

STUDIUM VLIVU METHOTREXÁTU NA EXPRESI GENŮ P53-SIGNÁLNÍ DRÁHY V LEUKEMICKÝCH BUŇKÁCH POMOCÍ cDNA ARRAY.

cDNA ARRAY ANALYSIS OF P53-SIGNALING PATHWAY GENES IN LEUKEMIC CELLS TREATED WITH METHOTREXATE.

MICHALOVÁ E.¹, HRSTKA R.¹, ŠTĚRBA J.^{1,3}, MENDELOVÁ D.³, VALÍK D.², BABČANOVÁ S.¹, KRIVÁNKOVÁ K.¹, VOJTĚŠEK B.¹

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ PATOLOGIE, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

² MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

³ FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, ČERNOPOLNÍ 9, BRNO

Souhrn

Východiska: Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastěji diagnostikovanou malignitou dětských pacientů v České republice. V posledních desetiletích byl učiněn nebývalý pokrok v její léčbě, k němuž bezesporu napomohla i řada poznatků týkající se molekulárních charakteristik onemocnění. Analýza expresních profilů pomocí „Arrays“ (čipů) se stala jednou z významných metod při identifikaci potenciálních markerů onemocnění, které by umožnily bližší charakterizaci nádorových buněk a přispěly k porozumění procesu vzniku leukémie i stratifikace léčby.

Metody a výsledky: V rámci studie byl sledován vliv methotrexátu na expresi genů p53-signální dráhy u maligních blastů izolovaných z kostní dřene dětských pacientů s akutní leukémií. Změny exprese genů byly detekovány pomocí „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“. Porovnáním získaných expresních profilů jednotlivých pacientů byly pozorovány odlišné hladiny exprese sledovaných genů u kontrolních buněk, taktéž změny transkripční aktivity vlivem methotrexátu byly různorodé. Kromě jiných došlo vlivem methotrexátu k výrazným změnám transkripce genů uplatňující se při apoptóze či regulaci buněčného cyklu. Změny exprese některých genů byly nalezeny u více pacientů, řada ostatních se však projevila individuálně, nezávisle na typu onemocnění.

Závěry: Byly detekovány změny v expresi řady genů p53-signální dráhy u maligních blastů kultivovaných *ex vivo* s methotrexátem. Odlišné hladiny exprese genů potvrzují značnou heterogenitu dětských leukémií, projevující se v našem souboru v expresních profilech a ve způsobu buněčné odpovědi na přítomnost methotrexátu, jejichž důsledkem může být různá míra citlivosti k aplikované látce a také různá odpověď pacienta na terapii.

Klíčová slova: cDNA array, leukémie, p53, methotrexát

Summary

Backgrounds: Acute lymphoblastic leukemia is the most frequent malignancy diagnosed in children in the Czech Republic. During last few decades, considerable progress in the treatment had been made and it was similarly contributed by many findings on the molecular basis of the disease. Expression profiling analysis using Macro or Micro Arrays has become an important technique to identify potential markers of the disorder, which might characterise malignant cells and help in the understanding of development of leukaemia and treatment stratification.

Methods and Results: In the present study, the effect of methotrexate on the expression of p53-signalling pathway genes was investigated in malignant blasts isolated from the bone marrow of patients with acute leukemia. Expression variations were detected using „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“. Having drawn a comparison between expression profiles, variable gene expression levels in the control cells; likewise various transcription activity alterations were observed. Significant changes in the transcription were found among genes involved in the of apoptosis or cell cycle regulation. Regarding some genes, changes in expression were observed in more than one patient. However, the expression levels of most other genes varied individually, independently on the subtype of the disease. **Conclusions:** Changes in the expression of p53-signalling pathway genes were detected in the malignant blasts cultivated *ex vivo* with methotrexate. Different levels of the transcription in our series confirm heterogeneity of childhood leukemias, where patients with the same diagnosis do not need to share identical gene expression profiles even the manner of cellular response on the presence of methotrexate, resulting in the various level of perceptiveness to the medication and in the final response to the therapy.

Keywords: cDNAarray, leukemia, p53, methotrexate

Úvod

Leukémie je nejčastějším nádorovým onemocněním dětí v České republice a tvoří asi 30-35 % všech zhoubných nádorů. Leukémií v naší republice onemocní každý rok asi 80 - 90 dětí, přičemž u převážné části z nich je diagnostikována akut-

ní lymfoblastická leukémie (ALL) (1). Jedná se o nádorové onemocnění krvetvorné tkáně, které vzniká maligní transformací kmenové buňky lymfatické řady. Vedle kostní dřene a krve však mohou leukemické buňky pronikat do dalších tkání a orgánů jako jsou mízní uzliny, slezina, játra, ledviny, CNS.

Podle fenotypu je ALL rozlišována na leukémii z B-prekursorů, která tvoří asi 85 % všech případů a leukémii z T-prekursorů (15 % případů) (2).

Stejně jako u solidních nádorů je i pro vznik leukémie nezbytný větší počet genetických změn, které jako důsledek nestability genomu buňce propůjčují odlišné „výjimečné“ nežádoucí vlastnosti, vymykající se běžnému životu buňky. Zde je možno jmenovat aberantní exprese protoonkogenů, chromozomální translokace dávající vznik fúzním genům, hyperploidie. Jejich důsledkem jsou posměněné vlastnosti kmenových buněk vedoucí k jejich abnormální proliferaci, blokové diferenciaci a necitlivost k proapoptickým signálům (3). V léčbě akutní lymfoblastické leukémie byl za posledních několik desetiletí učiněn nebyvalý pokrok a ve vyspělých centrech dětské onkologie je dnes dosahováno dlouhodobých remisí u více než 80 % dětí s ALL (4, 5). K pokroku v léčbě nepochybně přispělo také intenzivní studium molekulárních charakteristik leukemických buněk prohlubující celkové znalosti o daném onemocnění.

Biologické chování buňky je do jisté míry dáno profilem exprimovaných genů. Studium buňky na úrovni RNA umožňuje sledovat její aktuální stav, který je výrazem nesčetných buněčných signálů vedoucích právě k expresi vybraných genů. Technologie založené na principu čipů umožňují analýzu exprese a transkripční aktivity stovek (makročipy) až několika tisíců (mikročipy) genů najednou (6, 7). S jejich pomocí lze sledovat transkripční aktivitu skupiny genů v nejrůznějších biologických systémech a za různě definovaných podmínek. Čipové technologie jsou využívány i při studiu maligních transformací a řešení problematiky nádorových onemocnění, leukémie nevyjímaje. Analýza transkripční aktivity širokého spektra genů a srovnávání expresních profilů je výchozí při odhalování jednotlivých genů a jimi kódovaných proteinů jako potenciálních markerů diagnózy či následné prognózy onemocnění (8, 9). Expresní analýza umožňuje odlišit akutní myeloblastickou leukémii od akutní lymfoblastické leukémie (10) či blíže klasifikovat akutní lymfoblastickou leukémii u dětí (11). Odlišné genetické abnormality maligních buněk v kombinaci s typem leukémie a řadou dalších sledovaných znaků mohou být spojeny s různou mírou citlivosti buněk k aplikované léčbě (12). Na základě identifikace klíčových genů je možno dále sledovat vývoj onemocnění (13), studovat příslušné signální dráhy vybraných genů, a to vše s cílem přispět k porozumění procesu vzniku leukémie, k vývoji nových preparátů a tím k efektivnější léčbě onemocnění.

V rámci studie byl pomocí cDNA GEArray sledován vliv methotrexátu na transkripční aktivitu genů p53-signální dráhy u maligních blastů dětských pacientů trpících akutní leukémií. Methotrexát je již po několik desetiletí nejčastěji používaným antifolátem při léčbě pacientů trpících akutní leukémií (14, 15). Působí jako silný inhibitor enzymu dihydrofolátreduktázy a narušuje tak buněčný metabolismus folátů, metabolity methotrexátu pak přímo blokují aktivitu dalších enzymů podílejících se na syntéze purinů a pyrimidinů (16). Konečným důsledkem je celkový útlum syntézy DNA v buňce (17). Při léčbě akutní lymfoblastické leukémie je methotrexát aplikován v dávkách 12 až 36000 mg/m², přesné množství a interval dávkování jak methotrexátu, tak leukovorinu je definováno specifickými léčebnými protokoly jednotlivých kooperativních skupin (18). Chemoterapie zahrnující methotrexát vykazuje vyšší efektivitu především u pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií typu B (19). Buňky B-ALL prokazují vyšší citlivost k methotrexátu než T-ALL buňky (20, 21). Rozdíly mezi nimi byly nalezeny v intenzitě transportu methotrexátu do buněk, v aktivitě metabolizujících enzymů či v afinitě metabolitů methotrexátu k cílovým molekulám (21). Mechanismus odpovědi leukemických buněk na terapii methotrexátem není doposud zcela objasněn, přispívá k tomu i množství a variabilita genetických změn podílejících se na vzniku leukémie.

Materiál a metody

Od pacientů léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno s diagnózou akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a akutní myeloidní leukémie (AML) byly získány vzorky kostní dřeně, ze kterých byly izolovány maligní blasty pomocí systému Lymphoprep (Axis-Shield). Blasty byly převedeny do RPMI média (Sigma) s obsahem 5- methyltetrahydrofolátu o výsledné koncentraci 25 nM a následně kultivovány se 40 μM methotrexátem či s DMSO jako kontrola po dobu 24 hod. Buňky byly sklizeny a pelety uchovány při -80 °C. Z blastů byla izolována celková RNA pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) nebo TriReagent (MRC).

Expresce p53-signálních genů byla sledována pomocí GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array (SuperArray Bioscience Corporation). Produkt je navržen pro studium panelu 96 genů spojených se signální dráhou proteinu p53, podle vztahu k p53 jsou geny rozděleny do několika funkčních skupin (**Tabulka 1**). Izolovaná celková RNA byla naznačena biotinem v procesu reverzní transkripce pomocí MMLV-reverzní transkriptázy (Promega) a získaná cDNA následně použita jako hybridizační sonda. Při hybridizaci se sonda specificky váže na komplementární sekvence jednotlivých genů, ukotvené v přesně definovaných pozicích na komerčně dodávané membráně. Pozitivní signály na membráně jsou detekovány na principu chemiluminiscence. Míra exprese jednotlivých genů byla hodnocena jako intenzita signálů pomocí programu TotalLab 2003 (Nonlinear USA Inc) a normalizována vzhledem k expresi genu GAPDH kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu. Princip metody znázorňuje **Obrázek 1**. Získaná data byla statisticky analyzována v programu Statistica Cz7 (StatSoft) za použití Wilcoxonova testu s hladinou významnosti $p < 0,05$.

Celkově byla exprese p53-signálních genů byla hodnocena u 12 pacientů trpících ALL, z toho u 10 případů ALL B-řady (B1 až 10) a 2 případů T-ALL (T1, 2), a u 2 pacientů trpících AML (AML1, 2).

Tabulka 1.: Geny analyzované z hlediska jejich exprese pomocí GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array

p53 rodina: TP53, TP63, TP73

Geny ovlivňující p53:

Expresce a stabilita p53: BZRP (pBR), CREBBP (CBP), D5S346 (DP1), E2F1 (E2F), EP300 (p300), MDM2, MTBP, NFKB1, NUMB

Modifikace p53: ATM, ATR, CCNH (cyclin H), CDK7 (CAK), CHEK1 (Chk1), CHEK2 (Chk2), CREBBP (CBP), CSNK1A1 (CK1), CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, EP300 (p300), HIPK2, KIP2, KIP3, MAP2K4, MAP2K7, MAPK8IP2, PCAF, PML, PRKCA, PRKCB1, PRKCG, PRKCQ, PRKDC (DNA-PK), SIRT1

Interakce s p53: APEX (Ref-1), BAP1, BRAP, BRCA1, CDKN2A (p14ARF), E1B-AP5 (E1B55K), E2F1, MDM2, MYC, RASA1 (Ras), RB1 (pRB), TEAD1 (SV40), WRN, WT1

Geny ovlivněné p53:

Buněčný cyklus: ABCB1 (MDR1), ACTA1 (actin), AD022, APR-3, CDC2, CDKN1A (P21Waf1), DAXX, ESR1, FADD, FAF1, GADD45A, GTS1 (B99), HIF1A, HSPA4 (Hsp70), LRDD, MAP4, NDRG (RTP), PIG8 (E124), PMP22, REL, REPRIMO, SFN (14-3-3), SP1, STAT5A, TBP, THRA, TNFAIP1, TNFSF6, TP53TGI, TRAF1, TRAF4, TRAF5, WIG1

Apoptóza: APAF1, BAX, BBC3 (PUMA), BCL2, CASP9 (Caspase-9), CTSD (Cathepsin D), LRDD (PIDD), P53AIP1, PMAIP1 (NOXA), PMP22 (GAS-3), TNF, TNFRSF10B (Killer5/DR5), TNFSF6 (Fas), TP53BP2 (ASPP2)

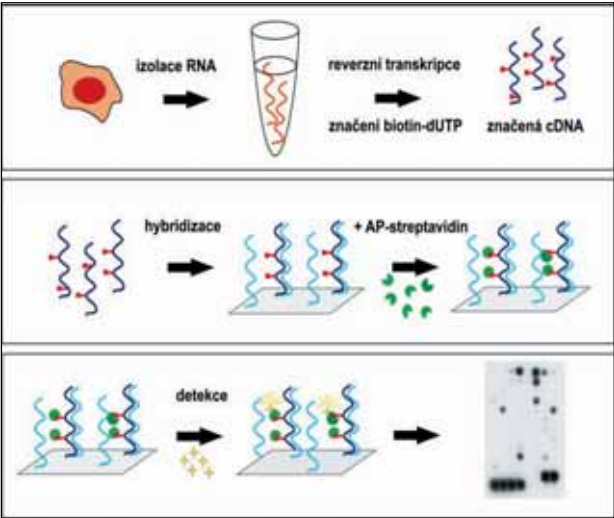
Reparace DNA: GADD45A, RRM2B (p53R2)

Angiogeneze a tvorba metastáz: BAI1, SERPINB5 (Maspin), THBS1 (TSP1)

Tabulka 2.: Expres vybraných genů p53-signální dráhy u jednotlivých pacientů vyjádřená procentuálně vzhledem k expresi genu GAPDH. K: kontrolní blasty kultivované bez methotrexátu, ME: blasty kultivované s methotrexátem.

Gen	B1		B2		B3		B4		B5		B6		B7		B8		B9		B10		T1		T2		AML1		AML2		
	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	
BAX	166	358	6	12	8	18	0	13	0	19	15	23	15	6	21	23	8	0	10	5	27	3	11	17	0	0	0	0	
BBC3	181	416	55	99	118	170	523	100	516	213	303	444	72	178	336	274	380	270	123	124	149	147	124	121	125	211	54	44	
BCL2	0	0	11	14	0	0	14	14	0	10	27	38	13	17	52	44	47	41	7	1	31	25	0	0	30	7	14	11	
ASPP2	138	177	16	15	90	127	0	0	0	6	33	45	10	14	18	36	33	28	22	12	41	24	93	100	17	0	0	8	
FAF1	181	263	4	9	118	120	0	4	33	10	8	16	9	16	4	26	27	10	10	5	23	11	114	115	3	0	0	0	
HIF1A	7	25	47	70	86	187	101	59	0	34	123	219	28	10	62	78	109	121	100	90	58	46	140	45	37	30	14	9	
MDM2	2	9	64	117	82	72	0	41	60	34	89	144	12	16	134	124	107	111	89	81	80	62	3	3	43	32	16	26	
MTBP	22	141	3	6	6	6	0	0	13	24	22	27	8	2	6	20	25	20	3	11	9	5	3	6	13	32	7	0	
p14/CDKN2A	169	230	44	68	54	122	378	100	183	170	287	419	87	197	280	235	306	213	113	114	155	167	33	46	153	177	11	21	
p21/CDKN1A	41	97	18	33	3	14	105	47	127	13	31	72	18	26	35	51	22	16	9	20	0	45	0	0	24	28	11	7	
SP1	112	164	23	34	25	29	486	46	315	64	46	81	26	50	38	42	52	13	35	23	45	0	20	14	6	46	10	1	
EP300	15	78	17	47	3	5	0	24	137	49	70	107	44	61	78	79	84	58	61	51	100	99	2	4	45	59	23	25	
CSNK1A1	33	176	38	46	58	40	0	21	243	90	62	118	26	41	89	104	141	95	56	30	150	122	34	16	77	78	41	29	
JNKK2	230	259	38	83	79	99	370	85	640	154	287	427	91	218	339	279	342	257	103	138	128	115	48	59	197	302	82	115	
SIRT1	28	103	15	36	114	139	0	10	226	44	42	118	28	25	102	99	148	85	30	28	64	72	80	10	77	96	39	47	
HIPK2	280	475	18	53	85	123	113	49	304	138	184	321	39	58	100	138	240	187	94	107	86	47	60	83	67	112	21	9	
TP53	0	4	9	12	0	0	0	12	0	12	25	34	9	17	8	19	21	17	9	2	15	13	0	0	5	6	1	9	
GAPDH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Obrázek 1.: Princip metody cDNA GEArray.



Výsledky a diskuse

Při porovnání expresních profilů byly zjištěny rozdílné hladiny exprese jednotlivých genů v kontrolních buňkách, taktéž míra odpovědi buněk na působení methotrexátu se mezi pacienty lišila. U všech pacientů bylo možné sledovat změny v expresi genů uplatňujících se v procesu apoptózy. Pacienti B1, B2, B6, B8 a AML1 se vyznačovali statisticky významným nárůstem exprese proapoptických genů. Opačný účinek methotrexátu u dané skupiny genů byl zjištěn u pacientů B5 a B9. Silná transkripční aktivita v kontrole i po podání methotrexátu byla zaznamenána u genu BBC3, kódující protein PUMA, který vazbou na BCL2 indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následně apoptózu (22). Výrazný nárůst exprese BCL2 vazebného proteinu BAX byl pozorován u pacienta B1, u ostatních se hladina exprese po methotrexátu zvýšila jen mírně a zůstávala celkově nízká. Hladina exprese BCL2,

působícího jako inhibitor apoptózy (23), byla taktéž nízká, případně poklesla vlivem methotrexátu. Dále byly zaznamenány individuální změny v expresi proapoptických genů PIDD, NOXA, APAF- 1, ASPP2 a genů FADD, FAF1 a HIF1A uplatňujících se kromě apoptózy i při regulaci buněčného cyklu. Byla pozorována pouze bazální transkripční aktivita TP53 a vlivem methotrexátu se výrazně neměnila. U některých pacientů však došlo ke změnám exprese v genu kódujícího protein MDM2, který je negativním regulátorem endogenní hladiny proteinu p53 (24). Methotrexát taktéž ovlivnil transkripční aktivitu genů, jejichž produkty se uplatňují při regulaci buněčného cyklu. U blastů kultivovaných s methotrexátem rostla u některých pacientů exprese p21^{Waf1/Cip1}, kódujícího inhibitor cyklin-dependentních kináz (25, 26) a ARF (p14), jehož produkt se váže na MDM2 a podporuje jeho degradaci (27). U pacienta B1 byl zaznamenán výrazný vzestup exprese MTBP, jehož produkt může navodit zástavu buněčného cyklu v G1 fázi nezávisle na p53 (28). Celkové zvýšení exprese skupiny genů přispívající k zástavě buněčného cyklu bylo pozorováno u pacientů B1, B2, B6, B7 a AML1, útlum exprese naopak u pacientů B4, B5, a B9. Vysoké hladiny exprese a individuální změny byly prokázány u genů kódujících produkty spojené s modifikací p53: JNKK2, CSNK1A1, SIRT1 nebo HIPK2, kódující kinázu, která stabilizací p53 či negativní regulací MDM2 přispívá k indukci apoptózy či zástavě buněčného cyklu (29). Individuální změny exprese po vystavení buněk methotrexátu byly detekovány i u řady transkripčních faktorů či vazebných proteinů (SP1, EP300). Výsledky expresní analýzy vybraných p53-signálních genů u jednotlivých pacientů uvádí **Tabulka 2.** V rámci vyšetřovaném souboru byly nalezeni pacienti (B1, B2, B6), u nichž methotrexát navodil zvýšenou expresi genů indukujících apoptózu a zástavu buněčného cyklu. Naopak u pacientů B5 a B9 byl zaznamenán opačný efekt vedoucí k celkovému poklesu transkripční aktivity sledovaných genů. Klinické údaje týkající se průběhu léčby v současnosti nebyly dostupné u všech sledovaných pacientů a celkové hodnocení získaných výsledků v souvislosti s úspěšností léčby bude vyžadovat delší časový odstup.

Cílem studie bylo zjistit, zda methotrexát navozuje změny exprese signálních genů p53 a popřípadě vytipovat geny, které by přispěly k charakterizaci onemocnění či sledování jeho průběhu a odpovědi pacienta na léčbu. Na základě analýzy vzorků 15 pacientů však nebyl nalezen gen, jehož transkripční aktivita by byla obdobná u všech pacientů. Řada genů byla exprimována s vysokou intenzitou, taktéž změny exprese vlivem methotrexátu byly v některých případech velmi výrazné. Jednotliví pacienti se však mezi sebou lišili jak ve spektru silně exprimovaných genů, tak i ve spektru změně exprese a jejich intenzitě. Tato variabilita je potenciálním důsledkem odlišného genetického pozadí každého pacienta, které ovlivňuje i buněčnou odpověď na přítomnost cytostatika.

Technologie cDNA Array použitá v rámci studie je varianta expresní analýzy finančně méně náročná, která taktéž nevyžaduje speciální a nákladné přístrojové vybavení. Je koncipována pro studium užší skupiny genů (96 genů), přesněji genů vybrané signální dráhy a výběr produktu je možno jednodušeji orientovat v závislosti na sledovaném problému či studovaném systému. Stěžejním krokem je izolace celkové RNA jako výchozího materiálu pro syntézu značené cDNA sondy. Úspěšnost izolace v tomto případě závisela především na objemu sedimentu kultivovaných blastů, jejich množství izolovaná ze vzorku kostní dřeně však nebyla vždy dostačující, což bylo jedním z faktorů limitující počet doposud vyšetřených pacientů. S koncem roku 2005 firma SuperArray Bioscience Corporation ukončila výrobu doposud používaného produktu „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“ a nahradila jej distribucí produktu „Oligo GEArray Human p53 Signalling Pathway Microarray“. Počet analyzovaných vzorků, rozšiřující stávající výsledky (30), byl omezen počtem dostupných membrán původního produktu. Expre-

si genů p53-signální dráhy bude dále možno studovat pomocí OligoGEArray, založeného na obdobném principu.

Závěr

Z výsledků studie vyplývá, že u maligních blastů kultivovaných s methotrexátem skutečně dochází ke změnám exprese některých genů p53-signální dráhy. Heterogenní expresní profily kontrolních buněk a buněk kultivovaných *ex vivo* s methotrexátem odrážejí odlišná genetická pozadí každého pacienta a odlišný způsob odpovědi jednotlivců na přítomnost antifolátu. Tato skutečnost je plně v souladu se současným trendem biomedicínského výzkumu, který směřuje k vytvoření personalizované medicíny, kde medikamentózní léčba bude cílena na fyziologické a genetické pozadí pacienta.

Byla pozorována indukce exprese genů, jejichž produkty se účastní regulace apoptózy a buněčného cyklu a které by tak mohly hrát významnou roli při eliminaci maligní buněčné populace. Pro zhodnocení vztahu vytipovaných genů k methotrexátu by však bylo potřeba ještě více rozšířit soubor analyzovaných vzorků a studovat tyto geny také z hlediska jimi kódovaných proteinů a jejich interakcí. Poznatky o působení methotrexátu by dále mohly být rozšířeny o analýzu změn exprese genů jiných signálních drah, pro které výrobce dodává taktéž komerčně připravené membrány typu „GEArray Q series Array“ nebo „Oligo GEArray Microarray“. Budoucí výsledky získané expresní analýzou dalších pacientů by tak mohly přispět k hodnocení citlivosti a individuální míry odpovědi pacientů na terapii methotrexátem.

Poděkování

Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR No. NR8338- 3/2005 a MZO 000209805.

Literatura

- Mališ J, Klenner P. Nádorová onemocnění dětského věku. In: Klenner P, ed. Klinická onkologie. Galén, 2002:607-630.
- Starý J. Moderní léčba dětské leukémie je především ambulantní. Vox Pediatrica 2003; 3:16-20.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.
- Pui CH, Relling MV, Campana D, Švand WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Hematol 2002; 6:161-180.
- Starý J. Historie a současnost léčby akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Trans Hematol 2005; 11:170-175.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. Science 1995; 270:467-470.
- Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO. Examining the living genome in health and disease with DNA microarrays. JAMA 2000; 283:2298-2299.
- Nasedkina TV, Zharinov VS, Isaeva EA et al. Clinical screening of gene rearrangements in childhood leukemia by using a multiplex polymerase chain reaction-microarray approach. Clin Cancer Res 2003; 9:5620-5629.
- Bruchova H, Kalinova M, Brdicka R. Array-based analysis of gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res 2004; 28:1-7.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286:531-537.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002; 1:133-143.
- Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 1999; 93:1643-1650.
- Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2001; 97:2115-2120.
- Farber S, Diamond LK, Mercer RD et al. Temporary remission on acute leukemia in children produced by folic acid antagonists, 54-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). N Engl J Med 1948; 238:778-793.
- Bertino JR. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. J Clin Oncol 1993; 11:5-14.
- Miller GP, Benkovic SJ. Stretching exercises—flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. Chem Biol 1998; 5: R105-R113.
- Olsen EA. The pharmacology of methotrexate. J Am Acad Dermatol 1991; 25:306-318.
- Minnaur NJ, Kounali D, Vedi S et al. Methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. II. In vivo effects on bone mineral density. Rheumatology 2002; 41:741-749.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH et al. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998; 8:499-505.
- Galpin AJ, Schuetz JD, Masson E et al. Differences in folylpolyglutamate synthetase and dihydrofolate reductase expression in human B-lineage versus T-lineage leucemic lymphoblasts: mechanism for lineage differences in methotrexate polyglutamylation and cytotoxicity. Mol Pharmacol 1997; 52:155-163.
- Rots MG, Pieters R, Peters GJ et al. Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. Blood 1999; 93:1677-1683.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Molec Cell 2001; 7:673-682.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74:609-619.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 1997; 387:299-303.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75:817-825.
- Harper JW, Adami GR, Wei N et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993; 75:805-816.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell 1998; 92:725-734.
- Boyd MT, Vlatkovic N, Haines DS. A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. J Biol Chem 2000; 275:31883-31890.
- Di Stefano V, Mattiuzzi M, Sacchi A, D'Orazi G. HIPK2 inhibits both MDM2 gene and protein by, respectively, p53-dependent and independent regulations. FEBS Lett 2005; 579:5473-80.
- Hrstka R, Muller P, Vojtěšek B et al. Analýza změn exprese p53-signálních genů v buňkách akutní lymfoblastické leukémie v závislosti na působení methotrexátu. Klinická onkologie 2005; 18:64-68.