie tych danych pozwala wysnuć wniosek, iż za zredukowaną do zera obecność formy natywnej inhibitora może odpowiadać nadmiernie aktywna kalpaina.

Ilość kalpastatyny – zarówno formy natywnej jak i produktów jej proteolizy, różni się w zależności od płci pacjenta – u chłopców jest jej znacząco mniej, co świadczy o wyższej endogennej aktywności kalpainy w blastach ALL u tych pacjentów (rycina 37). Żaden z pozostałych składników systemu kalpainowego nie wykazał tej zależności. Obserwacja zmian ilości kalpastatyny w zależności od płci badanego jest interesująca, gdyż płeć męska bywa uważana za negatywny czynnik rokowniczy w przebiegu ALL [29,171,172], chociaż część autorów, za najnowszymi badaniami ostatnich lat, zespołu Pui i wsp. [2,158] nie uwzględnia tego parametru, jako kluczowego, w diagnostyce.

Należy tutaj przedyskutować pojawiającą się pozornie sprzeczność wyników, mianowicie wykazany wcześniej wyższy odsetek blastów kalpastatyna<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> wśród starszych pacjentów za pomocą analizy cytometrycznej i zerową ilość formy natywnej kalpastatyny w tej samej wiekowo grupie wykazanej techniką Western blot. Powyższa sprzeczność może wiązać się z kwestią zastosowanych metod detekcji. Warto zauważyć, iż cytometria przepływowa jest metodą wyjątkowo czułą, umożliwiającą pomiar nawet bardzo małych białek, stąd prawdopodobnie zmierzono i odnotowano w analizie nawet fragmenty inhibitora kalpastatyny (zdegradowane przez kalpainę), nawet jeśli w komórkach nie było już formy natywnej inhibitora. Technika Western blotting ułatwiła rozróżnienie poszczególnych fragmentów peptydowych kalpastatyny od jej formy natywnej. Każda z zastosowanych tutaj metod ma swoje zalety i wnosi nowy element poznawczy w badaniach, celowym zabiegiem wydało się więc ich zestawienie w niniejszej pracy.

Badanie stopnia degradacji substratu (kalpastatyny) przez kalpainę, poza opisaną grupą blastów ALL związanych z patologią linii limfocytów B, wykonano też w trzech lizatach komórkowych pochodzących ze szpiku pacjentów z białaczką ALL, ale wywodzącą się z linii limfocytów T. Wszystkie trzy próbki ukazały wysoką aktywność kalpainy; grupa jest jednak zbyt mała by mówić tu o znaczącej tendencji

statystycznej. Ta obserwacja potwierdza hipotezę, że nadaktywność kalpain, wydaje się być związana tylko z patomechanizmem białaczek wywodzących się z linii limfocytarnej.

Próba korelacji wielkości ekspresji genu z poziomem natywnego białka kalpastatyny w blastach ALL, wykazała, iż w większości przypadków dane te nie są wprost zależne (rycina 38). Głównie, ekspresja genu jest wysoka, zaś odpowiadający jej poziom natywnego białka, jest wyraźnie obniżony. Wydaje się, że za zjawisko może odpowiadać nadmierna aktywność  $\mu$ -kalpainsy w blastach, która jak wykazano powyżej, degradowała domeny swego inhibitora, zmniejszając jego dostępną ilość i prowadząc do powstania małych fragmentów peptydowych. Zgodnie z danymi literaturowymi [162,163,166], nie zawsze relacja gen – białko jest ściśle zależna, należy uwzględnić zmiany po etapie transkrypcji, które zasadniczo wpływają na rzeczywisty poziom białka w komórce.

### **III. Wpływ $\mu$ -kalpainsy na programowaną śmierć komórkową (apoptozę) blastów ALL oraz próba modyfikacji apoptozy poprzez modulację aktywności $\mu$ -kalpainsy**

Celem potwierdzenia lub wykluczenia postulowanego wpływu kalpainsy na proces apoptozy blastów ALL, sprawdzano najpierw spontanicznie zachodzącą śmierć komórkową w blastach, a dopiero potem dane te korelowano z aktywnością enzymu. Apoptozę w limfoblastach wyizolowanych bezpośrednio ze szpiku oceniano zarówno jako odsetek komórek CD19<sup>+</sup> wiążących na swej powierzchni wyznakowaną fluorochromem PE Aneksynę V, jak i jako intensywność MFI tego znacznika. Zastosowano również drugą metodę pomiaru apoptozy, z użyciem sondy kationowej JC1, by przez wykorzystanie innej techniki, uzyskać większą rzetelność wyników i umożliwić ocenę udziału nadmiernej aktywności kalpainsy w określonych etapach procesu apoptozy. Stwierdzono obniżoną zdolność do apoptozy spontanicznej w badanym materiale od chorych ALL w porównaniu do grupy kontrolnej (rycina 27). Powyższy trend do utrzymanej na bardzo niskim poziomie samobójczej śmierci komórkowej w blastach ALL jest postulowany w literaturze i związany z akumulacją nowotworowych komórek [5,12,13,69].

Dodatkowo warto tu wspomnieć o obserwacji własnej dotyczącej analizy cyklu komórkowego w blastach ALL z użyciem jodku propidyny, gdzie zauważono wyjątkowo niskie procenty limfoblastów w fazach S i G2 cyklu komórkowego; również u pacjentów z wysokim parametrem leukocytozy wstępnej. Wydaje się, że zatem, iż za progresję choroby badanych pacjentów ALL, raczej odpowiada prewencja śmierci komórkowej nowotworowych blastów niż bardzo intensywna proliferacja. Wpływ aktywności kalpainy obniżający zdolność do samobójczej śmierci komórkowej blastów ALL, ukazano jako silną korelację ujemną – gdy rośnie zawartość  $\mu$ -kalpainy, znacząco spada apoptoza komórki nowotworowej (rycina 28). Obserwacja ta jest zgodna z postulowanym wpływem enzymów z grupy kalpain na proces apoptozy. Warto jednak przedyskutować tę kwestię dokładniej, gdyż dane literaturowe mówią zarówno o pozytywnym, jak i negatywnym wkładzie systemu kalpainowego w zjawisko programowanej eliminacji komórki. Zespół Tan i wsp. [87] udowadnia, iż aktywność  $\mu$ - i m-kalpainy może być skierowana zarówno stymulująco, jak i hamująco na proces apoptozy w mysich fibroblastach, fakt ten zależy od zastosowanego typu stymulacji; podobne zależności odnotowano w chemicznych liniach komórkowych [93]. Inny zespół, Cheng i wsp. [118] również stwierdza niejasną (pro- lub anty-apoptotyczną) rolę kalpain, przychylając się raczej do ich roli pro-apoptotycznej, poprzez aktywację głównej kaspazy wykonawczej - kaspazy 3. Z kolei działalność anty- apoptotyczną udokumentował Chua i wsp. [96] poprzez odnotowanie bezpośredniego destrukcyjnego oddziaływania proteolitycznego kalpain na kaspazy 7, 8, 9 i zahamowanie w ten sposób aktywacji kaspazy 3 oraz finalnie, wstrzymanie śmierci komórki. Również znaczący wpływ na prewencję apoptozy wykazano w komórkach przewlekłej białaczki B-limfocytarnej, równocześnie z postulowanym wpływem nadaktywnej  $\mu$ -kalpainy na obniżoną ilość kaspazy 3 [73]. Powyższe, często sprzeczne, doniesienia sugerują, iż rola kalpain w procesie apoptozy nie jest ciągle dostatecznie wyjaśniona i wymaga dalszych analiz w różnych modelach badawczych.

W niniejszej pracy wykazano znaczące różnice w zdolności do samobójczej śmierci komórkowej między blastami ALL pochodzącymi z młodszej grupy pacjentów, a tymi ze starszej grupy; chore dzieci z ALL powyżej 10 roku życia cechują się bardzo niskimi parametrami spontanicznej apoptozy blastów (rycina 29, 30A). Powyższe grupy wiekowe różnią się również ilością i aktywnością  $\mu$ -kalpainy

w blastach (rycina 30B). W blastach starszych pacjentów odsetek komórek zawierających  $\mu$ -kalpainę jest znacząco wyższy, zatem możliwe, że większa ilość (stężenie) i aktywność enzymu w blastach silniej blokuje ich apoptozę. Również zdolność do ulegania apoptozie różni się w zależności od fenotypu immunologicznego, gdyż typ pro-B wiąże się z silnie zahamowaną apoptozą, w stosunku do pacjentów z grupy common (rycina 31). W zestawieniu występują jednak znaczne dysproporcje liczebne między obiema grupami fenotypów, stąd mimo osiągnięcia istotnej statystycznie różnicy między grupami, wynik ten nie jest absolutnie pewny. W zestawieniu zabrakło podtypu dojrzałej białaczki B-komórkowej, który niesie gorsze rokowanie kliniczne niż powyższe dwa typy [9]. Zatem ciekawą kwestią byłoby porównanie stopnia apoptozy w tym podtypie ALL, z analogiczną apoptozą w białaczkach B-prekursorowych (określanych jako rokowniczo korzystniejsze [16]). Było to jednak niemożliwe ze względu na brak materiału biologicznego od pacjentów z tym typem białaczek podczas realizacji niniejszych badań.

Po stwierdzeniu występowania obniżonej apoptozy oraz podwyższonej aktywności  $\mu$ -kalpaina w tych samych komórkach nowotworowych, postanowiono przeprowadzić próbę zahamowania nadmiernie aktywnej kalpaina, celem sprawdzenia czy taka modulacja wpłynie na wystąpienie zjawiska apoptozy blastów ALL. W tym celu posłużono się oceną stopnia depolaryzacji błony mitochondrialnej przy zastosowaniu sondy JC1 (opisane dokładnie w części Materiały i Metody oraz Wyniki). Ocenie apoptozy poddawano blasty ALL inkubowane przez dobę w pełnym środowisku hodowlanym z dodatkiem inhibitora IV kalpaina, w zakresie stężeń od  $1\mu\text{M}$  do  $8\mu\text{M}$ . Wyniki tych doświadczeń wskazują na znaczny wzrost odsetka komórek zawierających monomeryczną formę sondy JC1, świadczącą o wzroście stopnia apoptozy w komórkach inkubowanych z dodatkiem inhibitora IV (rycina 32 33). Zatem większość blastów pod wpływem dodatku inhibitora IV kalpaina wchodzi w fazę samobójczej śmierci komórkowej. Intensywność zjawiska, zależna jest również od wysokości stężenia inhibitora oraz czasu jego działania (rycina 33, 34). Prawdopodobnie mechanizm doświadczenia, wiąże się z faktem, że nadaktywna  $\mu$ -kalpaina, wpływa na prewencję apoptozy w komórkach wyjściowych, zaś poprzez wyblokowanie enzymu dodanym inhibitorem, proces programowanej śmierci

komórkowej może się rozpocząć. Świadczyć może o tym wysoka specyficzność zastosowanego syntetycznego inhibitora IV, zdolnego do przenikania przez błony komórkowe i hamowania kalpainy wewnątrz komórki; zestawienie danych z wariantem kontrolnym, bez inhibitora IV, wskazuje, iż to inhibicja kalpainy wymusiła śmierć blastów.

Otrzymane wyniki są zgodne z postulowanymi w literaturze naukowej. Zarówno Guan i wsp. [129] jak i Zhu i wsp. [126] otrzymali wyniki, w których zatrzymanie aktywności kalpain, przez zastosowanie syntetycznego inhibitora, wywołuje zjawisko apoptozy w liniach komórkowych (nowotworowych, w tym także białaczkowych). Również wyniki zespołu Witkowski et al. [73] ukazują zjawisko wstąpienia komórek przewlekłej białaczki, na drogę śmierci komórkowej pod wpływem inhibicji kalpain. Jedynie McKernan et al. [167] stosując inhibitory kalpain w hodowlach komórkowych, wykazał efekt ochronny komórek przed apoptozą. Badanie to było jednak przeprowadzone z użyciem szczurzych linii komórek siatkówki, co może świadczyć o pewnych różnicach i unikatowych relacjach kalpainy z innymi białkami oraz zjawiskiem apoptozy w komórkach nowotworowych.

W świetle powyższych danych literaturowych, wraz z badaniami własnymi, wydaje się, iż kalpaina i możliwości jej modulacji, mogą być potencjalnym celem badawczym w chorobach nowotworowych, co wymaga dalszego intensywnego badania. Nowe markery, w połączeniu z tradycyjnymi czynnikami rokowniczymi, mogą pomóc w odniesieniu w przyszłości kolejnych sukcesów terapeutycznych, porównywanych do tych które zaszły przez ostatnie pięć dekad leczenia białaczek ALL.

#### **IV. Ekspresja genu i poziom białka sorcyny oraz zależności między sorcyną a systemem kalpainowym**

Jako ostatnie, zgodnie z założoną chronologią badawczą, postanowiono przeanalizować wyniki mówiące o wielkości ekspresji genu oraz poziomu wykrywanego białka sorcyny. Analiza ilości zamplifikowanego produktu genu *SRI* wykazała, iż gen ten ulega ekspresji tylko w lizatach pochodzących z blastów ALL; w grupie porównawczych komórek, za jednym wyjątkiem, nie wykazano wcale

ekspresji genu *SRI* (rycina 39A). Można więc powiedzieć tu o istotnej statystycznie nadekspresji genu sorcyny w nowotworowych limfoblastach. Otrzymany wynik, jest zgodny z danymi zespołu Tan i wsp. [139], który analizując wielkość ekspresji genu *SRI* uzyskał silną nadekspresję w badanych komórkach AML i liniach komórkowych, zaś w kontroli wystąpił jej całkowity brak. Fakt ten może świadczyć, że gen *SRI* ma szczególne znaczenie w patomechanizmie ALL lub ulega nadekspresji razem z genem *MDRI*, kodującym P-glikoproteinę (związaną z lekoopornością komórek). Ta wzajemna amplifikacja, szczególnie w komórkach nowotworowych wielolekoopornych, jest postulowana w dostępnej literaturze naukowej [136-139].

W badaniach własnych nie znaleziono związku wielkości ekspresji genu *SRI* z dostępnymi danymi klinicznymi. Jednak w komórkach AML nadekspresja sorcyny wiąże się z negatywnym rokowaniem klinicznym [139], stąd więc przyszłym celem badawczym może być szukanie podobnej zależności również w blastach ALL w zdecydowanej powiększonej grupie chorych i o różnych parametrach klinicznych.

Porównanie poziomu białka sorcyny w blastach ALL i komórkach grupy porównawczej nie ukazało istotnej różnicy w ich ilości, jedynie tendencję wskazującą na obniżoną ilość w blastach (rycina 40A). Brak znaczących różnic może mieć związek z dość małą grupą komórek porównawczych w zestawieniu. Jednak tylko w lizatach ALL ilość białka koreluje ujemnie z wiekiem pacjentów, czyli w komórkach młodszych pacjentów ALL poziom sorcyny jest wyższy (rycina 40B). Czynnikiem wieku był już kilkakrotnie podkreślany w niniejszej pracy; warto tutaj przypomnieć, że w limfoblastach młodszej wiekowo grupy ALL wykryto znacznie niższy odsetek kalpainy niż w blastach dzieci starszych niż 10 lat (Rycina 30B). Zatem może mechanizm spadku ilości sorcyny wraz z wiekiem komórki nowotworowej, ma związek z pojawiającą się nadaktywnością  $\mu$ -kalpainy w tym samym materiale? Podobną zależność przedyskutowano wcześniej dla znikającej z wiekiem natywnej formy kalpastatyny. Wiedząc, że kalpaina może doprowadzić do degradacji swojego substratu – kalpastatyny [91,95,127], być może więc w sytuacji nadaktywności, enzym ten też domeny sorcyny, która jest niewielkim 22kDa białkiem, jej proteolityczna degradacja zatem nastąpiłaby stosunkowo szybko.

Próba znalezienia zależności między sorcyną, a białkami kalpainowymi ukazuje silne korelacje między wielkością ekspresji genu *SRI*, a poszczególnymi parametrami systemu kalpaina - kalpastatyna. Mianowicie, ujemny związek między

ekspresją genu *SRI*, a ilością białka kalpastatyny w blastach ALL (rycina 42, 44) oraz dodatni ze wzrostem aktywności  $\mu$ -kalpainy (wyliczonym jako współczynnik proporcji  $\mu$ -kalpaina do kalpastatyny w danych blastach ALL, rycina 43). Otrzymane wyniki wskazywałyby na silny synergizm w działaniu genu sorcyny i białka kalpainy, tymczasem zestawienie rzeczywistych relacji białko sorcyna i białko kalpaina, nie wykazuje już tej zależności. Raczej, wykazane w poprzednim akapicie, działanie odwrotne, czyli mechanizm redukcji sorcyny przez nadmiernie aktywną  $\mu$ -kalpainę. Brak literaturowych danych, które można by przedyskutować w świetle wzajemnych relacji między sorcyną, a białkami kalpainowymi, jedyne dostępne dane opisują wzajemne podobieństwo w budowie strukturalnej [85,138] nie wspominając nic o wspólnych czy przeciwnych działaniach w komórce ostrej białaczki dziecięcej ALL. Sorcyna, jako białko regulatorowe, wiąże jony  $Ca^{2+}$  i moduluje funkcje kanałów wapniowych, wpływa więc na różne procesy zależne od tego pierwiastka, także transdukcję sygnału wapniowego. Zespół Kawakami i wsp. odnotował jej hamujący wpływ na proces apoptozy, choćby przez oddziaływanie na kaspazę 3 [148] czy na składniki białkowe rodzin pro- i anty-apoptotycznych (badania grupy Qi i wsp. [144]). Wpływ na te same białka i zjawiska, udokumentowano również licznie dla kalpain [91,94,96,149,150]. Zatem wzajemne relacje między sorcyną, a kalpainą z pewnością mają miejsce, wydaje się jednak, że w nowotworowym błacie przebiegają one inaczej niż w zdrowej komórce. Prawdopodobnie, oba białka, w zdrowych komórkach, występują w naturalnej równowadze, utrzymując swoje funkcje pod kontrolą zależną od jonów wapnia. Z kolei w sytuacji patologicznej, w komórkach, które mogą wykazywać fenotyp lekooporności, sorcyna, która uległa nadekspresji, zwiąże znaczą część jonów  $Ca^{2+}$ , wpłynie na pulę dostępnych jonów wapnia w komórce, tym samym wpływając pośrednio na proces apoptozy i aktywację enzymów kalpainowych. Ilość wapnia w komórkach, stanowiąca przełącznik do występowania różnych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, jest kluczowa do zjawiska aktywacji kalpain; kwestia odpowiednio wysokiego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w komórce wystarczającego do uaktywnienia kalpain była wielokrotnie poruszana przez badaczy, nie dając jednak wystarczającej odpowiedzi [81,83,92]. Zatem, nadaktywna kalpaina być może zaczyna ciąć z czasem również sorcynę, mimo braku literaturowych dowodów, iż może ona być takim substratem. Skomplikowany mechanizm tego procesu pozostaje

nieznany i wymaga dalszych intensywnych badań, ku lepszemu poznaniu wzajemnego działania kluczowych białek komórki, zwłaszcza w sytuacji patologicznej komórki nowotworowej.

## 6. WNIOSKI

1. Blasty ALL charakteryzują się zaburzoną równowagą w poziomie białek systemu CCS (nadaktywna  $\mu$ - kalpaina w stosunku do kalpastatyny), co może być przyczyną zmniejszonej zdolności blastów do ulegania apoptozie.
2. Kalpastatyna ulega degradacji proteolitycznej w blastach ALL, co może osłabiać jej właściwości inhibicyjne wobec enzymu kalpainy i powiększać jego endogenną aktywność.
3. Zahamowanie aktywności proteolitycznej  $\mu$ -kalpainy może wpływać na zahamowanie apoptozy w nowotworowych limfoblastach ALL *in vitro*; aktywność ta może stać się więc potencjalnym markerem prognostycznym patomechanizmu choroby ALL i celem terapeutycznym w tej chorobie.
4. Brak prostej zależności między wielkością ekspresji genów białek systemu kalpainowego i sorcyny może wynikać z występowania silnych modyfikacji potranslacyjnych, bądź oddziaływań o charakterze enzymatycznym w obrębie blastów ALL.
5. Istnieją zależności w ilości i wzajemnym funkcjonowaniu białka kalpainy oraz sorcyny w nowotworowych komórkach ALL, które wymagają dalszych badań.

## LITERATURA

1. Kowalczyk JR., Epidemiologia i etiopatogeneza białaczek. w: Białaczki u dzieci pod red. Radwańska U., Wydawnictwo VOLUMED Sp. z o.o., Wrocław 1998:17-22
2. Pui CH., Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc.* 2010 Nov;109(11):777-87
3. Kowalczyk JR., Epidemiologia nowotworów dziecięcych. w: Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej pod red. Kowalczyk JR., Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, wydanie I, Warszawa 2011:5-11
4. Kowalczyk JR., Ostra białaczka limfoblastyczna. w: Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Zalecenia 2009. Nowotwory wieku dziecięcego. Wydawnictwo Via Medica, 2009:626-36
5. Volm M, Zintl F, Sauerbrey A, Koomägi R., Proliferation and apoptosis in newly diagnosed and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia., *Anticancer Res.*1999 Sep-Oct;19(5B):4327-31
6. Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H., Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):790-4
7. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR., Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling., *Cancer Cell.* 2002 Mar;1(2):133-43
8. Pui CH, Jeha S., New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia., *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Feb;6(2):149-65

9. Pui CH, Robison LL, Look AT., Acute lymphoblastic leukaemia., *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43
10. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG., Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care., *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jun;56(6):984-93
11. Hirt A, Antic V, Wang E, Lüthy AR, Leibundgut K, von der Weid N, Tobler A, Wagner HP., Acute lymphoblastic leukaemia in childhood: cell proliferation without rest., *Br J Haematol*. 1997 Feb;96(2):366-8
12. Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M., Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia., *Leuk Res*. 2004 May;28(5):487-94
13. Fulda S., Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia., *Br J Haematol*. 2009 May;145(4):441-54
14. Kersey JH., Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia., *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4243-51
15. Sherborne AL, Hemminki K, Kumar R, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Petridou E, Semsei AF, Szalai C, Sinnott D, Krajcinovic M, Healy J, Lanciotti M, Dufour C, Indaco S, El-Ghouroury EA, Sawangpanich R, Hongeng S, Pakakasama S, Gonzalez-Neira A, Ugarte EL, Leal VP, Espinoza JP, Kamel AM, Ebid GT, Radwan ER, Yalin S, Yalin E, Berkoz M, Simpson J, Roman E, Lightfoot T, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Greaves M, Houlston RS., Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia., *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1049-54
16. Radwańska U., Diagnostyka, klasyfikacja i różnicowanie ostrych białaczek u dzieci., w: *Białaczki u dzieci* pod red. Radwańska U., Wydawnictwo VOLUMED Sp. z o.o., Wrocław 1998:41-52

17. Balana-Nowak A, Zdziłowska E., Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrych białaczek., *Postępy Biologii Komórki*. 2008;35, Suppl 24:65-102
18. Szczepański T, van der Velden VH, van Dongen JJ., Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes., *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(7):775-96
19. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A., New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias., *Haematologica*. 2001 Jul;86(7):675-92
20. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT., Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (BCSH), British Society of Haematology., *Clin Lab Haematol*. 2002 Feb;24(1):1-13
21. Perek D., Diagnostyka kliniczna chorób nowotworowych u dzieci. w: *Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej pod red. Kowalczyk JR., Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, wydanie I, Warszawa 2011:51-64*
22. Radwańska U., Ostra białaczka limfoblastyczna, w: *Białaczki u dzieci pod red. Radwańska U., Wydawnictwo VOLUMED Sp. z o.o., Wrocław 1998:57-89*
23. Pulsipher MA, Peters C, Pui CH., High-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia: to transplant or not to transplant?, *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Jan;17, Suppl 1:137-48
24. Wachowiak J., w: *Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej pod red. Kowalczyk JR., Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, wydanie I, Warszawa 2011:121-138*

25. Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJ, Szczepański T., Acute lymphoblastic leukemia., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:162-92
26. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H., Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group., *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):1952-8
27. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D., Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):52-8
28. Kowalczyk JR, Dudkiewicz E, Balwierz W, Bogusławska-Jaworska J, Rokicka-Milewska R., Incidence of childhood cancers in Poland in 1995-1999., *Med Sci Monit*. 2002 Aug;8(8): 587-90
29. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC., Pediatric acute lymphoblastic leukemia., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:102-31
30. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM., Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG)., *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):926-35
31. Pui CH., Impact of molecular profiling and cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia., *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:176-7
32. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE., Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia., *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1112-5

33. Pui CH, Crist WM, Look AT., Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood*. 1990 Oct 15;76(8):1449-63
34. Evans WE, Relling MV., Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics., *Nature*. 2004 May 27;429(6990):464-8
35. Chang JS, Selvin S, Metayer C, Crouse V, Golembesky A, Buffler PA., Parental smoking and the risk of childhood leukemia., *Am J Epidemiol*. 2006 Jun 15;163(12):1091-100
36. Castro-Jiménez MÁ, Orozco-Vargas LC., Parental exposure to carcinogens and risk for childhood acute lymphoblastic leukemia, Colombia, 2000-2005., *Prev Chronic Dis*. 2011 Sep;8(5):1-14
37. Greaves MF., Aetiology of acute leukaemia., *Lancet*. 1997 Feb 1;349(9048):344-9
38. Infante-Rivard C, Fortier I, Olson E., Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia., *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(11):1559-64
39. Wen W, Shu XO, Potter JD, Severson RK, Buckley JD, Reaman GH, Robison LL., Parental medication use and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia., *Cancer*. 2002 Oct 15;95(8):1786-94
40. Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S; Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia., Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Dec;15(12):2336-41
41. Kwan ML, Metayer C, Crouse V, Buffler PA., Maternal illness and drug/medication use during the period surrounding pregnancy and risk of childhood leukemia among offspring., *Am J Epidemiol*. 2007 Jan 1;165(1):27-35
42. MacArthur AC, McBride ML, Spinelli JJ, Tamaro S, Gallagher RP, Theriault GP., Risk of childhood leukemia associated with vaccination, infection, and medication use in childhood: the Cross-Canada Childhood Leukemia Study., *Am J Epidemiol*. 2008 Mar 1;167(5):598-606

43. Sherborne AL, Hemminki K, Kumar R, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Petridou E, Semsei AF, Szalai C, Sinnott D, Krajcinovic M, Healy J, Lanciotti M, Dufour C, Indaco S, El-Ghouroury EA, Sawangpanich R, Hongeng S, Pakakasama S, Gonzalez-Neira A, Ugarte EL, Leal VP, Espinoza JP, Kamel AM, Ebid GT, Radwan ER, Yalin S, Yalin E, Berkoz M, Simpson J, Roman E, Lightfoot T, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Greaves M, Houlston RS., Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia., *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1049-54
44. Greaves MF, Alexander FE., An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood?, *Leukemia*. 1993 Mar;7(3):349-60
45. Perrillat F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Hémon D., Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study., *Br J Cancer*. 2002 Apr 8;86(7):1064-9
46. Shu XO, Linet MS, Steinbuch M, Wen WQ, Buckley JD, Neglia JP, Potter JD, Reaman GH, Robison LL., Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia., *J Natl Cancer Inst*. 1999 Oct 20;91(20):1765-72
47. Roman E, Ansell P, Bull D., Leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in children and young adults: are prenatal and neonatal factors important determinants of disease?, *Br J Cancer*. 1997;76(3):406-15
48. McKinney PA, Juszczak E, Findlay E, Smith K, Thomson CS., Pre- and perinatal risk factors for childhood leukaemia and other malignancies: a Scottish case control study., *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(11):1844-51
49. Dockerty JD, Skegg DC, Elwood JM, Herbison GP, Becroft DM, Lewis ME., Infections, vaccinations, and the risk of childhood leukaemia., *Br J Cancer*. 1999 Jul;80(9):1483-9
50. Naumburg E, Bellocco R, Cnattingius S, Jonzon A, Ekblom A., Perinatal exposure to infection and risk of childhood leukemia., *Med Pediatr Oncol*. 2002 Jun;38(6):391-7

51. Lin CW, Manshoury T, Jilani I, Neuberger D, Patel K, Kantarjian H, Andreeff M, Estrov Z, Beran M, Keating M, Estey E, Albitar M., Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome., *Leuk Res.* 2002 Jun;26(6):551-9
52. Choi J, Hwang YK, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Jung HL, Koo HH, Kim HJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS., Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):471-7
53. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57
54. Wyllie AH., Death in normal and neoplastic cells., *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1974;7:35-42
55. Kaufmann SH, Hengartner MO., Programmed cell death: alive and well in the new millennium., *Trends Cell Biol.* 2001 Dec;11(12):526-34
56. Chao MP, Majeti R, Weissman IL., Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer., *Nat Rev Cancer.* 2011 Dec 8;12(1):58-67
57. Kornblau SM., The role of apoptosis in the pathogenesis, prognosis, and therapy of hematologic malignancies., *Leukemia.* 1998 Sep;12 Suppl 1:41-6
58. Nicholson DW., Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death., *Cell Death Differ.* 1999 Nov;6(11):1028-42
59. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G., Mitochondria, the killer organelles and their weapons., *J Cell Physiol.* 2002 Aug;192(2):131-7
60. Tawa P, Hell K, Giroux A, Grimm E, Han Y, Nicholson DW, Xanthoudakis S., Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors., *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):439-47

61. Ruiz-Vela A, González de Buitrago G, Martínez-A C., Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion., *EMBO J.* 1999 Sep 15;18(18):4988-98
62. Green DR., Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors., *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):1-4
63. Gupta S, Su H, Bi R, Agrawal S, Gollapudi S., Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence., *Immun Ageing.* 2005 Aug 23;2:12
64. Kroemer G, Reed JC., Mitochondrial control of cell death., *Nat Med.* 2000 May;6(5):513-9
65. Kornblau SM, Thall PF, Estrov Z, Walterscheid M, Patel S, Theriault A, Keating MJ, Kantarjian H, Estey E, Andreeff M., The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics., *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1758-66
66. Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G., Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis., *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):571-80
67. Joza N, Susin SA, Dugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM., Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death., *Nature.* 2001 Mar 29;410(6828):549-54
68. Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G., Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?, *J Cell Sci.* 2002 Dec 15;115(Pt 24):4727-34
69. Schuler D, Szende B., Apoptosis in acute leukemia., *Leuk Res.* 2004 Jul;28(7):661-6

70. Podhorecka M., Apoptosis in pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Proces apoptozy w patogenezie przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej, Postepy Hig Med. Dosw [Online]. 2004 May 24;58:236-42
71. Dighiero G., CLL biology and prognosis., Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:278-84
72. Ghiotto F, Fais F, Tenca C, Tomati V, Morabito F, Casciaro S, Mumot A, Zoppoli G, Ciccone E, Parodi S, Bruno S., Apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells induced by a novel BH3 peptidomimetic., Cancer Biol Ther. 2009 Feb;8(3):263-71
73. Witkowski JM, Zmuda-Trzebiatowska E, Swiercz JM, Cichorek M, Ciepluch H, Lewandowski K, Bryl E, Hellmann A., Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells., Blood. 2002 Sep 1;100(5):1802-9
74. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A, Buschle M, Raimondi SC, Behm FG, Ashmun R, Aricò M, Biondi A, Pui CH., Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein., Blood. 1993 Feb 15;81(4):1025-31
75. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, McNinch L, Evans WE, Raimondi SC, Behm FG, Aricò M, Campana D., Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia., Blood. 1996 Feb 1;87(3):1140-6
76. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K., Structure and physiological function of calpains., Biochem J. 1997 Dec 15;328 ( Pt 3):721-32
77. Sorimachi H, Hata S, Ono Y., Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization., Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2011;87(6):287-327
78. Lid SE, Gruis D, Jung R, Lorentzen JA, Ananiev E, Chamberlin M, Niu X, Meeley R, Nichols S, Olsen OA., The defective kernel 1 (dek1) gene required for aleurone

- cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16;99(8):5460-5
79. Branca D., Calpain-related diseases., *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 1;322(4):1098-104
80. Guroff G., A Neutral, Calcium-activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain., *J Biol Chem.* 1964 Jan;239:149-55
81. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J., The calpain system., *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801
82. Sakihama T, Kakidani H, Zenita K, Yumoto N, Kikuchi T, Sasaki T, Kannagi R, Nakanishi S, Ohmori M, Takio K, Titani K, Murachi T., A putative Ca<sup>2+</sup>-binding protein: structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Sep;82(18):6075-9
83. Reverter D, Sorimachi H, Bode W. The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function., *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Aug;11(6):222-9
84. Franco SJ, Huttenlocher A., Regulating cell migration: calpains make the cut., *J Cell Sci.* 2005 Sep 1;118(Pt 17):3829-38
85. Xie X, Dwyer MD, Swenson L, Parker MH, Botfield MC., Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EF-hand protein family., *Protein Sci.* 2001 Dec;10(12):2419-25
86. Smith TP, Simmen FA, Zhao G, Vallet JL., Rapid communication: Nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA., *J Anim Sci.* 2001 Feb;79(2):552-3
87. Tan Y, Wu C, De Veyra T, Greer PA., Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli., *J Biol Chem.* 2006 Jun 30;281(26):17689-98

88. Reverter D, Sorimachi H, Bode W., The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function., *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Aug;11(6):222-9
89. Tompa P, Mucsi Z, Orosz G, Friedrich P., Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain., *J Biol Chem.* 2002 Mar 15;277(11):9022-6
90. Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, Hudecz F, Friedrich P., On the sequential determinants of calpain cleavage., *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):20775-85
91. Wang KK., Calpain and caspase: can you tell the difference?, *Trends Neurosci.* 2000 Feb;23(2):20-6
92. Sazontova TG, Matskevich AA, Arkhipenko YV., Calpains: physiological and pathophysiological significance., *Pathophysiology.*, 1999, 6: 91-102
93. Lu T, Xu Y, Mericle MT, Mellgren RL., Participation of the conventional calpains in apoptosis., *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jun 12;1590(1-3):16-26
94. Łopatniuk P, Witkowski JM., Conventional calpains and programmed cell death., *Acta Biochim Pol.* 2011;58(3):287-96
95. Pörn-Ares MI, Samali A, Orrenius S., Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis., *Cell Death Differ.* 1998 Dec;5(12):1028-33
96. Chua BT, Guo K, Li P., Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases., *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):5131-5
97. Schwarz-Benmeir N, Glaser T, Barnoy S, Kosower NS., Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals., *Biochem J.* 1994 Dec 1;304 ( Pt 2):365-70
98. Wendt A, Thompson VF, Goll DE., Interaction of calpastatin with calpain: a review., *Biol Chem.* 2004 Jun;385(6):465-72

99. Pfizer J, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W, Schaschke N., Inhibition of human mu-calpain by conformationally constrained calpastatin peptides., *Biol Chem.* 2008 Jan;389(1):83-90
100. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL., Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin., *Nature.* 2008 Nov 20;456(7220):409-12
101. Fernández-Montalván A, Assfalg-Machleidt I, Pfeiler D, Fritz H, Jochum M, Machleidt W., Electrostatic interactions of domain III stabilize the inactive conformation of mu-calpain., *Biochem J.* 2004 Sep 1;382(Pt 2):607-17
102. Perrin BJ, Huttenlocher A., Calpain., *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jul;34(7):722-5
103. Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprrell HP., The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain)., *J Biol Chem.* 1989 Jun 15;264(17):10096-103
104. Dainese E, Minafra R, Sabatucci A, Vachette P, Melloni E, Cozzani I., Conformational changes of calpain from human erythrocytes in the presence of Ca<sup>2+</sup>., *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):40296-301
105. Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL., Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion., *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Sep;279(3):509-17
106. Veeranna, Kaji T, Boland B, Odriljin T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, Li BS, Pant HC, Hungund BL, Arancio O, Nixon RA., Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease., *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3):795-805
107. Davis TL, Walker JR, Finerty PJ Jr, Mackenzie F, Newman EM, Dhe-Paganon S., The crystal structures of human calpains 1 and 9 imply diverse mechanisms of action and auto-inhibition., *J Mol Biol.* 2007 Feb 9;366(1):216-29

108. Gafni J, Ellerby LM., Calpain activation in Huntington's disease., *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22(12):4842-9
109. Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC., Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death?, *Neuroscience.* 1996 Aug;73(4):979-87
110. Huang Y, Wang KK., The calpain family and human disease., *Trends Mol Med.* 2001 Aug;7(8):355-62
111. David LL, Shearer TR, Shih M., Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation., *J Biol Chem.* 1993 Jan 25;268(3):1937-40
112. Leloup L, Wells A., Calpains as potential anti-cancer targets., *Expert Opin Ther Targets.* 2011 Mar;15(3):309-23
113. Mamoune A, Luo JH, Lauffenburger DA, Wells A., Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion., *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4632-40
114. Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML., The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells., *J Biol Chem.* 2003 Jan 10;278(2):1372-9
115. Xu L, Deng X., Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion., *J Biol Chem.* 2004 Dec 17;279(51):53683-90
116. Braun C, Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seitz G, Zang KD, Welter C., Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type., *Int J Cancer.* 1999 Feb 19;84(1):6-9

117. Roumes H, Leloup L, Dargelos E, Brustis JJ, Daury L, Cottin P., Calpains: markers of tumor aggressiveness?, *Exp Cell Res.* 2010 May 15;316(9):1587-99
118. Cheng G, Shan J, Xu G, Huang J, Ma J, Ying S, Zhu L., Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca<sup>2+</sup>-calpain and caspase-3 dependent pathway., *Pharmacol Res.* 2003 Dec;48(6):571-8
119. Del Bello B, Moretti D, Gamberucci A, Maellaro E., Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status., *Oncogene.* 2007 Apr 26;26(19):2717-26
120. Liu L, Xing D, Chen WR, Chen T, Pei Y, Gao X., Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis., *Int J Cancer.* 2008 May 15;122(10):2210-22
121. Liu L, Xing D, Chen WR., Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis., *Int J Cancer.* 2009 Dec 15;125(12):2757-66
122. Das A, Banik NL, Ray SK., Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids., *Int J Cancer.* 2006 Dec 1;119(11):2575-85
123. Ray SK, Wilford GG, Crosby CV, Hogan EL, Banik NL., Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells., *Brain Res.* 1999 May 22;829(1-2):18-27
124. Ray SK, Patel SJ, Welsh CT, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL., Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3., *J Neurosci Res.* 2002 Jul 15;69(2):197-206

125. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC, Sharma RK., Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Oct;13(10):1604-9
126. Zhu DM, Uckun FM., Calpain inhibitor II induces caspase-dependent apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma cells as well as some solid tumor cells., *Clin Cancer Res.* 2000 Jun;6(6):2456-63
127. Mikosik A, Zaremba A, Puchalska Z, Daca A, Smolenska Z, Lopatniuk P, Mital A, Hellman A, Bryl E, Witkowski JM., Ex vivo measurement of calpain activation in human peripheral blood lymphocytes by detection of immunoreactive products of calpastatin degradation., *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(4):343-7
128. Zhu W, Murtha PE, Young CY., Calpain inhibitor-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells., *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):1130-7
129. Guan N, Korukonda R, Hurh E, Schmittgen TD, Donkor IO, Dalton JT., Apoptosis induced by novel aldehyde calpain inhibitors in human tumor cell lines., *Int J Oncol.* 2006 Sep;29(3):655-63
130. Maki M, Narayana SV, Hitomi K., A growing family of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins with five EF-hand motifs., *Biochem J.* 1997 Dec 1;328 ( Pt 2):718-20
131. Nastopoulos V, Ilari A, Colotti G, Zamparelli C, Verzili D, Chiancone E, Tsernoglou D., Two different crystal forms of sorcin, a penta-EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2001 Jun;57(Pt 6):862-4
132. Mella M, Colotti G, Zamparelli C, Verzili D, Ilari A, Chiancone E., Information transfer in the penta-EF-hand protein sorcin does not operate via the canonical structural/functional pairing. A study with site-specific mutants., *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):24921-8
133. Zamparelli C, Macquaide N, Colotti G, Verzili D, Seidler T, Smith GL, Chiancone E., Activation of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>(2+)</sup> exchanger by sorcin via the interaction of the respective Ca<sup>(2+)</sup>-binding domains., *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jul;49(1):132-41

134. Meyers MB, Spengler BA, Chang TD, Melera PW, Biedler JL., Gene amplification-associated cytogenetic aberrations and protein changes in vincristine-resistant Chinese hamster, mouse, and human cells., *J Cell Biol.* 1985 Feb;100(2):588-97
135. Hamada H, Okochi E, Oh-hara T, Tsuruo T., Purification of the Mr 22,000 calcium-binding protein (sorcini) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies., *Cancer Res.* 1988 Jun 1;48(11):3173-8
136. Van der Blik AM, Meyers MB, Biedler JL, Hes E, Borst P., A 22-kd protein (sorcini/V19) encoded by an amplified gene in multidrug-resistant cells, is homologous to the calcium-binding light chain of calpain., *EMBO J.* 1986 Dec 1;5(12):3201-8
137. Van der Blik AM, Baas F, Van der Velde-Koerts T, Biedler JL, Meyers MB, Ozols RF, Hamilton TC, Joenje H, Borst P., Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines., *Cancer Res.* 1988 Nov 1;48(21):5927-32
138. Witkowski JM, Miller RA., Calcium signal abnormalities in murine T lymphocytes that express the multidrug transporter P-glycoprotein., *Mech Ageing Dev.* 1999 Mar 1;107(2):165-80
139. Tan Y, Li G, Zhao C, Wang J, Zhao H, Xue Y, Han M, Yang C., Expression of sorcini predicts poor outcome in acute myeloid leukemia., *Leuk Res.* 2003 Feb;27(2):125-31
140. Lokuta AJ, Meyers MB, Sander PR, Fishman GI, Valdivia HH., Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcini., *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25333-8
141. Hu ST, Liu GS, Shen YF, Wang YL, Tang Y, Yang YJ., Defective Ca(2+) handling proteins regulation during heart failure., *Physiol Res.* 2011;60(1):27-37
142. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borcken C, Prohaska R., Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcini., *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2569-77

143. Zhou Y, Xu Y, Tan Y, Qi J, Xiao Y, Yang C, Zhu Z, Xiong D., Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells., *Leuk Res.* 2006 Apr;30(4):469-76
144. Qi J, Liu N, Zhou Y, Tan Y, Cheng Y, Yang C, Zhu Z, Xiong D., Overexpression of sorcin in multidrug resistant human leukemia cells and its role in regulating cell apoptosis., *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 13;349(1):303-9
145. Ohno S, Emori Y, Suzuki K., Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease., *Nucleic Acids Res.* 1986 Jul 11;14(13):5559.
146. Wang SL, Tam MF, Ho YS, Pai SH, Kao MC., Isolation and molecular cloning of human sorcin a calcium-binding protein in vincristine-resistant HOB1 lymphoma cells., *Biochim Biophys Acta.* 1995 Feb 21;1260(3):285-93 (streszczenie)
147. Meyers MB, Schneider KA, Spengler BA, Chang TD, Biedler JL., Sorcin (V19), a soluble acidic calcium-binding protein overproduced in multidrug-resistant cells. Identification of the protein by anti-sorcin antibody., *Biochem Pharmacol.* 1987 Jul 15;36(14):2373-80 (streszczenie)
148. Kawakami M, Nakamura T, Okamura N, Komoto C, Markova S, Kobayashi H, Hashimoto N, Okumura K, Sakaeda T., Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells., *Biol Pharm Bull.* 2007 Jun;30(6):1065-73
149. Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW., Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis., *Oncogene.* 1998 Sep 3;17(9):1069-78
150. Gao G, Dou QP., N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death., *J Cell Biochem.* 2000 Sep 18;80(1):53-72
151. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early

apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V., *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51

152. Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z., Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry., *Cytometry*. 1999 Mar 1;35(3):181-95

153. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB., Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3671-5

154. Raser KJ, Posner A, Wang KK., Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents., *Arch Biochem Biophys*. 1995 May 10;319(1):211-6

155. Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54

156. Laemmli UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5

157. Rutledge TW, Whiteheart SW., SNAP-23 is a target for calpain cleavage in activated platelets., *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37009-15

158. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV., Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation., *N Engl J Med*. 2009 Jun 25;360(26):2730-41

159. Morris-Jones PH, Craft AW., Childhood cancer: cure at what cost?, *Arch Dis Child*. 1990 Jun;65(6):638-40

160. Radwańska U, Michalewska D, Kołdecki P, Armata J, Balwierz W, Bogusławska-Jaworska J, Chybicka A, Cyklis R, Kowalczyk J, Ochocka M, Pawelec K, Rokicka-Milewska R, Sońta-Jakimczyk D, Śladkowska G, Zelenay E., Wyniki leczenia najczęstszych postaci ostrej białaczki limfoblastycznej w świetle 6-letnich doświadczeń Polskiej Grupy Pediatrycznej ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków., *Pediatr Pol.* 1972; 69(9):703-10
161. Lin CW, Manshour T, Jilani I, Neuberger D, Patel K, Kantarjian H, Andreeff M, Estrov Z, Beran M, Keating M, Estey E, Albitar M., Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome., *Leuk Res.* 2002 Jun;26(6):551-9
162. Boyd RS, Jukes-Jones R, Walewska R, Brown D, Dyer MJ, Cain K., Protein profiling of plasma membranes defines aberrant signaling pathways in mantle cell lymphoma., *Mol Cell Proteomics.* 2009 Jul;8(7):1501-15
163. Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast., *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1720-30
164. Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE., Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells., *Mol Cell Proteomics.* 2004 Oct;3(10):960-9
165. Unwin RD, Pierce A, Watson RB, Sternberg DW, Whetton AD., Quantitative proteomic analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells., *Mol Cell Proteomics.* 2005 Jul;4(7):924-35
166. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardias SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG., Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas., *Mol Cell Proteomics.* 2002 Apr;1(4):304-13
167. McKernan DP, Guerin MB, O'Brien CJ, Cotter TG., A key role for calpains in retinal ganglion cell death., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Dec;48(12):5420-30

168. Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K., Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides., *J Biol Chem.* 1992 Dec 5;267(34):24585-90
169. Niapour M, Berger S., Flow cytometric measurement of calpain activity in living cells., *Cytometry A.* 2007 Jul;71(7):475-85
170. Rosser BG, Powers SP, Gores GJ., Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach., *J Biol Chem.* 1993 Nov 5;268(31):23593-600
171. Ng SM, Lin HP, Ariffin WA, Zainab AK, Lam SK, Chan LL., Age, sex, haemoglobin level, and white cell count at diagnosis are important prognostic factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with BFM-type protocol., *J Trop Pediatr.* 2000 Dec;46(6):338-43
172. Khalid S, Moiz B, Adil SN, Khurshid M., Retrospective review of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a single center experience., *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Oct-Dec;53(4):704-10

## STRESZCZENIE

Ostra białaczka limfoblastyczna ALL jest jednym z najczęściej występujących nowotworów wśród dzieci. Patomechanizm choroby związany jest z nadmierną proliferacją komórek linii limfoidalnej B (rzadziej T), jak również zmniejszoną podatnością na czynniki wywołujące programowaną śmierć komórek (apoptozę). Zastosowanie zaawansowanej polichemioterapii przyczyniło się w ciągu ostatnich dziesięcioleci do znacznego sukcesu terapeutycznego wśród chorych z ALL, mimo tego faktu ciągle pozostaje grupa pacjentów, u których leczenie nie odnosi skutku, bądź występuje wznowa. Wynika stąd potrzeba poszukiwań nowych markerów prognostycznych czy diagnostycznych i celów terapeutycznych ALL u dzieci. Jednym z takich potencjalnych celów badawczych jest system białkowy kalpaina – kalpastatyna (CCS). Rodzina kalpain ( $\mu$ - i m-kalpaina), to proteazy wapniowo-zależne, które poprzez swoje biomodulujące oddziaływanie proteolityczne na rozliczne substraty wpływają na procesy wewnątrzkomórkowe. Rola kalpain jest ogromnie istotna podczas zjawiska śmierci komórki, gdyż aktywując swe substraty enzym ten może działać zarówno pro- jak i anty-apoptotycznie. Nadmiernej aktywności kalpain zapobiega endogenny inhibitor - kalpastatyna, który występuje w ściśle regulowanej równowadze z kalpainami w zdrowych komórkach. Każde zachwianie tej równowagi może doprowadzić do nieprawidłowości, np. braku apoptozy. Z kolei białko sorcyna, którego funkcja regulacyjna wiąże się z modulacją kanałów wapniowych, wykazujące podobieństwo w budowie do lekkiego łańcucha kalpajny, może (zmieniając stężenie wapnia w cytoplazmie poprzez wiązanie jonów  $Ca^{2+}$ ) bezpośrednio lub pośrednio wpływać na aktywację kalpain.

Celem badawczym tej pracy było sprawdzenie potencjalnej roli systemu CCS i sorcyny w zahamowaniu apoptozy komórek ALL poprzez ocenę ilości i aktywności składników systemu oraz modulację aktywności kalpajny w blastach.

Ocenę ilości białek CCS wykonano w blastach ALL oraz porównawczo w blastach AML i komórkach  $CD19^+$  od pacjentów bez schorzeń onkologicznych, z użyciem cytometrii przepływowej. Wykazano silnie podwyższony odsetek komórek  $\mu$ -kalpaina<sup>+</sup> $CD19^+$ , jak również stężenie  $\mu$ -kalpajny (MFI) w blastach ALL, wobec grupy porównawczej. Poziom m-kalpajny był niski i nie odbiegał znacząco od grupy porównawczej. Ilość i stężenie kalpastatyny były podwyższone i dość heterogenne w

blastach ALL (wyższe wartości dla pacjentów starszych i fenotypu pro-B). Wszystkie powyższe różnice między wynikami były istotne statystycznie.

Na poziomie transkrypcji ekspresja genu dla kalpastatyny (*CAST*) w komórkach ALL była niższa niż dla grupy porównawczej, zaś dla genów obu kalpain (*CAPN1* i *CAPN2*) nie wykazano tej różnicy.

Wykorzystując własną metodę rzeczywistej aktywności  $\mu$ -kalpainy w badanych komórkach za pomocą pomiaru degradacji kalpastatyny, wykazano silną, ale zróżnicowaną aktywność proteolityczną  $\mu$ -kalpainy w blastach pochodzących od wszystkich pacjentów z ALL względem komórek CD19<sup>+</sup> grupy porównawczej. Najwyższą aktywność enzymu obserwowano u pacjentów starszych niż 10 lat.

Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy poziomem i aktywnością  $\mu$ -kalpainy a redukcją spontanicznej apoptozy blastów ALL. Zaobserwowano znaczące różnice w uleganiu apoptozie między blastami ALL w zależności od wieku pacjenta – grupy te różnią się również aktywnością  $\mu$ -kalpainy oraz ilością kalpastatyny. Również fenotyp immunologiczny typu pro-B opisuje pacjentów z silnie zahamowaną apoptozą, w stosunku do pacjentów z grupy common.

Próba wywołania zmian w poziomie apoptozy blastów ALL poprzez chemiczną modulację działania kalpainy w tych komórkach za pomocą peptydowego inhibitora IV oceniana z użyciem sondy potencjału mitochondrialnego JC1 wykazała, że zahamowanie  $\mu$ -kalpainy powoduje wzrost spontanicznej apoptozy; efekt ten zależy zarówno od stężenia dodanego inhibitora, jak i od czasu jego działania.

Wykazano znacząco wysoką nadekspresję genu sorcyny (*SRI*) w blastach ALL w porównaniu do grupy kontrolnej. Udowodniono też, iż ekspresja *SRI* koreluje ujemnie, w stopniu znacznym, z aktywnością  $\mu$ -kalpainy i ilością kalpastatyny w blastach.

Powyższe wyniki wskazują na silne, swoiste zakłócenie równowagi enzymu  $\mu$ -kalpainy i inhibitora kalpastatyny w blastach ALL, prowadzące do nadmiernej, niekontrolowanej przez kalpastatynę aktywności proteolitycznej, co może być jedną z przyczyn zmniejszonej spontanicznej apoptozy tych komórek, a także na zależności w ilości i wzajemnym funkcjonowaniu  $\mu$ -kalpainy oraz sorcyny w blastach ALL. Tym samym  $\mu$ -kalpaina może stać się więc potencjalnym markerem prognostycznym i celem terapeutycznym w ALL u dzieci.

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most common malignancies among children. Pathomechanism of the disease is associated with excessive proliferation of lymphoid B or (less frequently) T cells, as well as reduced susceptibility of the blasts to programmed cell death (apoptosis). The development of advanced chemotherapy contributed over the last decades to the significant therapeutic success in ALL patients; however, still remains a group of patients whose treatment has no effect or the relapse occurs. Hence the need of intense research for new diagnostic/prognostic markers and therapeutic targets in childhood ALL.

Main scientific aim of this work is to verify the hypothesis of participation of the calpain – calpastatin system (CCS) in apoptosis avoidance of the ALL blasts. The calpain ( $\mu$ - and  $m$ -calpain) family are calcium-dependent proteases, which through their limited proteolytic activity biomodulate many cellular substrates and affect intracellular processes, including both proliferation and apoptosis. The role of calpain is very important cause the enzyme can act as either pro- or anti-apoptotic. Excessive activity of calpain is prevented by its endogenous inhibitor - calpastatin, existing in a strictly regulated balance with calpain in healthy cells. Any disturbance of this balance may lead to anomalies, including absence of apoptosis. Sorcin - small regulatory protein showing the structure homology to the light chain of calpain, is associated with modulation of calcium channels, thus it may directly (by modulating  $[Ca^{2+}]$ ) or indirectly (by binding of  $Ca^{2+}$ ) affect the activity of calpains.

The aim of the study was to assess the potential role of CCS in the inhibition of ALL cell apoptosis, by estimation of amounts and activities of calpains, calpastatin and sorcin and by modulation of calpain activity in the blasts. The analysis of amounts of various CCS components was performed on ALL blasts and comparative AML blasts and  $CD19^+$  cells from hematological patients without malignancy using flow cytometry. Highly elevated percentage of  $\mu$ -calpain $^+$ CD19 $^+$  blasts, as well as high amount of  $\mu$ -calpain (MFI) was demonstrated in ALL blasts, compared to both control groups. Contrastingly, the level of  $m$ -calpain was low and did not differ significantly from the control group. The amount and concentration of calpastatin were increased and quite heterogeneous within ALL cells (higher values for older patients and ALL pro-B). All differences between the results were statistically significant. Expression of the calpastatin gene (*CAST*) in ALL cells was

lower than for the control group, while the expressions of genes of both calpains (*CAPN1*, *CAPN2*) exhibited no difference.

Using own method for measuring the actual activity of  $\mu$ -calpain by detecting and quantifying the level of proteolytic degradation of calpastatin by calpain, an assessment of the actual activity of the latter was performed in blasts and control cells. The results indicate a significantly strong, but diverse, calpain proteolytic activity in ALL blasts from all patients. In patients older than 10 years, was not detected native form of calpastatin, which is interpreted as the highest level of activity of  $\mu$ -calpain in this group.

Spontaneous apoptosis was inhibited in ALL blasts, in statistically significant correlation with both high amount and activity of  $\mu$ -calpain. Significant differences in activity of  $\mu$ -calpain and calpastatin amounts were observed also when the patients' age and ALL immunophenotype were considered; pro-B ALL describes patients with strongly suppressed apoptosis and high calpain amount, compared to ALL of the common type.

Attempt to induce apoptosis of ALL blasts by chemical inhibition of calpain activity using a peptide inhibitor IV was successful; the effect depended on both the concentration of added inhibitor (high dose stronger impact on the enzyme  $\mu$ -calpain) and duration of exposure.

There was significantly high overexpression of sorcin gene *SRI* in ALL blasts compared to the control group. Also have been shown that the *SRI* expression strongly correlated with the activity and amount of calpain and calpastatin in ALL cells.

These results suggest a strong and specific impairment of the  $\mu$ -calpain/calpastatin and sorcin equilibrium in ALL blasts, leading to excessive proteolytic activity of the enzyme uncontrolled by calpastatin, which may be one of the causes of reduced spontaneous apoptosis of these cells. Thus,  $\mu$ -calpain may become a potential prognostic marker and therapeutic target in the ALL disease.

