

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VLIV NOVÉHO FLT3 INHIBITORU NA INDUKCI BUNĚČNÉ SMRTI
U LEUKEMICKÝCH BUNĚK**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Darina Muthná, Ph.D.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D., a PharmDr. Darině Muthné, Ph.D. za konzultace, cenné rady a za to, že mi byla pomocnou rukou během vypracovávání této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Andrea Hotáryová

Školitel: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv nového FLT3 inhibitoru na indukci buněčné smrti u leukemických buněk

Zhruba u 30 % pacientů s akutní myeloidní leukemií se vyskytuje mutace kinázy Flt3, která je jednoznačně negativním prognostickým faktorem nemoci. Proto vývoj nových Flt3 inhibitorů představuje zásadní pokrok v terapii AML u těchto pacientů. Ačkoli standardní léčba chemoterapeutiky (cytarabinem a antracyklinem) a alogenní transplantace kmenových buněk, které se využívají v terapii AML posledních 40 let, v mnoha případech vedou ke kompletní remisi, zároveň však nesnižují četnost relapsu a přináší mnoho rizik spojených s působením na zdravé buňky organismu. Účelem rozvoje cílené terapie, včetně inhibitorů Flt3 kinázy, je zabránit tomuto nežádoucímu působení chemoterapeutik. Cílem výzkumu prováděném v rámci vypracování této diplomové práce bylo stanovení vlivu nově syntetizovaného Flt3 inhibitoru K1872 na proliferaci leukemických buněk s wild type Flt3 kinázou (THP-1) a buněk s nejčastěji se vyskytující mutací Flt3-ITD (MOLM-13 a MV-4-11). Pomocí níže uvedených metod se zkoumal vliv inhibitoru na proliferaci buněk, navození apoptózy a změnu proteinové exprese vybraných signálních drah. Výsledky jednotlivých pokusů prokázaly výrazný vliv na snížení proliferace leukemických buněk s mutací Flt3-ITD (MOLM-13 a MV-4-11) a při porovnání s výsledky preklinického hodnocení midostaurinu, inhibitoru používaného v klinické praxi, vykazují stejný trend.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Andrea Hotáryová

Supervisor: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of a new FLT3 inhibitor on induction of cell death in leukemia cell lines

Approximately 30% of patients with acute myeloid leukemia have a Flt3 kinase mutation, which is clearly a negative prognostic factor of the disease. Therefore, the development of new Flt3 inhibitors represents a major advance in the therapy of AML in these patients. Although standard treatment with chemotherapeutics (cytarabine and anthracycline) and allogeneic stem cell transplantation, which have been used in AML therapy for the past 40 years, lead to complete remission in many cases, they do not reduce the frequency of relapse and bring many risks associated with the effect on healthy cells of the body. The purpose of developing targeted therapy, including Flt3 kinase inhibitors, is to prevent this adverse effect of chemotherapeutics. The aim of the research carried out as part of this diploma thesis was to determine the effect of the newly synthesized Flt3 inhibitor K1872 on the proliferation of leukemic cells with wild type Flt3 kinase (THP-1) and cells with the most frequently occurring Flt3-ITD mutation (MOLM-13 and MV-4-11). The effects of the inhibitor on cell proliferation, induction of apoptosis and changes in protein expression of selected signaling pathways were investigated using the methods described below. The results of the individual experiments demonstrated a significant effect on the reduction of the proliferation of leukemic cells with Flt3-ITD mutation (MOLM-13 and MV-4-11) and when compared with the results of the preclinical evaluation of midostaurin, an inhibitor used in clinical practice, they show the same trend.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	POUŽITÉ ZKRATKY	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	<i>Akutní myeloidní leukemie</i>	11
3.1.1	Charakteristika	11
3.1.2	Diagnostika	12
3.1.3	Klasifikace AML	13
3.1.4	Základní léčebné strategie	16
3.2	<i>Flt3 kináza</i>	17
3.2.1	Charakteristika Flt3	17
3.2.2	Proteiny aktivované Flt3 kinázou	19
3.2.3	Mutace Flt3	22
3.2.4	Současné Flt3 inhibitory v terapii AML	23
4	CÍL PRÁCE	25
5	METODIKA	26
5.1	<i>Kultivace buněk</i>	26
5.2	<i>Testované látky</i>	27
5.3	<i>Stanovení aktivity kaspáz</i>	27
5.3.1	Příprava roztoků	27
5.3.2	Stanovení aktivity kaspáz	28
5.4	<i>Mikroskopie buněk</i>	29
5.4.1	Příprava roztoků	29
5.4.2	Mikroskopie v průchozím světle	29
5.4.3	Fluorescenční značení jader	30
5.5	<i>Stanovení změn v proteinové expresi pomocí SDS-PAGE</i>	30
5.5.1	Příprava roztoků	30
5.5.2	Lýza buněk a stanovení celkové bílkoviny	31
5.5.3	Stanovení proteinů	35

5.6	<i>Statistické vyhodnocení dat</i>	37
5.6.1	Stanovení kaspáz.....	37
5.6.2	Mikroskopie.....	37
5.6.3	Stanovení proteinové exprese.....	37
6	VÝSLEDKY	39
6.1	<i>Aktivita kaspáz</i>	39
6.2	<i>Mikroskopie buněk</i>	42
6.2.1	Mikroskopie v průchozím světle.....	42
6.2.2	Fluorescenční značení jader.....	43
6.3	<i>Stanovení proteinů</i>	43
7	DISKUZE	45
8	ZÁVĚR	48
9	POUŽITÁ LITERATURA	49
10	Elektronické zdroje	54

1 ÚVOD

Akutní myeloidní leukemie (AML) je nejčastěji se vyskytující akutní leukemie u dospělých a druhá nejčastější u dětí. V České republice je incidence 2-3/100 000 osob za rok (Zatloukalová *et al.* 2021) a celosvětově 2-5,4/100 000 osob za rok (Kristo *et al.* 2021). Incidence AML stoupá s věkem, u pacientů starších 65 let dosahuje 15-20/100 000 osob za rok (Carter *et al.* 2020). Jedná se o poměrně vzácné, ale heterogenní onemocnění s nízkou dobou přežití u starších pacientů a s vysokým rizikem relapsu. Doba přežití 5 let se uvádí u pouze 30 % nemocných, z hlediska prognózy se tak jedná o nejméně závažnější leukemii (National Cancer Institute 2023). Heterogenita AML je zodpovědná za odlišnou odpověď pacientů na léčbu a za případnou rezistenci k léčbě.

Standardem terapie nově diagnostikované AML je posledních 40 let kombinovaná indukční cytotoxická chemoterapie cytarabinem a antracyklinem a alogenní transplantace kmenových buněk. Problémem intenzivní chemoterapie je špatná snášenlivost staršími a křehkými pacienty. Většině pacientů starších 70 let nepřináší intenzivní chemoterapie benefit. U většiny nemocných, kteří intenzivní chemoterapii podstoupí, dochází ke kompletní remisi. Problémem však zůstává vysoké riziko relapsu a fakt, že pětileté přežití se týká pouze 20 % pacientů (Park *et al.* 2010).

Heterogenita onemocnění, limity vycházející z toxicity chemoterapie, vysoká úmrtnost a riziko relapsu vedly k diagnostickému posunu z hlediska vývoje molekulárně genetických vyšetření, které pomohly k hlubšímu pochopení patofyziologie nemoci a k výzkumu cílené terapie AML (Bhansali *et al.* 2023).

Právě genetické změny jsou ve většině případů příčinou AML. Nejčastější z nich jsou mutace Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3) vyskytující se až u 35 % pacientů. Výskyt Flt3 mutací je spojen s horší prognózou a vyšším rizikem relapsu. Flt3 kináza se tak stala atraktivním terapeutickým cílem a v posledních letech dochází k vývoji nových Flt3 inhibitorů s nižší toxicitou a lepší snášenlivostí oproti cytotoxické terapii.

2 POUŽITÉ ZKRATKY

AML	Akutní myeloidní leukemie
AML1	Acute myeloid leukemia 1 protein
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CBF β	Core-binding factor β
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
CNS	Centrální nervová soustava
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELN	European Leukemia Net
EMA	European Medicines Agency
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
ETO	Eight-twenty-one gene
FAB	The French-American-British classification
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
HSP90	Heat shock protein 90
ICC	International Consensus Classification
ITD	Internal tandem duplication
JAK	Janus kinase
KM	Kultivační médium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLL	Mixed-lineage leukemia gene
MTG8	Myeloid transforming gene on chromosome 8
MYH11	Myosin heavy chain 11
NIH	National Institute of Health
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PML/RAR α	Promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α
PR	Pracovní roztok

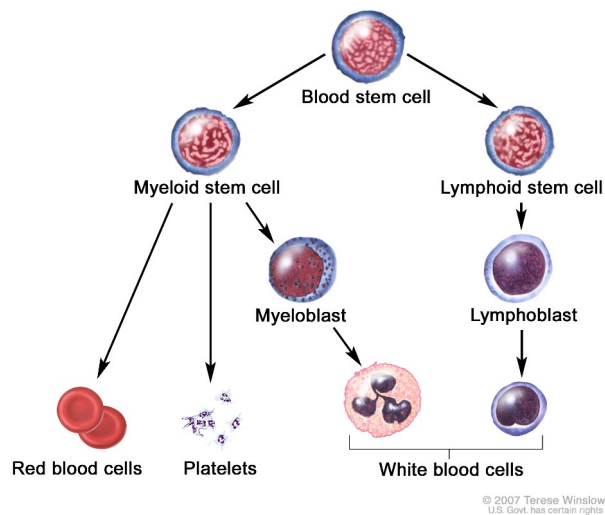
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SCF	Stem cell factor
SHC	Src Homology and Collagen protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TKD	Tyrosine kinase domain mutation
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
ZR	Zásobní roztok

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Akutní myeloidní leukemie

3.1.1 Charakteristika

Akutní myeloidní leukemie (AML) je maligní onemocnění charakterizované poruchou krve tvorby, u kterého dochází ke zvýšené proliferaci buněk myeloidní vývojové linie a ke ztrátě diferenciace typicky na úrovni blastů. Tyto leukemické blasty v kostní dřeni proliferují na úkor fyziologické krve tvorby (Obrázek 1).



Obrázek 1 Fyziologická krev tvorba (National Cancer Institute 2024)

Klinické příznaky jsou spojené právě s nedostatkem normálních krvinek v periferní krvi a u pacientů se zvýšenou hladinou leukocytů s infiltrací tkání leukocyty.

V důsledku nedostatku erytrocytů se objevují projevy anémie jako je únava, dušnost, malátnost a bledost, trombocytopenie se projevuje zvýšenou krvácivostí, tvorbou hematomů a petechií, a pro granulocytopenii je typický zvýšený výskyt infekcí nedostatečně reagujících na antibiotika, zejména v oblasti horních cest dýchacích.

Zvýšená hladina leukocytů v periferní krvi může vést k manifestaci syndromu leukostázy, který se projevuje dušností, bolestmi na hrudi a neurologickými symptomy jako je bolest hlavy,

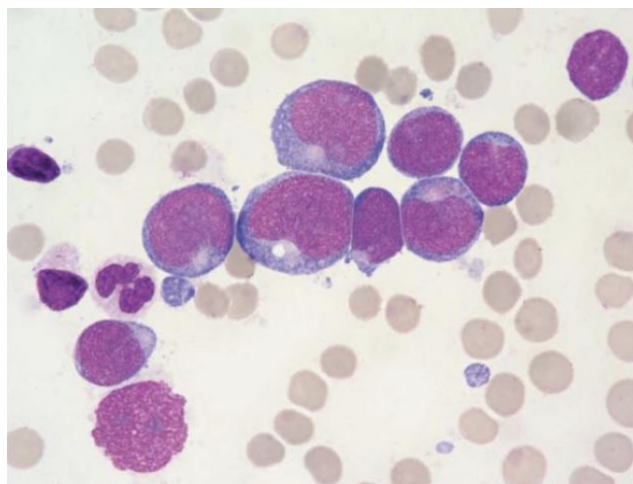
zmatenost či priapizmus. Riziko poškození CNS je vyšší u pacientů s počtem leukocytů nad $100 \cdot 10^9/l$, avšak takto vysoká leukocytóza není pro akutní leukemii typická (Adam 2008).

Etiologie AML není zcela známa. Její vznik mohou vyvolat některé kancerogenní chemikálie včetně cytostatik, nebo radiační záření. AML vyvolaná léčbou cytostatiky se označuje jako postterapeutická a vyvíjí se zpravidla s odstupem 5-10 let od terapie alkylačními cytostatiky (cyklofosfamid, busulfan, cisplatina) a 1-5 let v případě inhibitorů topoizomerázy II (etoposid, daunorubicin). Z rizikových chemikálií se jedná o benzen a jeho deriváty, herbicidy a pesticidy. Vyšší incidence AML je pozorována také u pacientů s hereditárními onemocněními spojenými s vyšší fragilitou chromatinu (Fanconiho anémie, Bloomův syndrom) nebo s chromozomální aberací (Downův syndrom, Patauův syndrom).

Právě chromozomální odchylky mají zásadní vliv na vznik nemoci. Mohou vést k modifikaci transkripce genů, která má za důsledek deregulaci hematopoetické kmenové buňky a vznik leukemie (Park *et al.* 2010).

3.1.2 Diagnostika

Ke stanovení diagnózy je nejprve nutné mikroskopické diferenciální vyšetření krevního obrazu. Typicky jsou v periferní krvi pacienta přítomné blasty (Obrázek 2) v množství přesahujícím 5 % všech jaderných buněk, fyziologické granulocyty ve zbytkovém množství, a naopak chybí střední vývojová stádia granulocytů (myelocyty a metamyelocyty; tzv. hiatus leucaemicus). Zvýšená hladina leukocytů není sama o sobě diagnostická, obvykle je leukocytóza přítomna, ale počet leukocytů může být normální nebo dokonce snížený (Šálek 2012).



Obrázek 2 Leukemické blasty přítomné v aspirátu kostní dřeně (Kačírková a Campř 2007)

Typicky bývá patologicky zasaženo více krevních buněk, to znamená že kromě leukocytózy je přítomna anémie v důsledku nedostatku erytrocytů, nebo trombocytopenie.

Při patologickém nálezů v periferní krvi se pro potvrzení diagnózy provádí podrobné vyšetření aspirované kostní dřeně pomocí sternální punkce z hrudní kosti. Kromě základního cytologického vyšetření se aspirát kostní dřeně použije také k cytochemickému, cytogenetickému, molekulárně biologickému a imunofenotypizačnímu vyšetření, která se provádějí na specializovaných pracovištích.

Výsledkem cytologického vyšetření je v případě diagnózy AML přítomnost blastů v množství větším než 20 % všech jaderných buněk v kostní dřeni či periferní krvi (ELN 2022). Myeloidní blasty se liší od lymfoidních strukturou chromatinu, tvarem jádra a přítomností granul.

Cytochemické vyšetření se provádí ke stanovení enzymatické výbavy buněk a k odlišení myeloidní a lymfoidní linie, kdy AML odpovídá pozitivní průkaz myeloperoxidázy. K přesnějšímu určení patologicky zasažené linie se pomocí průtokové cytometrie stanovuje exprese CD antigenů na cytoplazmatické membráně blastů a určuje se specifický leukemický fenotyp (LAIP).

Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření hodnotí etiologicky významné chromozomální odchylky, přítomnost fúzních genů a mutací (RUNX1/MTG8, AML1/ETO, CBF β /MYH11, PML/RAR α , FLT3-ITD, MLL) (Adam, 2008).

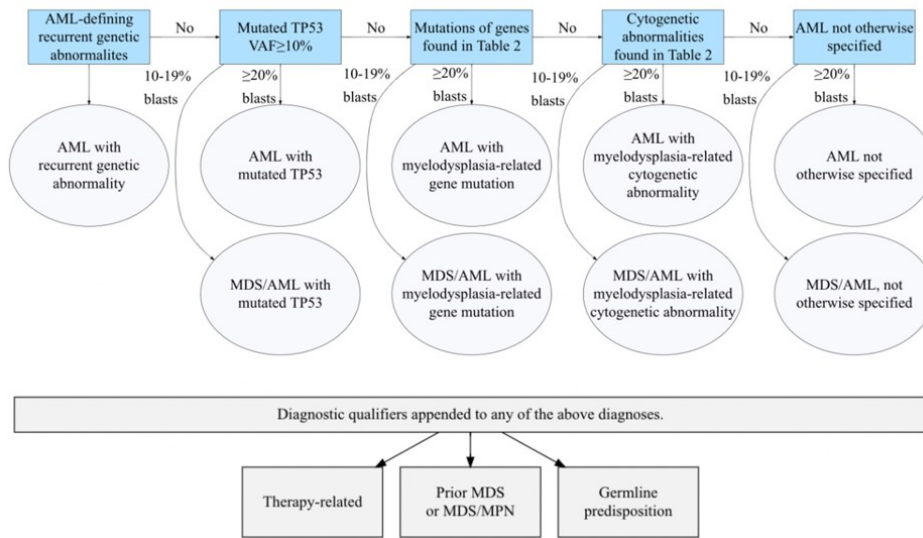
3.1.3 Klasifikace AML

Nejjednodušší, ale klinicky významné je rozdělení na dva základní typy: AML *de novo* a sekundární AML s myelodysplastickými rysy.

Klasifikační systém používaný k rozdělení AML vytvořila WHO a zohledňuje kromě morfologie blastů zásadní v dříve používaných klasifikačních systémech také imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické diagnostické aspekty. Tento systém se používá v kombinaci s Mezinárodní konsenzuální klasifikací (ICC) (Obrázek 3).

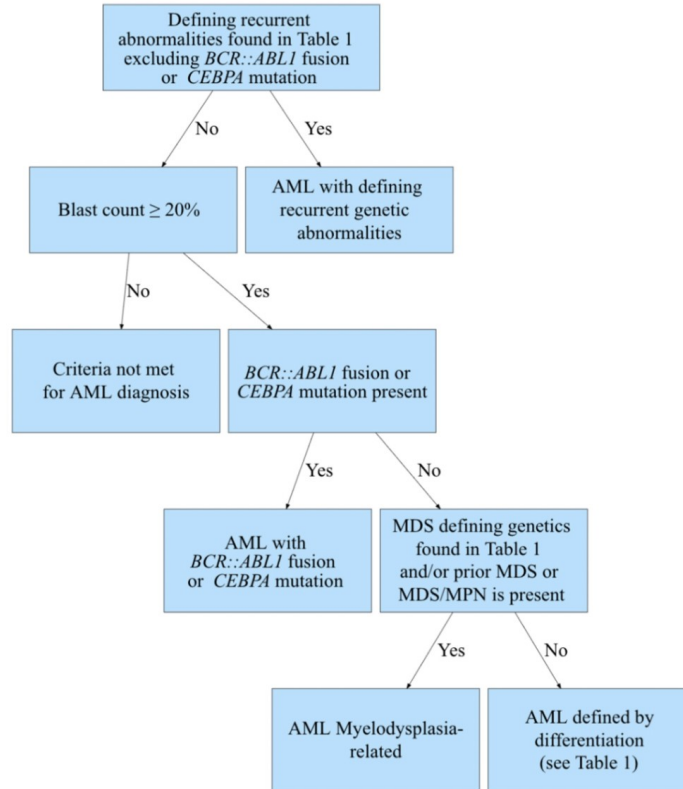
International Consensus Classification (ICC) of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias.

≥ 10% myeloid blasts or blasts equivalent in the bone marrow or blood



The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumors: Myeloid Neoplasms

If clinical and pathologic suspicion for Acute Myeloid Leukemia is present, such as increased blasts in peripheral blood/bone marrow



Obrázek 3 Klasifikace AML dle WHO a ICC (Chang, Kuzu 2023)

Pacienti s diagnostikovanou AML se na základě provedených vyšetření zařazují do rizikových skupin pomocí systému vytvořeného European LeukemiaNet (ELN 2022), který zohledňuje především přítomné genetické odchylky a dělí diagnózu AML na příznivou, středně rizikovou a nepříznivou (Obrázek 4).

2022 ELN risk classification by genetics at initial diagnosis*

Risk category†	Genetic abnormality
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1†,‡ ▪ inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11†,‡ ▪ Mutated NPM1†,§ without FLT3-ITD ▪ bZIP in-frame mutated CEBPA‖
Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutated NPM1†,§ with FLT3-ITD ▪ Wild-type NPM1 with FLT3-ITD (without adverse-risk genetic lesions) ▪ t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLL3::KMT2A†,¶ ▪ Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 ▪ t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged# ▪ t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 ▪ t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP ▪ inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) ▪ t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-rearranged ▪ -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) ▪ Complex karyotype,** monosomal karyotype†† ▪ Mutated ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, and/or ZRSR2‡‡ ▪ Mutated TP53^a

* Frequencies, response rates and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.

† Mainly based on results observed in intensively treated patients. Initial risk assignment may change during the treatment course based on the results from analyses of measurable residual disease.

‡ Concurrent KIT and/or FLT3 gene mutation does not alter risk categorization.

§ AML with NPM1 mutation and adverse-risk cytogenetic abnormalities are categorized as adverse-risk.

‖ Only in-frame mutations affecting the basic leucine zipper (bZIP) region of CEBPA, irrespective whether they occur as monoallelic or biallelic mutations, have been associated with favorable outcome.

¶ The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.

Excluding KMT2A partial tandem duplication (PTD).

** Complex karyotype: ≥ 3 unrelated chromosome abnormalities in the absence of other class-defining recurring genetic abnormalities; excludes hyperdiploid karyotypes with three or more trisomies (or polysomies) without structural abnormalities.

†† Monosomal karyotype: presence of two or more distinct monosomies (excluding loss of X or Y), or one single autosomal monosomy in combination with at least one structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML).

‡‡ For the time being, these markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes.

a TP53 mutation at a variant allele fraction of at least 10%, irrespective of the TP53 allelic status (mono- or biallelic mutation); TP53 mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.

Obrázek 4 Rozdělení rizikových skupin AML v čase diagnózy na příznivou (favorable), středně příznivou (intermediate) a nepříznivou (adverse) dle ELN (Döhner et al. 2022)

3.1.4 Základní léčebné strategie

Po potvrzení diagnózy je před zahájením léčby nutné rozhodnutí, zda se bude jednat o léčbu kurativní s cílem kompletní remise, nebo léčbu paliativní vedoucí k prodloužení celkového přežití pacienta a ke zlepšení kvality jeho života zpomalením progresu onemocnění. Mezi faktory ovlivňující výběr způsobu léčby patří charakteristiky diagnostikované AML, celkový zdravotní stav pacienta včetně komorbidit a jeho věk (Adam 2008).

Rozlišujeme 5 základních léčebných strategií:

- standardní chemoterapie obsahující indukční a konsolidační fázi léčby
- standardní chemoterapie s cílem provedení alogenní transplantace po indukční a konsolidační fázi léčby
- paliativní chemoterapie
- pouze symptomatická léčba
- experimentální léčba novými léky

3.1.4.1 Standardní chemoterapie

První fází intenzivní léčby je indukční terapie prováděná s cílem navodit kompletní remisi nemoci. Používá se kombinace antracyklinu a cytarabinu v režimu „3+7“ (3denní léčba antracyklinem a 7denní léčba cytarabinem). V případě selhání se cyklus opakuje buď se stejnými cytostatiky v případě parciální remise, nebo se zvolí kombinace se silnějším efektem (fludarabin+idarubicin+cytarabin nebo cytarabin+mitoxantron) v případě progresu nemoci.

Druhou fází je terapie konsolidační, která zahrnuje jak chemoterapii, tak alogenní transplantaci kostní dřeně nebo kmenových hematopoetických buněk získaných z periferní krve dárce. Složení konsolidační terapie se liší podle toho, v jakém riziku se pacient nachází. První možností je samostatná vysokodávková chemoterapie cytarabinem, která se volí u pacientů s nízkým rizikem (AML s translokacemi zahrnujícími geny pro jaderný vazebný faktor). Naopak alogenní transplantace v kombinaci s vysokodávkovou chemoterapií je indikována po jednom indukčním cyklu u pacientů s diagnózou AML s komplexními změnami karyotypu nebo AML s přestavbou Mixed-lineage leukemia genu (MLL), kteří jsou ve vysokém riziku.

Po ukončení konsolidační terapie lze pokračovat terapií udržovací. Ta se podává s cílem udržení remise, nejsou však dostupná významná data opodstatňující její význam.

Nejčastěji se jako udržovací terapie podává azacytidin, případně cílená léčiva, pokud byla používána v kombinaci během indukce a konsolidace. (Česká hematologická společnost 2024)

3.1.4.2 Cílená terapie

U pacientů s přítomnou mutací Flt3 kinázy se do kombinace ke standardní chemoterapii přidávají inhibitory Flt3 kinázy – midostaurin u nově diagnostikované AML při mutaci Flt3-ITD anebo Flt3-TKD, quizartinib u nově diagnostikované AML pouze při Flt3-ITD a gilteritinib u relabující/refrakterní AML s mutací Flt3-ITD anebo Flt3-TKD. (FDA 2023)

V kombinaci se standardní chemoterapií se u pacientů s CD33 pozitivní *de novo* diagnostikovanou AML podává humanizovaná monoklonální protilátka gemtuzumab ozogamicin s navázaným cytotoxickým kalicheamicinem (Česká hematologická společnost 2024).

3.2 Flt3 kináza

3.2.1 Charakteristika Flt3

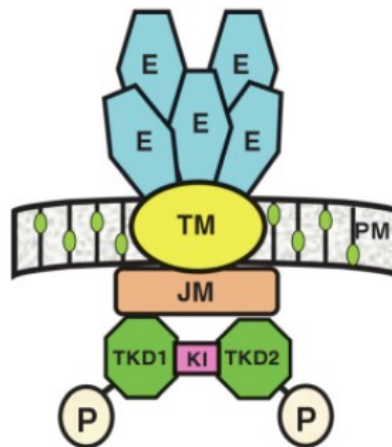
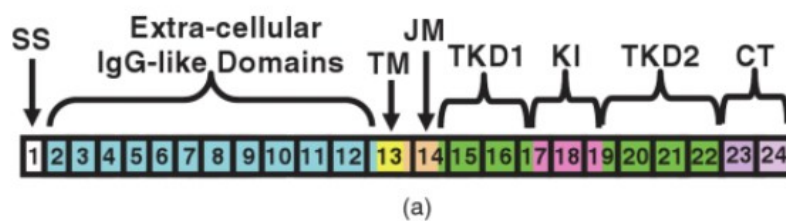
Flt3 kináza je tyrozinkinázový receptor exprimovaný myeloidními a lymfoidními progenitorovými buňkami. Fyziologicky zajišťuje aktivovaná Flt3 kináza společně s dalšími růstovými faktory (SCF, interleukin 3) normální krevetvorbu a růst buněk. Na diferencovaných krevních buňkách se již nevyskytuje.

Flt3 kináza je lokalizovaná v cytoplazmatické membráně buněk a skládá se z extracelulární části tvořené ligand vázající doménou strukturně podobnou imunoglobulinu, z transmembránové a juxtamembránové podjednotky a z intracelulárních tyrozinkinázových domén (Obrázek 5).

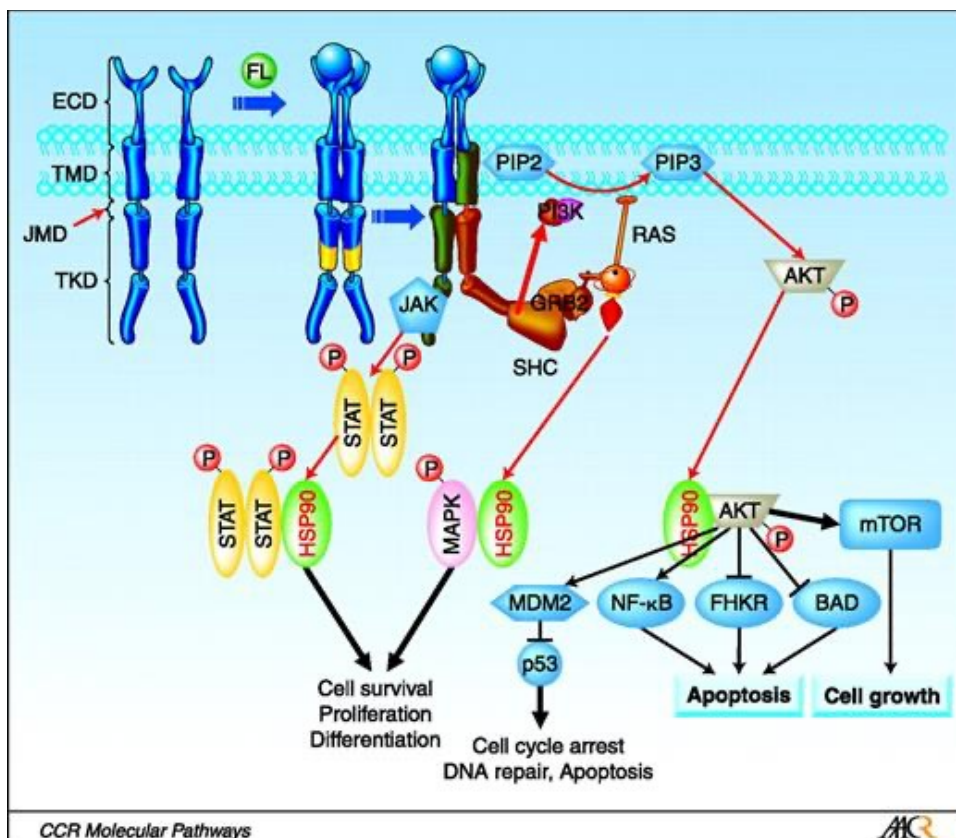
Ligand Flt3 kinázy je transmembránový a solubilní protein exprimovaný buňkami kostní dřeně (Kiyoi *et al.* 2019). Mimo jiné se vyskytuje například na buňkách placenty, plic, varlat, vaječníků či ledvin.

Flt3 kináza v neaktivním stavu představuje monomer konformačně složený tak, aby bránil samovolné fosforylaci tyrozinkinázové domény. Po interakci s Flt3 ligandem dojde ke

konformační změně receptoru, která umožní vazbu na další Flt3 kinázu. Vznik tohoto dimeru po dmiňuje spuštění tyrozinkinázové aktivity receptoru, a to díky odhalení akceptorového místa pro fosfátovou skupinu. Následuje interakce s několika adaptorovými proteiny jako je SHC, GRB2 nebo CBL, které dále přenáší signál a spouští se tak kaskáda fosforylačních reakcí vedoucích k aktivaci proteinů a signálních drah (Obrázek 6). Výsledkem je stimulace buněčné proliferace a diferenciace. Signální dráhy aktivované tyrozinkinázou přenáší prostřednictvím HSP90 v posledním kroku kaskády signál do jádra buňky. Patří mezi ně dráha PI3K/Akt, dále RAS/MAPK a JAK/STAT (Meshinchi a Appelbaum 2009).



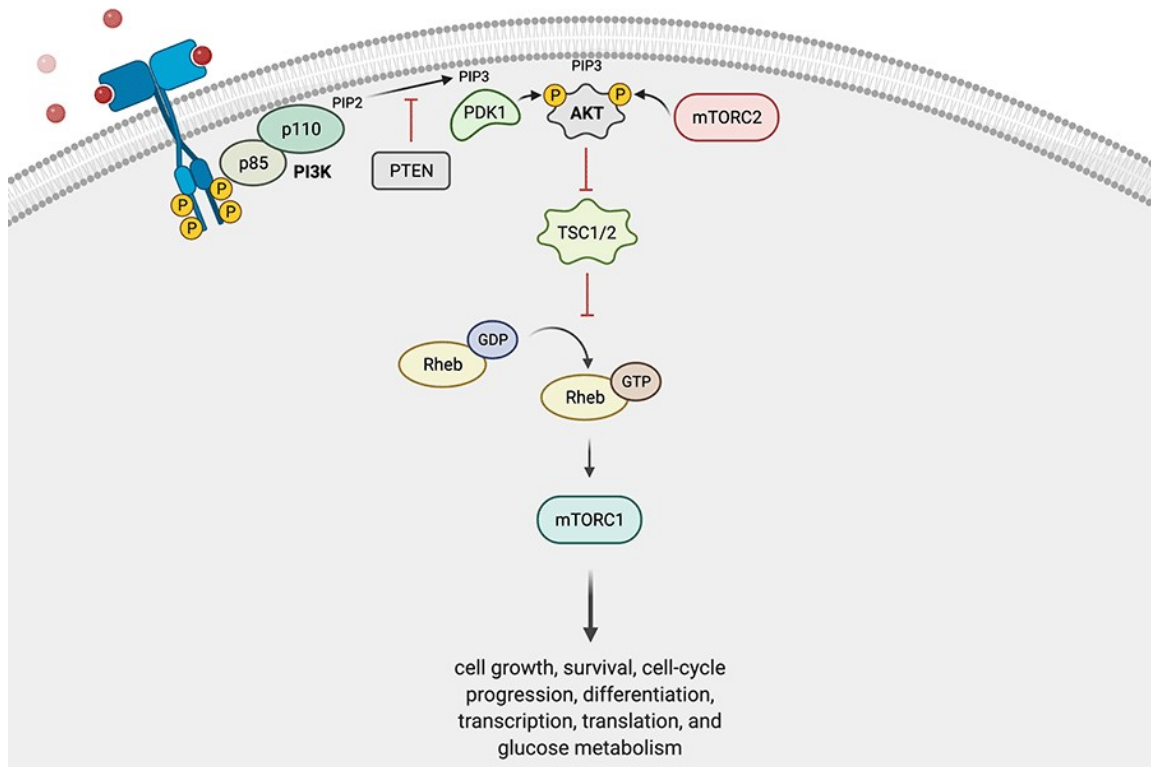
Obrázek 5 Struktura Flt3 kinázy, SS=signální sekvence, E=extracelulární doména, TM=transmembránová doména, JM=juxtamembránová doména, TKD1/2=tyrozinkinázové domény, KI=kinase insert doména, CT=C-koncová doména (Rauscher 2014)



Obrázek 6 Signální dráhy aktivované Flt3 kinázou (Meshinchi a Appelbaum 2009)

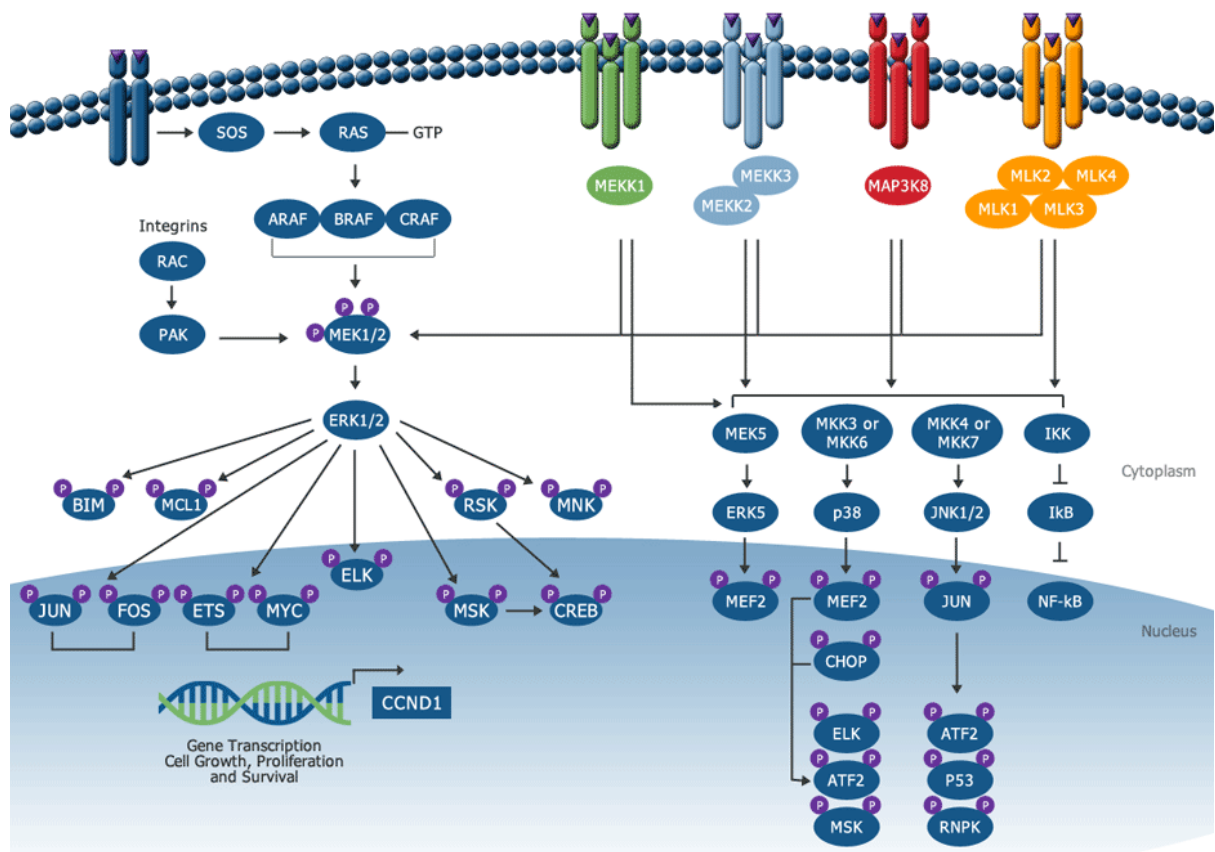
3.2.2 Proteiny aktivované Flt3 kinázou

Protein Akt (proteinkináza B) je součástí signální dráhy PI3K/Akt aktivované Flt3 kinázou. Po navázání extracelulárního ligandu na Flt3 kinázu dochází působením fosfatidylinositol-3,4,5-fosfátu (PIP3) a fosfoinositid dependentní kinázy (PDK-1) k fosforylaci a aktivaci Akt na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Aktivní Akt následně v cytosolu fosforyluje a reguluje další proteiny v buňce mající vliv na buněčnou proliferaci a apoptózu (Martini *et al.* 2014) (Obrázek 7). Zvýšená exprese proteinu Akt a jeho neustálá aktivace v leukemických buňkách hraje důležitou roli v progresi onemocnění (Nicholson a Anderson 2002).



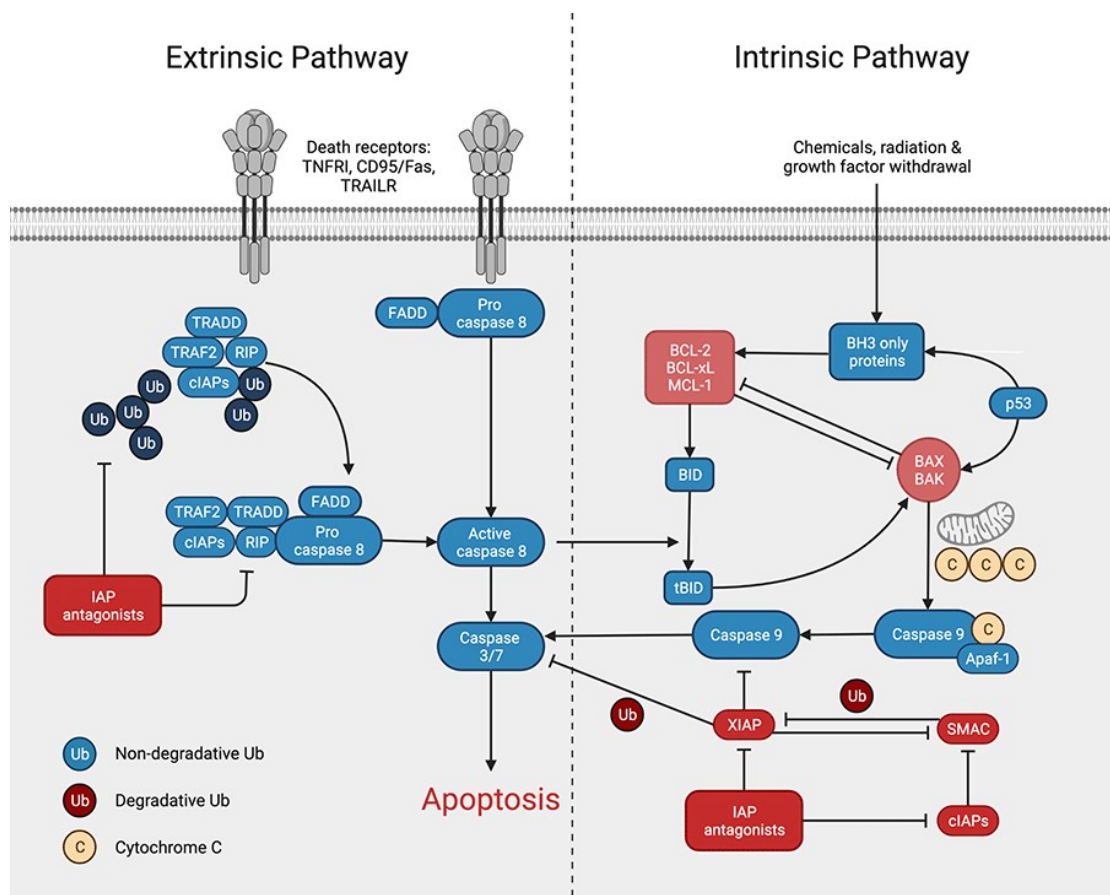
Obrázek 7 PI3K/Akt/mTOR kaskáda (Rockland)

Protein Erk patří mezi mitogenem aktivované proteinkinázy. Hraje zásadní roli v kaskádě Ras-Raf-MEK-ERK aktivované Flt3 kinázou. Po navázání ligandu dojde k uvolnění GTP a k aktivaci proteinů Ras, Raf, MEK a Erk. Aktivní Erk následně fosforyluje velkou škálu proteinů a tím ovlivňuje procesy regulující buněčnou proliferaci, diferenciaci, metabolismus a apoptózu (Ramos 2008) (Obrázek 8). Stejně jako Akt je Erk ve zvýšené míře exprimován leukemickými buňkami a podporuje jejich proliferaci (Steelman *et al.* 2011).



Obrázek 8 Ras/Raf/MEK/Erk kaskáda (Rockland)

Protein Bcl-2 je nezbytnou součástí signálních drah uvnitř buněk vedoucích k regulaci apoptózy (Antonsson a Martinou 2000). Má antiapoptotický efekt a při aktivaci apoptotických procesů v buňce, na základě podnětů jako je poškození DNA, oxidační stres nebo nedostatek růstových hormonů, tyto procesy inhibuje. (Obrázek 9) V buňkách AML je exprimován ve zvýšené míře, podporuje jejich nekontrolovatelné množení a je spojen s horší prognózou a s rezistencí k chemoterapii (Wei *et al.* 2020). Vliv Flt3 kinázy na protein Bcl-2 je zprostředkován nepřímo při aktivaci buněčné proliferace jinými proteiny (Ling *et al.* 2017).



Obrázek 9 Aktivace apoptózy vnitřní a vnější cestou (Rockland)

3.2.3 Mutace Flt3

U pacientů s AML je Flt3 kináza exprimovaná leukemickými blasty a vyskytuje se na více než 90 % z nich. Klinicky významný je výskyt mutací tohoto receptoru. Jsou přítomné přibližně u 35 % nemocných, jedná se tak o nejčastější genetické aberace AML a o faktor předpovídající horší prognózu nemoci. Jsou známy dva typy mutací: interní tandemová duplikace (FLT3-ITD) a mutace tyrozinkinázové domény (FLT3-TKD).

3.2.3.1 FLT3-ITD

Mutace Flt3-ITD postihuje zhruba 25 % pacientů s AML a její výskyt je závislý na věku nemocného. Ve většině případů se jedná o pacienty starší 55 let, u mladších se vyskytuje zřídka. Je lokalizovaná v juxtamembránové doméně a v jejím důsledku dochází k dimerizaci několika aminokyselin a k aktivaci Flt3 kinázy, aniž by se na něj navázal ligand. Kináza tak dává nekontrolovatelně signál k autonomní fosforylaci a aktivaci signálních drah závislých na Flt3.

Přesný mechanismus, jakým interní tandemová duplikace dává Flt3 kináze signál k aktivaci, není známý. Juxtamembránová doména funguje fyziologicky jako negativní kontrola a stericky zabraňuje samovolné dimerizaci. Předpokládá se, že přítomnost duplikace narušuje strukturu juxtamembránové domény, odstraňuje sterickou zábranu a umožňuje interakci dvou Flt3 kináz bez extracelulárního impulsu.

3.2.3.2 FLT3-TKD

Tato méně častá bodová mutace Flt3 kinázy se vyskytuje asi u 10 % nemocných. Na rozdíl od Flt3-ITD je prevalence shodná ve všech věkových skupinách. Flt3-TKD je lokalizovaná v tyrozinkinázové doméně a způsobuje záměnu jedné aminokyseliny (typicky tyrosin nebo histidin za aspartát) vedoucí ke ztrátě autoinhibičního mechanismu. Tento proces vede k samovolné fosforylaci tyrosinu a stejně jako Flt3-ITD k nekontrolovatelné aktivaci Flt3 kinázy nezávislé na interakci s ligandem (Meshinchi a Appelbaum 2009).

3.2.4 Současné Flt3 inhibitory v terapii AML

Inhibitory Flt3 kináz se dělí do dvou generací. Mezi léčiva první generace řadíme tandutinib, sunitinib, midostaurin, lestaurtinib a sorafenib. Jedná se o neselektivní multikinázové inhibitory. Tyto látky byly zkoumány v rámci klinického hodnocení jako monoterapie AML. Výsledkem jejich působení sice byla redukce množství blastů v periferní krvi, ale jejich účinnost byla vyhodnocena jako nedostatečná. Midostaurin, lestaurtinib a sorafenib byly následně hodnoceny v kombinační terapii se standardní chemoterapií, kde se prokázala významná účinnost midostaurinu. Léčiva druhé generace jsou selektivními a vysoce účinnými inhibitory Flt3 a řadíme sem gilteritinib a quizartinib (Zhao *et al.* 2021).

Mezi současně používané inhibitory schválené FDA a EMA patří midostaurin, gilteritinib a quizartinib.

První používanou molekulou v rámci cílené terapie AML je midostaurin. Původně byl vyvinutý pro léčbu solidních nádorů jako inhibitor proteinkinázy C. Midostaurin je účinný na oba typy mutací Flt3 a zlepšuje celkové přežití pacientů. Jeho indikací je nově diagnostikovaná AML s přítomnou mutací Flt3 v kombinaci s indukční a konsolidační terapií. Po dokončení standardní chemoterapie lze při dobré odpovědi na léčbu midostaurin podávat jako udržovací

terapii samostatně, avšak s nejasným efektem. V Evropské unii se jedná o orphan drug, tedy léčivo vyvinuté pro terapii vzácného onemocnění (FDA 2017, EMA 2023).

Gilteritinib je vysoce selektivní a účinný inhibitor Flt3 indikovaný v monoterapii u pacientů s relabující/refrakterní AML. Stejně jako midostaurin je gilteritinib v EU orphan drug. V porovnání se standardní chemoterapií vedlo podávání gilteritinibu ke kompletní remisi u většího množství pacientů. Větší benefit z terapie mají pacienti, kteří v minulosti užívali jiný inhibitor Flt3 kinázy (FDA 2018, EMA 2023).

Z druhé generace najdeme v terapii také nově schválený quizartinib. Jedná se opět o vysoce selektivní inhibitor účinný proti mutaci Flt3-ITD, avšak ne proti Flt3-TKD. Je indikován u pacientů s nově diagnostikovanou AML s Flt3-ITD v kombinační terapii s antracyklinem a cytarabinem v indukční fázi a se samotným cytarabinem ve fázi konsolidační. Následně je možné ho podávat samostatně jako udržovací terapii (FDA 2023, EMA 2023).

4 CÍL PRÁCE

Cílem této experimentální diplomové práce bylo studium antiproliferačního účinku nově syntetizovaného Flt3 inhibitoru K1872 na leukemické buňky. Testovaný inhibitor K1872 na bázi azaindolu je strukturně zcela odlišný od současně používaných Flt3 inhibitorů. Abychom se přiblížili heterogenitě onemocnění, prováděli jsme pokusy na třech liniích akutní myeloidní leukemie s exprimovanou, ale různě mutovanou Flt3 kinázou (THP-1, MOLM-13 a MV-4-11). Na buněčném modelu jsme různými metodikami hodnotili inhibici proliferace, indukci apoptózy a změny v expresi vybraných proteinů. Uvedená práce a výsledky jsou součástí společného projektu FaF, LFHK a FNHK, jehož náplní je právě syntéza a testování nových Flt3 inhibitorů.

5 METODIKA

5.1 Kultivace buněk

Vliv inhibitoru Flt3 kinázy na buňky akutní myeloidní leukemie *in vitro* jsme zkoumali na třech buněčných liniích – THP-1, MOLM-13 a MV-4-11. Jednalo se o suspenzní buněčné kultury kultivované v lahvičkách TPP v inkubátoru při 37 °C, tedy teplotě blízké tělesné teplotě lidského těla. K udržení pH, a aby prostředí odpovídalo extracelulární tekutině, byl v inkubátoru obsažen oxid uhličitý ve zvýšené koncentraci 5 %. Další podmínkou kultivace buněk bylo udržení relativní vlhkosti mezi 90-95 %.

Aby buňky proliferovaly, bylo nutné je uchovávat v kultivačním médiu (KM) napodobujícím extracelulární tekutinu. Buněčné linie THP-1 a MOLM-13 se uchovávaly v RPMI-1640 médiu s 10 % FBS, 2 mM L-glutaminem a 1 % roztokem penicilinu a streptomycinu. Linie MV-4-11 v Iscove's Modified Dulbecco's médiu s 10 % FBS, 2mM L-glutaminem a 1 % roztokem penicilinu a streptomycinu. Pro zaručení optimálního růstu byly linie pravidelně pasážovány a kontrolována jejich viabilita. Používaly jsme linie z maximálně 20. pasáže.

THP-1 je monocytární buněčná linie izolovaná z periferní krve jednoletého pacienta mužského pohlaví s akutní myeloidní leukémií. Tato buněčná linie exprimuje nemutovanou wt-Flt3 kinázu. (ATCC TIB-202 2024)

MOLM-13 je buněčná linie izolovaná z periferní krve dvacetiletého pacienta mužského pohlaví s hyperdiploidní akutní myeloidní leukémií. Buňky MOLM-13 exprimují Flt3 kinázu jak nemutovanou, tak s mutací Flt3-ITD. (AddexBio Cat #: 0003003 2012)

MV-4-11 tvoří blasty desetiletého pacienta mužského pohlaví s bifenotypickou B-myelomonocytickou leukémií. Tyto blasty exprimují Flt3 kinázu pouze s mutací Flt3-ITD. (ATCC CRL-9591 2024)

5.2 Testované látky

Látka K1872 byla de novo syntetizována v laboratořích Centra biomedicínského výzkumu FNHK skupinou dr. Lukáše Góreckého. Základem je substituovaný azaindol, přesná struktura a syntéza nemůže být z důvodů patentového řízení zobrazena. Sloučeninu jsme rozpustili ve 100% DMSO na zásobní roztok o koncentraci 10 mM, který jsme v alikvotech uchovávali v mrazáku při -20°C. Jako kontroly jsme v pokusech používali komerčně dodávané chemikálie – DMSO a staurosporin (zásobní roztok 1 mM). V čas potřeby jsme roztoky dle směšovací rovnice naředili kultivačním médiem na pracovní roztoky o požadované koncentraci.

5.3 Stanovení aktivity kaspáz

5.3.1 Příprava roztoků

Pro stanovení aktivity kaspáz jsme nejprve zásobní roztok (ZR) K1872 o koncentraci 10 mM naředili pomocí KM na 1 mM a z něj dalším ředěním připravili sérii roztoků o koncentracích: 1, 5, 10, 20 a 50 μM . Jako negativní kontrolu jsme použili DMSO ve finální koncentraci 0,1 %, jako pozitivní kontrolu staurosporin o finální koncentraci roztoku 1 μM . Každý roztok jsme připravili v objemu 40 μl (10 μl na jednu jamku, celkem tři jamky, rezerva) (Tabulka 1).

Tabulka 1 Koncentrační řada roztoků pro ovlivnění před stanovením aktivity kaspáz

	<i>kontrola</i>	<i>K1872 1 μM</i>	<i>K1872 5 μM</i>	<i>K1872 10 μM</i>	<i>K1872 20 μM</i>	<i>K1872 50 μM</i>	<i>stau 1 μM</i>
<i>K1872 1 mM [μl]</i>	-	0,4	2	4	8	20	-
<i>KM [μl]</i>	99	39,6	38	36	32	20	39,6
<i>DMSO 100 % [μl]</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>stau 1 mM [μl]</i>	-	-	-	-	-	-	0,4

5.3.2 Stanovení aktivity kaspáz

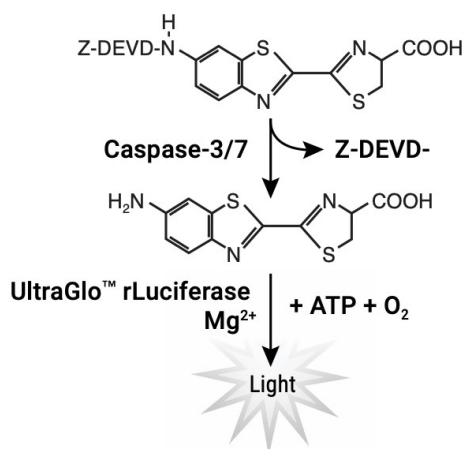
Do bílé 96jamkové destičky s bílým dnem (SPL) jsme nejprve nasadili 10 000 buněk v 90 μ l kultivačního média na jamku a následně přidali 10 μ l testovaného roztoku. Blank tvořilo 100 μ l kultivačního média (KM) bez buněk (Tabulka 2). Buňky s roztoky jsme inkubovali 24 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru.

Tabulka 2 Schéma destičky s ovlivněnými buňkami před stanovením aktivity kaspáz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		KM	KM	KM
B	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		DMSO	DMSO	DMSO
C	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		1	1	1
D										5	5	5
E	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		10	10	10
F	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		20	20	20
G	KM	DMSO	1	5	10	20	50	stau		50	50	50
H										stau	stau	stau

červená – THP-1, modrá – MOLM-13, zelená – MV-4-11

Stanovení aktivity kaspáz jsme prováděli pomocí testovací soupravy Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). Metoda je založená na chemiluminiscenci – jevu, při kterém dochází v důsledku chemické reakce k emisi světla. V tomto případě aktivovaná kaspáza štěpí specifický substrát – luminofor za vzniku luminiskujícího produktu (Obrázek 10). Míra luminiscence tedy odpovídá aktivitě kaspázy.



Obrázek 10 Princip chemiluminiscenčního stanovení aktivity kaspázy 3/7 (Promega)

Testovací souprava obsahuje lahvičku s 2,5 ml pufru a lahvičku s lyofilizovaným substrátem. V čase potřeby jsme do lahvičky se substrátem přenesli 2,5 ml pufru a substrát jsme rozpustili. Připravené činidlo jsme promíchali, 100 μ l přidali do každé jamky a po 30 minut dlouhé inkubaci při 25 °C jsme v multimodálním destičkovém readeru Tecan Spark proměřili luminiscenci.

5.4 Mikroskopie buněk

5.4.1 Příprava roztoků

Stejně jako pro stanovení aktivity kaspáz, i pro pozorování buněk pod mikroskopem jsme si připravili sérii roztoků na ovlivnění. Zásobní roztok K1872 o koncentraci 10 mM jsme nejprve naředili pomocí kultivačního média na 1 mM a z něj dalším ředěním připravili sérii roztoků o koncentracích: 1, 5, 10, 20 a 50 μ M. Jako negativní kontrolu jsme použili DMSO ve finální koncentraci 0,1%, jako pozitivní kontrolu staurosporin o finální koncentraci 1 μ M. Každý roztok jsme připravili v objemu 200 μ l (Tabulka 3).

Tabulka 3 Koncentrační řada roztoků pro ovlivnění buněk před mikroskopií

	<i>kontrola</i>	<i>K1872 1 μM</i>	<i>K1872 5 μM</i>	<i>K1872 10 μM</i>	<i>K1872 20 μM</i>	<i>K1872 50 μM</i>	<i>stau 1 μM</i>
<i>K1872 1 mM [μl]</i>	-	1	5	10	20	50	-
<i>KM [μl]</i>	199	199	195	190	180	150	199
<i>DMSO 100 % [μl]</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>stau 1 mM [μl]</i>	-	-	-	-	-	-	1

5.4.2 Mikroskopie v průchozím světle

Do 24jamkové průhledné destičky Nunclon Delta (Nunc) jsme nasadili 150 000 buněk ve 400 μ l kultivačního média na jamku. Na každou linii bylo potřeba 7 jamek (Tabulka 4) a suspenzi buněk jsme připravili v nadbytku (10 jamek) o celkovém objemu KM 4000 μ l. Ke 400 μ l buněčné suspenze jsme přidali 100 μ l příslušného testovaného roztoku. Po 24hodinové inkubaci

jsme buňky pozorovali a vyfotili mikroskopem Nikon TMS v procházejícím světle při zvětšení 100x.

Tabulka 4 Schéma destičky s ovlivněnými buňkami na focení pod mikroskopem

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	1	5	10	20	50
B	DMSO	1	5	10	20	50
C	DMSO	1	5	10	20	50
D	stau_THP-1	stau_MOLM-13	stau_MV-4-11			

červená – THP-1, modrá – MOLM-13, zelená – MV-4-11

5.4.3 Fluorescenční značení jader

Po vyfocení v průchozím světle jsme do každé jamky kultivační desky přidali 1 kapku fluorescenčního barviva NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen), a buňky inkubovali 20 minut chráněné před světlem. Použité barvivo Hoechst 33342 prochází buněčnou membránou, váže se na DNA v jádře a po ozáření světlem o vlnové délce 360 nm emituje modré světlo o vlnové délce 460 nm.

Po inkubaci jsme z každé jamky odebrali 200 µl buněčné suspenze do 96jamkové černé destičky s průhledným dnem (Greiner). Destičku jsme následně stočili (4 minuty při 20 °C a 1500 otáčkách), aby buňky ze suspenze přisedly na dno a bylo možné je vyfotit pomocí zobrazovacího zařízení ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) přes DAPI filtr při zvětšení 40x.

5.5 Stanovení změn v proteinové expresi pomocí SDS-PAGE

5.5.1 Příprava roztoků

Zásobní roztok K1872 o koncentraci 10 mM jsme stejně jako u předchozích pokusů nejprve naředili pomocí kultivačního média na 1 mM a z něj dalším ředěním připravili roztoky o koncentracích 1 a 10 µM. Jako negativní kontrolu jsme použili suspenzi buněk v KM, jako

pozitivní kontrolu staurosporin o finální koncentraci 1 μM a gilteritinib o koncentraci 1 nM. Každý roztok jsme připravili v objemu 2 ml. (Tabulka 5)

Tabulka 5 Koncentrační řada roztoků pro ovlivnění buněk před stanovením proteinů

	<i>K1872</i> 1 μM	<i>K1872</i> 10 μM	<i>stau</i> 1 μM	<i>gilt</i> 1 nM
<i>K1872</i> 1 mM [μl]	10	100	-	-
<i>KM</i> [μl]	1 990	1 900	1 990	1 990
<i>stau</i> 1 mM [μl]	-	-	10	-
<i>gilt</i> 1 μM [μl]	-	-	-	10

5.5.2 Lýza buněk a stanovení celkové bílkoviny

Pro buněčnou lýzu a následné stanovení proteinové exprese pomocí elektroforézy jsme do kultivační lahvičky o ploše dna 25 cm² (TPP) nasadili 3 miliony buněk ve 4 ml KM a následně přidali 1 ml připraveného vzorku. Celkem se pro pokus použilo na každou ze tří buněčných linií pět lahviček:

<i>THP-1</i>	
1	kontrola
2	K1872 1 μM
3	K1872 10 μM
4	staurosporin 1 μM
5	gilteritinib 1 nM

<i>MOLM-13</i>	
1	kontrola
2	K1872 1 μM
3	K1872 10 μM
4	staurosporin 1 μM
5	gilteritinib 1 nM

<i>MV-4-11</i>	
1	kontrola
2	K1872 1 μM
3	K1872 10 μM
4	staurosporin 1 μM
5	gilteritinib 1 nM

Za 24 hodin od ovlivnění jsme buňky z kultivační lahvičky přenesli do 25 ml zkumavky a stočili (10 minut při +4 °C a 1300 otáčkách, Rotina 420R). Po centrifugaci jsme slili kultivační médium a sediment propláchli PBS pufrem s 1 mM orthovanadičnanem sodným a znovu za stejných podmínek stočili. Supernatant jsme zlikvidovali a k suchému sedimentu přidali 0,3 ml lyzovacího pufru (Cell Signaling Technology) s inhibitory proteáz a fosfatáz (Roche). Ty, stejně jako orthovanadičnan sodný, brání degradaci proteinů, aby výsledky elektroforézy odrážely proteiny obsažené v buňkách před jejich lýzou. Ze stejného důvodu se celý proces lýzy prováděl v chladu a mezi jednotlivými kroky se zkumavky ukládaly do ledu. Vzorky s lyzovacím pufrem jsme důkladně promíchali a nechali inkubovat na ledu 30 minut, během kterých jsme je každých 5 minut průběžně míchali pro efektivní lýzu buněk. Po skončení inkubace jsme roztoky pipetou resuspendovali, přenesli do eppendorf zkumavky, stočili (30 minut při +4 °C a 14000 otáčkách, Eppendorf 5424R) a následně supernatant, obsahující buněčné lyzáty, přelili do kryozkumavek a zamrazili v -70 °C.

Lýza buněk sloužila jako mezikrok mezi ovlivněním buněk zkoumaným inhibitorem a stanovením proteinové exprese pomocí elektroforézy. Cílem bylo uvolnit proteiny obsažené v buněčném jádře, cytosolu a v dalších buněčných organelách do roztoku, který se dále analyzoval.

V buněčných lyzátech bylo nutné před elektroforetickou separací stanovit množství obsažených proteinů za využití BCA zkoušky (metoda s kyselinou bicinchoninovou, BCA Protein Assay Kit, Milipore) založené na vazbě měďnatých proteinů na peptidovou vazbu. Zkoušku jsme prováděli v 96jamkové průhledné destičce (TPP) (Tabulka 7 a Obrázek 11), do které jsme nanесли destilovanou vodu jako blank, koncentrační řadu standardů (Protein Standard, Sigma-Aldrich) (Tabulka 6), zlyzované a desetkrát naředěné vzorky v tripletu. Do každé jamky jsme přidali 200 µl pracovního roztoku (WS) obsahující roztok síranu měďnatého a roztok kyseliny bicinchoninové v poměru 1:50.

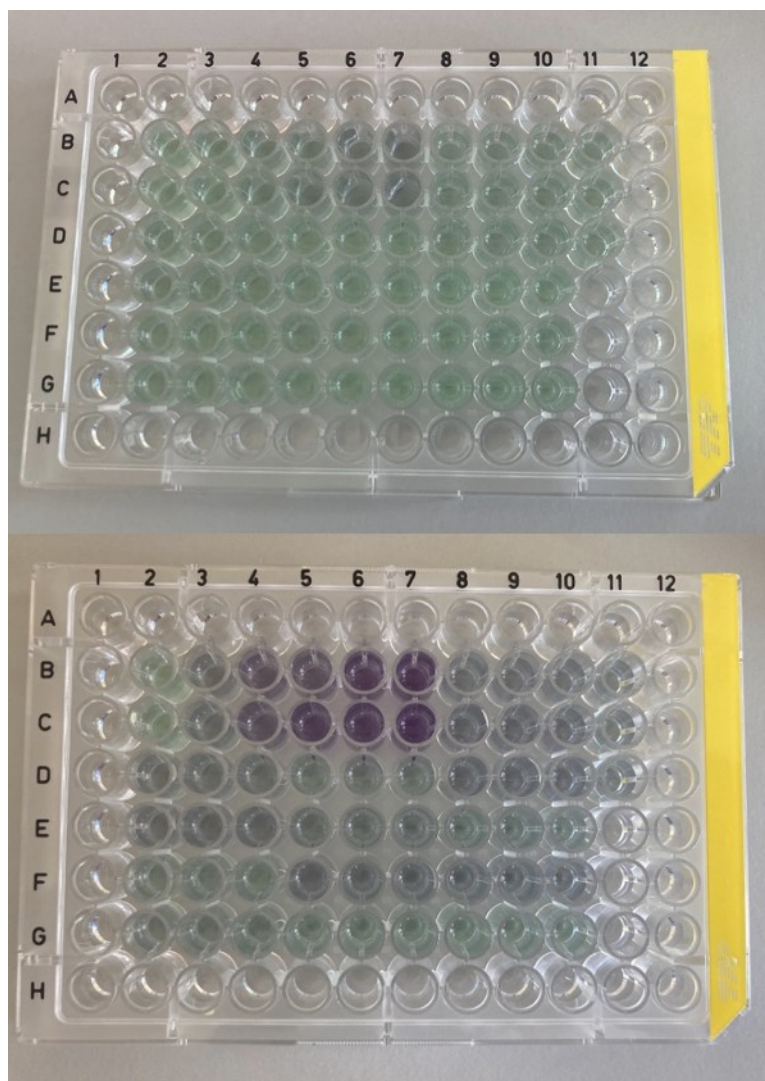
Tabulka 6 Koncentrační řada standardů s proteiny

	protein standard [μl]	destilovaná voda [μl]	WS [μl]
S1	0	10	200
S2	2	8	200
S3	4	6	200
S4	6	4	200
S5	8	2	200
S6	10	0	200

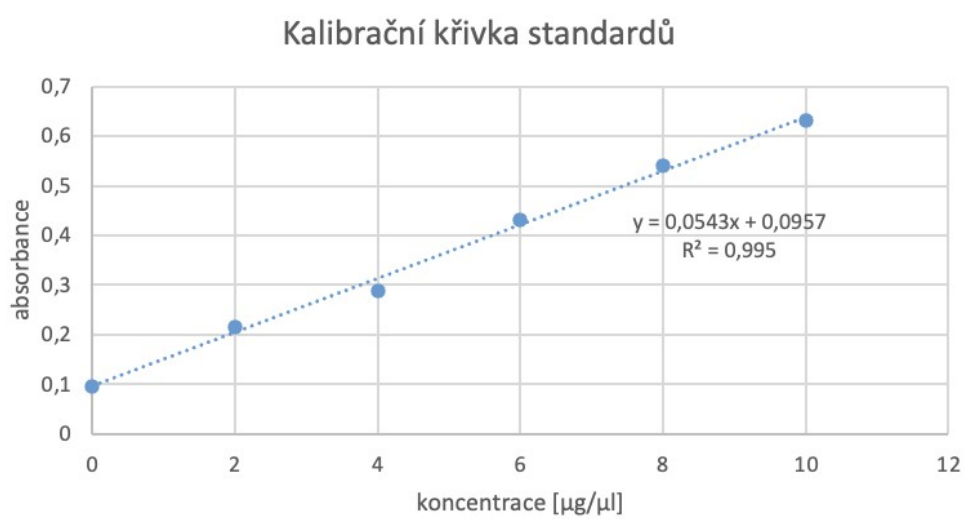
Tabulka 7 Schéma destičky se vzorky a standardy pro stanovení bílkoviny (1-15 vzorky, S1-S6 standardy)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	S1	S2	S3	S4	S5	S6	1	1	1	15	H ₂ O
C	H ₂ O	S2	S2	S3	S4	S5	S6	2	2	2	15	H ₂ O
D	H ₂ O	3	3	3	4	4	4	5	5	5	15	H ₂ O
E	H ₂ O	6	6	6	7	7	7	8	8	8	H ₂ O	H ₂ O
F	H ₂ O	9	9	9	10	10	10	11	11	11	H ₂ O	H ₂ O
G	H ₂ O	12	12	12	13	13	13	14	14	14	H ₂ O	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Destičku jsme 30 minut inkubovali při 37 °C a poté proměřili absorbanci při 562 nm. Z výsledných hodnot jsme vytvořili kalibrační křivku, ze které se odečetla koncentrace proteinů v $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pro jednotlivé vzorky (Obrázek 12). Cílem měření bylo určit objem, který je potřeba nanést na gel, aby bylo ve všech analyzovaných vzorcích v průběhu elektroforézy stejné množství proteinů 20 μg .



Obrázek 11 Stanovení proteinů, připravené vzorky před inkubací (nahore) a vzorky po inkubaci (dole)



Obrázek 12 Kalibrační křivka pro výpočet obsahu proteinu ve vzorku

5.5.3 Stanovení proteinů

Pro separaci a následnou imunodetekci proteinů přítomných v buňce jsme využili gelovou elektroforézu (SDS PAGE) a western blot v zařízení Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad. Stanovení jsme prováděli u následujících proteinů: Akt, pAkt, Erk, pErk, Bcl-2, aktin.

Pro separaci proteinů jsme si připravili rozdělovací gely s 12% obsahem akrylamidu. Dle rozpisu jsme smíchali destilovanou vodu, rozdělovací pufr o koncentraci 1,5M TRIS-HCl a pH 8,8, roztok akrylamidu, dodecylsírany sodného, amonium persulfátu (APS) a tetramethylethyldiaminu (TEMED). Hotový roztok se pipetou nalil do skel umístěných ve stojácích a převrstvil se 650 μ l sekundárního butanolu.

Po zpolymerování roztoku působením polymeračních činidel APS a TEMED jsme si připravili zaostřovací gel se 4% obsahem akrylamidu. Použité komponenty byly stejné jako v případě rozdělovacího gelu, jen pufr jsme použili 0,5 mM TRIS-HCl o pH 6,8. Butanol jsme ze skel vymyli, nalili zaostřovací gel a vložili 10jamkový hřebínek pro vytvoření nanášecích jamek.

Každý připravený lyzát jsme smíchali v poměru 1:2 se vzorkovým pufrem obsahujícím β -merkptoethanol a bromfenolovou modř. β -merkptoethanol rozrušil disulfidické můstky ve struktuře proteinu a došlo tak k denaturaci. Připravené vzorky se nechali 5 minut v termobloku při 95 °C, promíchali se a krátce se stočili na centrifuze.

Sestavili jsme zařízení pro elektroforézu Protean a zleva jsme postupně nanasly do jamek v gelu vzorky. Začalo se kontrolou a do poslední jamky vpravo se nanasl marker molekulové hmotnosti (Kaleidoskop Prestained Protein Standards, BioRad). Do každé jamky se nanášel objem vzorku, který odpovídal 20 mikrogramům celkové bílkoviny, tak jak bylo stanoveno pomocí BCA zkoušky.

Po nanesení všech vzorků se do komory a vnějšího prostoru zařízení nalil Running pufr, Protean se přiklopil, zapojil do zdroje a spustila se elektroforéza s nastaveným napětím 200 V a proudem 0,24 A trvající 50 minut za chladu.

Mezitím jsme připravili a aktivovali Immun-Blot® PVDF (polyvinyliden difluorid) membrány (BioRad). Na membrány se vyznačilo číslo pokusu, datum a číslo membrány. Po označení jsme membrány 1 minutu aktivovali ve 100% methanolu a pak třikrát promývali v transfer pufu s 20% obsahem methanolu.

Během elektroforézy došlo k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Malé proteiny se akrylamidovým gelem pohybovaly rychleji, velké pomaleji. Proteiny se následně

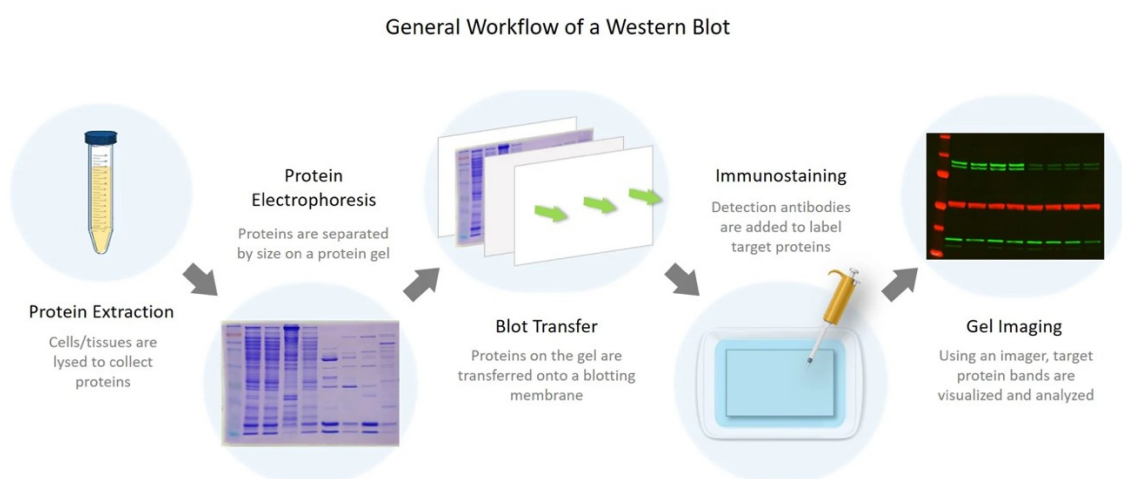
během western blotu přenesly ze struktury gelu na povrch membrány. Na western blot se sestavily blotovací kazety, do kterých se vložila vycpávka, filtrační papír, gel a na něj se položila příslušná membrána. Kazety se zasunuly do stojanů, které se připojily ke zdroji. Nastavilo se napětí 100 V, proud 0,35 A a gely se nechaly blotovat za chladu 120 minut.

Membrány s proteiny se po western blotu (Obrázek 13) blokovaly v 10 % mléce smíchaném s TBS-Tween 0,1 % pufrém, aby se primární protilátka nenavázala na nespecifická místa, ale pouze na detekované proteiny.

Primární protilátky proti stanovovaným proteinům se smíchali s 5 % mlékem nebo 5 % BSA v TBS-Tween 0,1 % pufru v eppendorf zkumavce ve stanoveném poměru. Akt (CST #9272, 1:1 000), pAkt (CST #2965, 1:1 000), ERK (CST #4695 1:1 000), pERK (CST #4376, 1:1 000), Bcl-2 (CST #15071 1:500) actin (SigmaAldrich #A5312 1:20 000).

Membrány jsme vložili po jedné do kapsiček připravených z parafilmu, přidali jsme na 1 membránu 1 ml roztoku s primární protilátkou a zatavené kapsičky se přes noc nechaly třepat za chladu při 4 °C.

Po hodinovém promytí (TBS-Tween a TBS) se membrány 1 hodinu inkubovaly při pokojové teplotě se sekundární protilátkou (DAKO). Ta se použila podle primární buď anti-myší nebo anti-králičí v daném poměru (1:1 000) v 5 % mléce v TBS-Tween 0,05 % pufru. Po inkubaci se sekundární protilátkou jsme membrány opět 1 hodinu promývali.



Obrázek 13 Metoda western blotting (Biocompare)

Použité sekundární protilátky byly konjugované s křenovou peroxidázou (HRP), proto byl pro vizualizaci proteinů zájmu použitý systém chemiluminiscenční detekce. V čas potřeby jsme si

připravili ECL roztok (Roche) smícháním složek v poměru 1:100, v celkovém objemu 1 ml na membránu. Po jednodominutové inkubaci byl chemiluminiscenční signál po dobu 20 minut zaznamenáván na ECL kameru (Syngene). Každá z membrán byla poté znovu inkubována s primární protilátkou proti β -aktinu. Tento protein sloužil jako potvrzení shodné nanášky do jamek gelu. Pro zhodnocení změn v proteinové expresi se připravili 3 nezávislé lyzáty pro každý vzorek a provedla se alespoň tři elektroforetická stanovení.

5.6 Statistické vyhodnocení dat

Všechny pokusy byly prováděny alespoň ve třech nezávislých opakováních.

5.6.1 Stanovení kaspáz

Ze tří jamek obsahujících stejnou koncentraci testovaného inhibitoru jsme vypočítali průměr, od kterého jsme odečetli průměrnou hodnotu blanku. Výsledná hodnota se převedla na procenta vztažená k negativní kontrole, která byla nastavena jako 100 %. Tímto způsobem jsme ze tří nezávislých opakování získali tři hodnoty, z nich vypočítali průměr a směrodatnou odchylku. Statistickou analýzu jsme prováděli pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu s hladinou významnosti $p < 0,05$ v aplikaci Microsoft Excel.

5.6.2 Mikroskopie

Z každé jamky jsme nasníмали 3 zorná pole v případě mikroskopie v průchozím světle, resp. 8 polí v případně fluorescenční mikroskopie. Reprezentativní výřezy jsme použili pro tvorbu koláží pomocí ImageJ (NIH).

5.6.3 Stanovení proteinové exprese

Pro stanovení změn v proteinové expresi jsme nejprve připravili biologické triplikáty, tři kompletní sady lyzátů, které jsme získali opakováním experimentu na buňkách. Z lyzátů jsme potom prováděli elektroforézu a western blotting tak, abychom pro každý protein měli alespoň tři stanovení. Předkládané obrázky představují reprezentativní bloty z výše uvedených stanovení.

6 VÝSLEDKY

6.1 Aktivita kaspáz

Cílem měření aktivity efektorových kaspáz 3 a 7 bylo stanovit, do jaké míry podléhají leukemické buněčné linie THP-1, MOLM-13 a MV-4-11 apoptóze po působení Flt3 inhibitoru K1872.

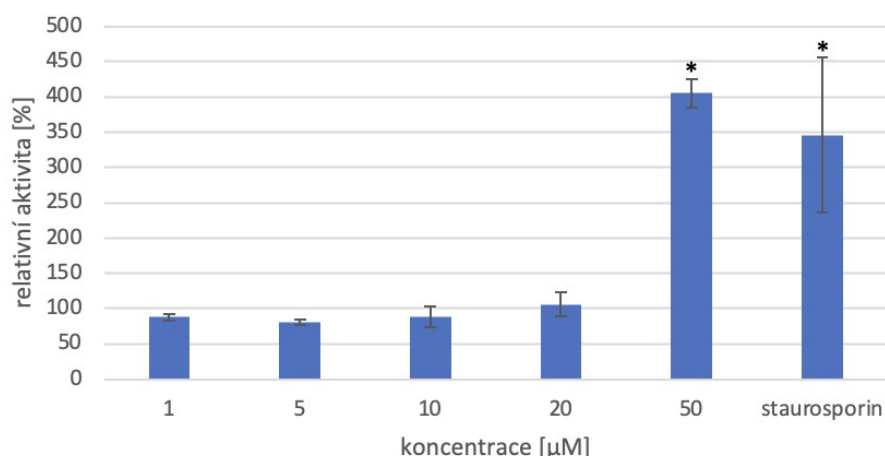
Buňky byly 24 hodin inkubovány s látkou K1872 v koncentraci 1, 5, 10, 20 a 50 μM . Jako negativní kontrolu jsme použili DMSO, které v použité koncentraci 0,1 % buněčnou proliferaci neovlivňuje. Tato negativní kontrola odpovídala 100 % aktivitě kaspáz. Jako pozitivní kontrolu jsme použili staurosporin, známý induktor apoptózy, v koncentraci 1 μM . Na závěr inkubace jsme proměřili luminiscenci štěpného produktu, který vzniká v přítomnosti aktivních kaspáz 3 a 7. Prováděli jsme tři na sobě nezávislá opakování. Luminiscence měřená přístrojem Tecan Spark je metoda ovlivnitelná vnějšími podmínkami, proto se mohly hodnoty mezi jednotlivými opakováními mírně lišit. Stanovovanou míru apoptózy buněk jsme proto vyjádřili procentuálně. Pokud hodnoty překročily 100 %, docházelo ke zvýšení aktivaci kaspáz a k indukci apoptózy. Obecně u všech tří zkoumaných buněčných linií dochází se stoupající koncentrací inhibitoru K1872 k aktivaci kaspáz 3 a 7 a buňky podléhají apoptóze. V čem se jednotlivé linie liší, je dynamika procesu a míra aktivity kaspáz.

U buněk THP-1 s funkční kinázou Flt3 bez mutace dochází k aktivaci kaspáz až při působení nejvyšší zkoumané koncentrace (50 μM). V nižších koncentracích se aktivita sledovaných kaspáz oproti kontrolním buňkám nezvyšuje, naopak pozorujeme mírný pokles. Ten může být způsobený inhibicí proliferace a tím pádem nižším počtem buněk přítomných ve vzorku. Zvýšení aktivity sledovaných kaspáz po 50 μM koncentraci je výrazně signifikantní (Tabulka 8 a Obrázek 14).

Tabulka 8 Aktivita kaspáz u linie THP-1

%	DMSO	K1872 1 μM	K1872 5 μM	K1872 10 μM	K1872 20 μM	K1872 50 μM	stau 1 μM
1.opakování	100	86	80	78	94	423	487
2.opakování	100	94	86	109	130	378	217
3.opakování	100	83	77	78	93	416	334
průměr	100	88	81	88	106	406	346
sm. odch.	0	6	5	18	21	24	135

Aktivita kaspáz 3/7 THP-1

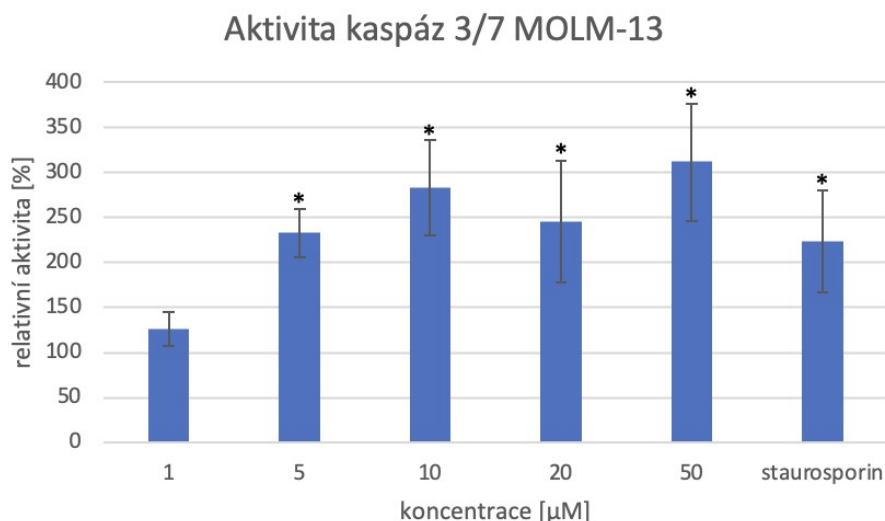


Obrázek 14 Stanovení aktivity kaspáz 3 a 7 po 24hodinovém působení inhibitoru K1872 u buněk THP-1. Statistická analýza prováděná pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu a $*p < 0,05$.

Buněčná linie MOLM-13 nesoucí Flt3-ITD mutaci kinázy podléhá apoptóze po ovlivnění již nízkými koncentracemi inhibitoru. U koncentrace 1 µM je vzestup pouze mírný, ale s rostoucí koncentrací K1872 roste i aktivita kaspáz a u všech vyšších koncentrací (5, 10, 20 a 50 µM) se jedná o signifikantní nárůst aktivity (Tabulka 9 a Obrázek 15).

Tabulka 9 Aktivita kaspáz u linie MOLM-13

%	DMSO	K1872 1 µM	K1872 5 µM	K1872 10 µM	K1872 20 µM	K1872 50 µM	stau 1 µM
1.opakování	100	113	250	344	156	403	277
2.opakování	100	114	196	215	262	260	146
3.opakování	100	152	253	290	318	271	249
průměr	100	126	233	283	245	311	224
sm. odch.	0	22	32	65	82	80	69

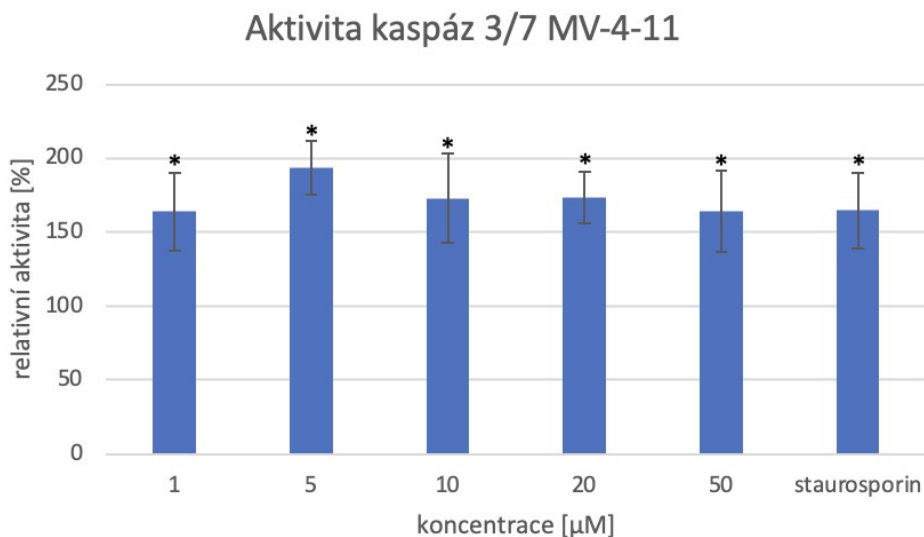


Obrázek 15 Stanovení aktivity kaspáz 3 a 7 po 24hodinovém působení inhibitoru K1872 u buněk MOLM-13. Statistická analýza prováděná pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu a $*p < 0,05$.

Mutaci Flt3-ITD nesou stejně tak buňky MV-4-11, u kterých dochází podobně jako u MOLM-13 k aktivaci kaspáz již po působení koncentrace 1 μM s tím rozdílem, že je nárůst aktivity významný i u nejnižší koncentrace, a se stoupající koncentrací inhibitoru se aktivita kaspáz již dále významně nezvyšuje. Po ovlivnění nejvyšší koncentrací 50 μM je hodnota luminiscenčního signálu podobná hodnotě u 1 μM koncentrace (Tabulka 10 a Obrázek 16).

Tabulka 10 Aktivita kaspáz u linie MV-4-11

%	DMSO	K1872 1 μM	K1872 5 μM	K1872 10 μM	K1872 20 μM	K1872 50 μM	stau 1 μM
1.opakování	100	139	213	215	198	203	154
2.opakování	100	152	170	161	162	152	140
3.opakování	100	201	198	143	161	138	200
průměr	100	164	194	173	174	164	165
sm. odch.	0	33	22	38	21	34	31

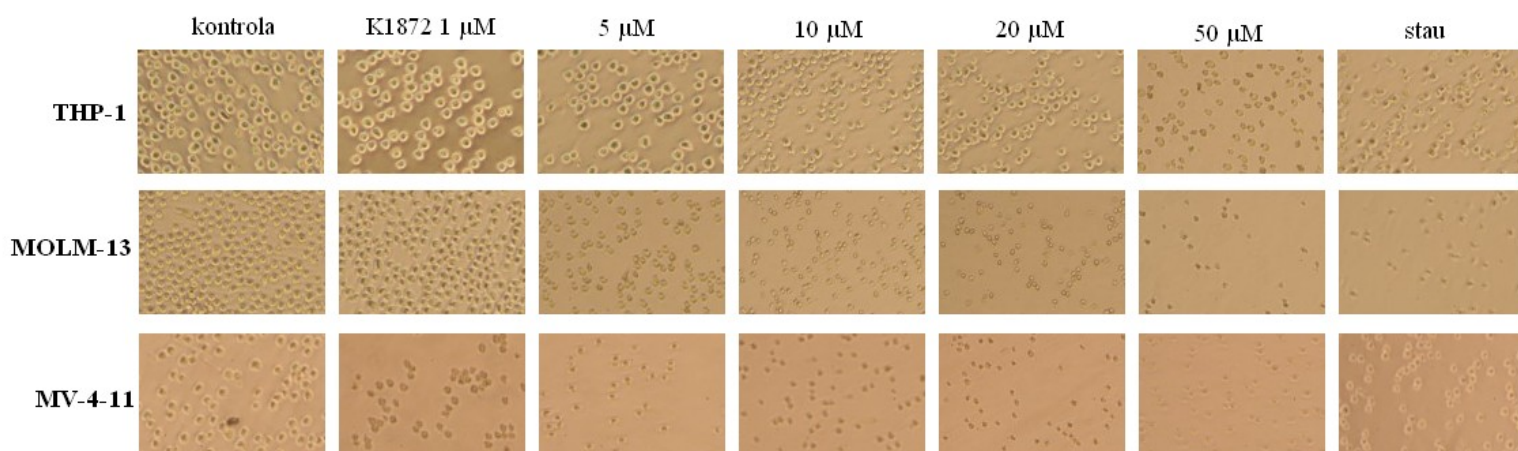


Obrázek 16 Stanovení aktivity kaspáz 3 a 7 po 24hodinovém působení inhibitoru K1872 u buněk MV-4-11. Statistická analýza prováděná pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu a $*p < 0,05$.

6.2 Mikroskopie buněk

6.2.1 Mikroskopie v průchozím světle

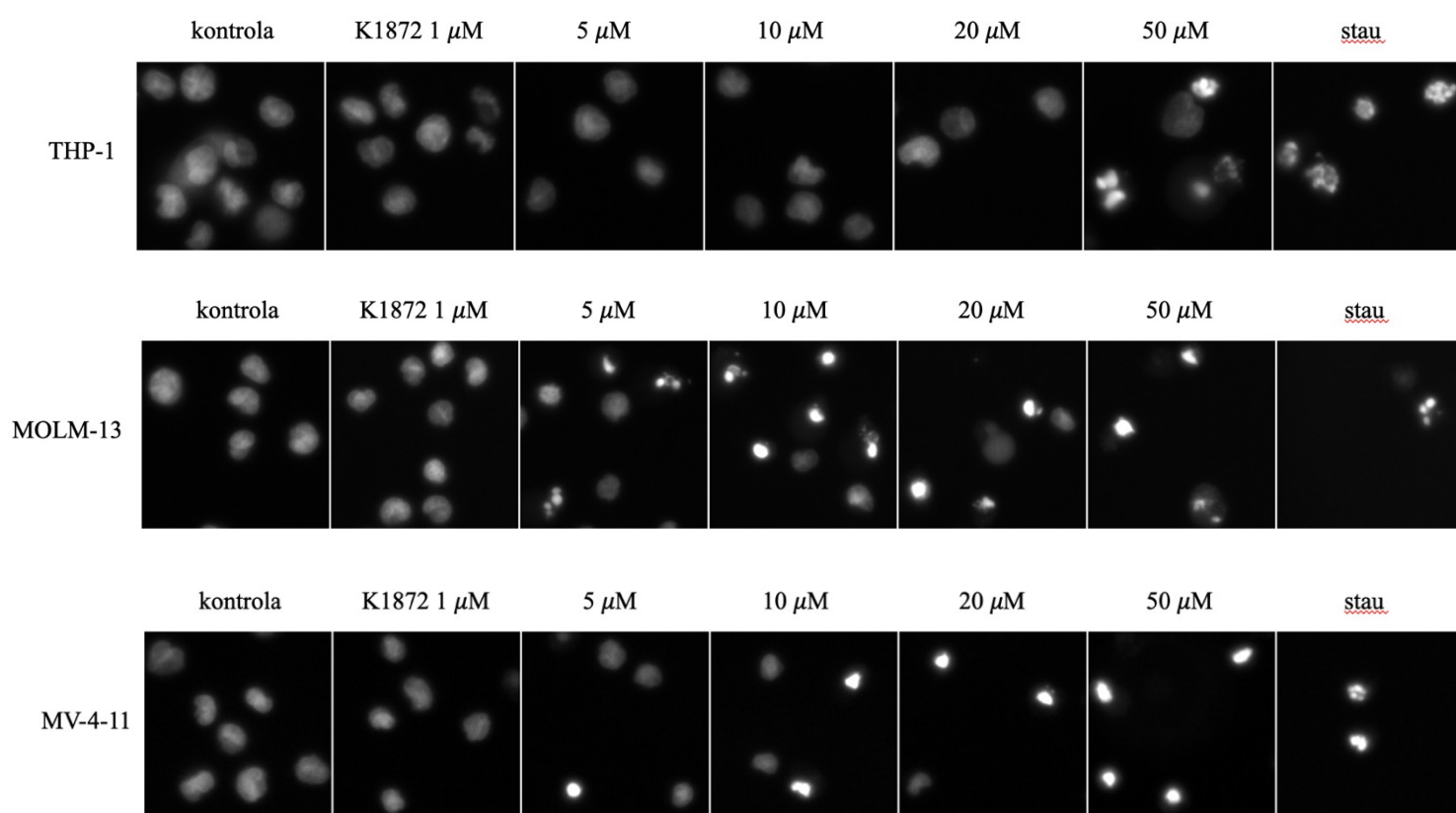
Pozorování buněk vyfocených pod mikroskopem odpovídalo trendu pozorovanému po změření aktivity kaspáz pomocí luminiscence. Se stoupající koncentrací inhibitoru K1872 bylo na snímcích pořízených pod mikroskopem vidět, že buněk ubývalo, měnily tvar, a že inhibitor K1872 negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci (Obrázek 17).



Obrázek 17 Proliferace buněk 24 hodin po ovlivnění inhibitorem K1872 v rostoucích koncentracích

6.2.2 Fluorescenční značení jader

Na kontrolních snímcích je jader více, jsou celistvá a velká. S rostoucí koncentrací inhibitoru je u všech tří buněčných linií patrný pokles počtu buněk a objevují se viditelná apoptotická jádra, která jsou menší, svrašťelá s kondenzovaným chromatinem až rozpadající se na fragmenty (Obrázek 18). Trend v navození apoptózy odpovídá indukci efektorových kaspáz. Buňky THP-1 s wt-Flt3 jsou relativně rezistentní, svrašťelá apoptotická jádra se u nich objevují až při použití nejvyšší koncentrace 50 μM . Naopak v případě buněk MOLM-13 a MV-4-11 s mutovanou Flt3 kinázou pozorujeme kondenzaci jaderného chromatinu již při nižších koncentracích (5 μM), což opět odpovídá aktivitě sledovaných kaspáz.



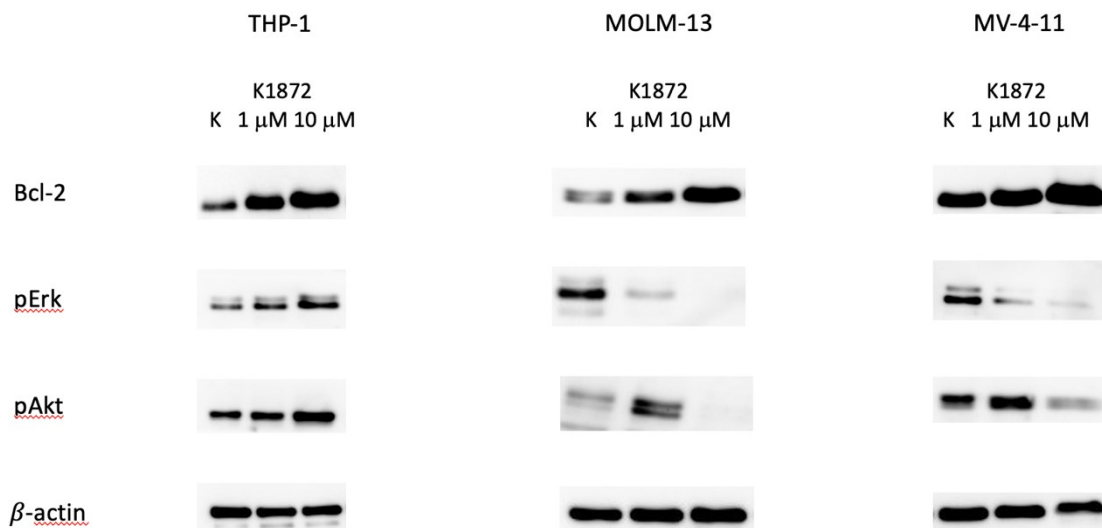
Obrázek 18 Apoptotická jádra 24 hodin od ovlivnění Flt3 inhibitorem K1872

6.3 Stanovení proteinů

Cílem stanovení bylo zjistit, jak se změní proteinová exprese v leukemických buňkách po ovlivnění zkoumaným Flt3 inhibitorem K1872. Z elektroforeticky stanovovaných proteinů se podařilo získat výsledky u Bcl-2, pAkt a pErk.

Buněčná linie THP-1 s funkční Flt3 kinázou po ovlivnění inhibitorem K1872 v koncentracích 1 a 10 μM vykazuje zvýšenou expresi antiapoptotických a proliferačních proteinů Bcl-2, pErk a pAkt. Buňky tedy ve zvýšené míře proliferují a brání se apoptotickým procesům, což v použitých koncentracích odpovídá výsledkům aktivace kaspáz.

Buňky MOLM-13 a MV-4-11, které nesou mutaci kinázy Flt3, vykazují podobný trend u všech tří zkoumaných proteinů. Exprese proteinu Bcl-2 stejně jako u linie THP-1 roste. Jeho působení není přímo závislé na aktivaci Flt3 kinázy a po ovlivnění inhibitorem K1872 nedochází k jeho inhibici. Naopak exprese pAkt a pErk s rostoucí koncentrací K1872 klesá a dochází ke zpomalení proliferace leukemických buněk (Obrázek 19).



Obrázek 19 Expresa proteinů Bcl-2, pErk a pAkt u buněčných linií THP-1, MOLM-13 a MV-4-11 po působení inhibitoru K1872

7 DISKUZE

Agresivita a genetická heterogenita nemoci, toxicita chemoterapie, nízká doba přežití a vysoké riziko relapsu byly impulsem pro vývoj nové, cílené terapie. Mutovaná Flt3 kináza je nejčastější genetickou aberací u pacientů s AML a objevení prvních inhibitorů mělo zásadní vliv na rozvoj terapie AML. Cílená terapie, pokud je součástí kombinované léčby, snižuje riziko nežádoucích účinků cytotoxických léčiv a řeší nemožnost použití intenzivní chemoterapie u většiny pacientů starších 60-65 let. Inhibice Flt3 kinázy exprimované ve zvýšené míře na leukemických blastech a výskyt mutací má význam z hlediska snížení rizika relapsu a zlepšení prognózy nemocných. Cílem výzkumu je nalezení látek, které po vazbě na Flt3 kinázu zabrání samovolné nekontrolovatelné aktivaci a následně zpomalí proliferaci a navodí apoptózu leukemických buněk.

Vliv zkoumaného Flt3 inhibitoru K1872 na proliferaci byl hodnocen na leukemických buňkách exprimujících Flt3 kinázu s přítomnou mutací (MOLM-13 a MV-4-11) a na buňkách s Flt3 bez mutace (THP-1) v koncentracích 1 – 50 μM . U buněk s Flt3-ITD mutací bylo zřejmé významné navození apoptózy již v nízkých koncentracích inhibitoru, naopak u buněk s funkční Flt3 kinázou k ní dochází až v nejvyšší použité koncentraci. Podobný jev byl pozorován u prvního v praxi používaného inhibitoru midostaurinu (PKC412, CGP41251), který byl zkoumán nejprve na buněčné linii Ba/F3 (interleukin-3 dependent murine pro-B cells) s Flt3-ITD mutací. Ke stanovení vlivu midostaurinu na inhibici proliferace byla využita fluorescenční metoda (Annexin V) a následně průtoková cytometrie, která detekovala indukci apoptózy. Po 24hodinové inkubaci s midostaurinem v koncentracích 0,01 – 1 μM došlo již u nejnižších použitých koncentrací k indukci apoptózy a počet buněk se s rostoucí koncentrací blížil nule. Stejně tak byl midostaurin zkoumán u buněk Ba/F3 bez Flt3-ITD, kde k významné inhibici proliferace docházelo až u koncentrace 0,5 μM (Weisberg *et al.* 2002). Účinnost u buněk s přítomnou mutací Flt3 byla až desetkrát vyšší (Pratz *et al.* 2010). Během dalších prováděných studií byl midostaurin zkoumán pomocí fluorescenčních metod na buněčných liniích MV-4-11 a MOLM-13, u kterých došlo po jeho působení v nanomolárních koncentracích k inhibici proliferace (EMA 2017).

Výsledky hodnocení exprese proteinů pErk a pAkt se stejně jako míra navozené apoptózy lišily u linie THP-1 bez Flt3 mutace a u linií MOLM-13 a MV-4-11 s Flt3-ITD mutací. U buněk THP-

1 byly tyto proteiny po působení K1872 exprimovány ve zvýšené míře. U linií MOLM-13 a MV-4-11 se po inhibici Flt3 kinázy inhibitorem K1872 exprese proteinů pErk a pAkt snížila a v důsledku inhibice proproliferčních drah došlo ke zpomalení růstu buněčné populace. Protein Bcl-2 byl u všech tří linií po působení inhibitoru exprimován ve zvýšené míře.

Stejnou metodou, která byla použita v této diplomové práci, byl zkoumán vliv midostaurinu na změnu proteinové exprese u linie Ba/F3 s mutovanou Flt3 kinázou. V koncentracích nižších než 1 μ M inhiboval midostaurin v buňkách s Flt3-ITD mutací fosforylaci proteinu Erk. (Barry *et al.* 2007) Naopak na expresi proteinu Bcl-2 neměl midostaurin u Ba/F3 Flt3-ITD pozitivních buněk významný vliv (Weisberg *et al.* 2007). Exprese proteinu pAkt po inkubaci s midostaurinem byla zkoumána u leukemické buněčné linie MOLM-14 s Flt3-ITD mutací. Stejně jako pErk, byl pAkt exprimován na buňkách ve snížené míře (Weisberg *et al.* 2013).

Výsledky zkoumání během vypracovávání této diplomové práce vykazují stejný trend jako výsledky získané během preklinického hodnocení registrovaného Flt3 inhibitoru midostaurinu. Midostaurin je jako inhibitor první generace účinný kromě Flt3 kinázy na několik dalších kináz (PDGFR, KIT, SRC). To je z hlediska rizika vedlejších účinků nežádoucí a v současnosti výzkum cílí především na selektivitu inhibitorů (Daver *et al.* 2021).

Inhibitor K1872 byl hodnocen na buněčných liniích, které vykazují pouze mutaci Flt3-ITD (MOLM-13, MV-4-11). Pro zjištění vlivu K1872 na mutaci Flt3-TKD a její podtypy je nutný další výzkum na jiných leukemických buněčných liniích.

Problémem u Flt3 inhibitorů testovaných v minulých letech je objevující se primární či sekundární rezistence buněk AML. Během klinických studií, kdy byly Flt3 inhibitory podávány pacientům s AML jako monoterapie, nebyl prokázán jejich dlouhotrvající účinek na snížení proliferace leukemických blastů, ačkoli během jejich testování na buněčných kulturách vykazovaly silný proapoptotický efekt. Objevení rezistence k léčbě bylo impulsem pro preklinické a klinické hodnocení citlivosti Flt3 inhibitorů k Flt3 kináze s přítomnou mutací. V současnosti je známo několik mechanismů, kterými dochází ke vzniku rezistence. Při klinickém testování nových inhibitorů je nutné zejména v případě selhání terapie, i přes získání slibných výsledků z preklinického hodnocení, vyhodnotit možnosti vzniku rezistence známými mechanismy a na základě výsledků optimalizovat terapii (Daver *et al.* 2021). Pochopení mechanismů rezistence bylo dále klíčové právě pro stanovení kroků, které by měly vést k redukci či odstranění rezistence. Jednou ze strategií, jak předcházet rezistenci k Flt3

inhibitorům, je jejich kombinace s cytotoxickými léčivy, nebo kombinace s léčivy cílicími na jiné molekuly či signální dráhy v leukemických blastech (inhibitory mTOR, Bcl-2, HSP90) (Zhou a Chng 2018).

8 ZÁVĚR

Předmětem výzkumu nových látek využitelných v terapii akutní myeloidní leukemie jsou v posledních letech zejména molekuly cílící na konkrétní struktury typické pro nádorově transformované buňky. Cílená terapie nejen že zvyšuje účinnost léčby, prodlužuje dobu přežití pacientů a snižuje riziko relapsu, ale také snižuje četnost nežádoucích účinků vyplývajících z cytotoxického působení léčiv na zdravé buňky organismu.

Flt3 kináza, jejíž mutace patří mezi nejčastější genetické odchylky vedoucí k rozvoji nemoci, se stala atraktivním terapeutickým cílem. Toto tvrzení potvrzuje narůstající výzkum nových Flt3 inhibitorů a klinické použití prvních látek u pacientů s diagnózou AML s přítomnou Flt3 mutací, jež vedlo k jejich schválení regulačními autoritami.

Nový Flt3 inhibitor K1872 syntetizovaný v laboratořích Centra biomedicínského výzkumu FNHK zkoumaný metodami uvedenými v této diplomové práci vykazuje vliv na zpomalení proliferace buněčných linií AML a z výsledků zkoumání vyplývá výrazný proapoptotický vliv inhibitoru zejména na leukemické buňky exprimující Flt3 kinázu s přítomnou Flt3-ITD mutací. Rozdíl v antiproliferačním a antiapoptotickém účinku na linii THP-1 s nemutovanou Flt3 kinázou a na linie MOLM-13 a MV-4-11 s mutací Flt3-ITD spočívá v rozdílné efektivní koncentraci a je patrný ze všech prováděných pokusů. Zpomalení proliferace obou mutovaných leukemických linií zjevně souvisí se sníženou expresí proteinů pErk a pAkt pozorovanou po expozici K1872. Tento nový FLT3 inhibitor tak může být považován za potenciální léčivo v terapii AML a je vhodným kandidátem pro další zkoumání protinádorové aktivity *in vitro* a následně *in vivo*.

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, *et al.* Hematologie – Přehled maligních hematologických nemocí. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada Publishing a.s. 2008. ISBN: 9788024767727
2. Adam Z, Vorlíček J. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada Publishing a.s. 2004. ISBN: 9788024708966
3. Antonsson B, Martinou JC. *The Bcl-2 Protein Family*. Experimental Cell Research 2000, 256: 50-57. Dostupné na URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482700948390>, DOI: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4839> Přístup 16.1.2024
4. Barry EV, Clark JJ, Cools J, Roesel J, Gilliland DG. *Uniform sensitivity of FLT3 activation loop mutants to the tyrosine kinase inhibitor midostaurin*. Blood 2007, 110(13): 4476-4479. Dostupné na URL: <https://ashpublications.org/blood/article/110/13/4476/103250/Uniform-sensitivity-of-FLT3-activation-loop>, DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-101238> Přístup 8.4.2024
5. Bhansali RS, Pratz KW, Lai C. *Recent advances in targeted therapies in acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol 2023, 16(29). Dostupné na URL: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-023-01424-6>, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01424-6> Přístup 25.3.2024
6. Carter JL, Hege K, Yang J *et al.* *Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy*. Sig Transduct Target Ther 2020, 5:288. Dostupné na URL: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00361-x>, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00361-x> Přístup 24.3.2024

7. Daver N, Venugopal S, Ravandi F. *FLT3 mutated acute myeloid leukemia: 2021 treatment algorithm*. Blood Cancer J 2021, 11:104. Dostupné na URL: <https://www.nature.com/articles/s41408-021-00495-3>, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00495-3> Přístup 10.4.2024
8. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR *et al*. *Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN*. Blood 2022, 140(12): 1345-1377. Dostupné na URL: <https://ashpublications.org/blood/article/140/12/1345/485817/Diagnosis-and-management-of-AML-in-adults-2022>, DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867> Přístup 30.3.2024
9. Kačírková, P, Campr V. Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada Publishing a.s. 2007. ISBN: 9788024767758
10. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development*. Cancer Sci 2020, 111(2): 312-322. Published online 2019. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7004512/>, DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.14274> Přístup 17.2.2024
11. Ling Y, Zhang Z, Zhang H, Huang Z. *Protein Kinase Inhibitors as Therapeutic Drugs in AML: Advances and Challenges*. Current Pharmaceutical Design 2017, 23(29): 4303-4310. Dostupné na URL: https://www.researchgate.net/publication/318151136_Protein_Kinase_Inhibitors_as_Therapeutic_Drugs_in_AML_Advances_and_Challenges#pf5, DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612823666170703164114> Přístup 20.4.2024
12. Martini M, De Santis MCH, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. *PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review*. Annals of Medicine 2014, 46(6): 372-383. Dostupné na URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07853890.2014.912836>, DOI: <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.912836> Přístup 16.1.2024

13. Meshinchi S, Appelbaum FR. *Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia*. Clin Cancer Res 2009, 15(13): 4263-4269. Dostupné na URL: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/15/13/4263/73616/Structural-and-Functional-Alterations-of-FLT3-in>, DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1123> Přístup 17.2.2024
14. Nicholson KM, Anderson NG. *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular Signalling 2002, 14(5): 381-395. Dostupné na URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0898656801002716?via%3Dihub>, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00271-6](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00271-6) Přístup 16.1.2024
15. Park S, Chapuis N, Tamburini J *et al.* *Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia*. Haematologica 2010, 95(5): 819-828. Published online 2009. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864389/>, DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013797> Přístup 16.1.2024
16. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkova T, Levis M. *FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML*. Blood 2010, 115(7): 1425-1432. Published online 2009. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2826764/>, DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-242859> Přístup 6.4.2024
17. Ramos JW. *The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells*. Int J Biochem Cell Biol 2008, 40(12): 2707-2719. Dostupné na URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272508001933>, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.04.009> Přístup 16.1.2024
18. Rauscher FJ. Molecular Oncology. 2014. ISBN: 9780521876629
19. Song MK, Park BB, Uhm JE. *Clinical Efficacies of FLT3 Inhibitors in Patients with Acute Myeloid Leukemia*. Int J Mol Sci 2022, 23(20):12708. Dostupné na URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12708>, DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232012708> Přístup 21.3.2024

20. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL *et al.* *Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy.* *Leukemia* 2011, 25: 1080-1094. Dostupné na URL: <https://www.nature.com/articles/leu201166>, DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2011.66>
Přístup 16.1.2024
21. Stone RM, Manley PW, Larson RA, Capdeville R. *Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis.* *Blood Adv* 2018, 2(4): 444-453. Dostupné na URL: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/2/4/444/15859/Midostaurin-its-odyssey-from-discovery-to-approval>, DOI: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011080> Přístup 7.4.2024
22. Wei Y, Cao Y, Sun R *et al.* *Targeting Bcl-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia.* *Front Oncol* 2020, 10:584974. Published online 2020. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7674767/#:~:text=Overexpression%20of%20BCL%2D2%20proteins,novel%20pharmacological%20modulators%20in%20cancer>, DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.584974> Přístup 16.1.2024
23. Weisberg E, Boulton CH, Kelly LM *et al.* *Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412.* *Cancer Cell* 2002, 1(5): 433-443. Dostupné na URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610802000697>, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00069-7) Přístup 4.4.2024
24. Weisberg E, Kung AL, Wright RD *et al.* *Potential of antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: effects on mutant FLT3-expressing cells.* *Mol Cancer Ther* 2007, 6(7): 1951-1961. Dostupné na URL: <https://aacrjournals.org/mct/article/6/7/1951/235877/Potential-of-antileukemic-therapies-by-Smac>, DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0810> Přístup 8.4.2024

25. Weisberg E, Liu Q *et al.* *Selective Akt Inhibitors Synergize with Tyrosine Kinase Inhibitors and Effectively Override Stroma-Associated Cytoprotection of Mutant FLT3-Positive AML Cells.* PLOS ONE 2013, 8(2):e56473. Dostupné na URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056473>, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056473> Přístup 8.4.2024
26. Yang X, Wang J. *Precision therapy for acute myeloid leukemia.* J Hemat Oncol 2018, 11(3). Dostupné na URL: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0543-7>, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0543-7> Přístup 25.3.2024
27. Zhao J, Agarwal S, Ahmad H, Amin K, Bewersdorf JP, Zeidan A. *A Review of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia.* Blood Rev 2022, 52:100905. Published online 2021. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9846716/>, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100905> Přístup 9.4.2024
28. Zhou J, Chng WJ. *Resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Molecular mechanisms and resensitizing strategies.* World J Clin Oncol 2018, 9(5): 90-97. Published online 2018. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6153124/>, DOI: <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i5.90> Přístup 10.4.2024

10 Elektronické zdroje

29. AddexBio. *MOLM-13*. Cat #: C0003003. 2012. Dostupné na URL: <https://www.addexbio.com/productdetail?pid=60> Přístup 13.5.2024
30. ATCC. *MV-4-11 – CRL-9591*. 2024. Dostupné na URL: <https://www.atcc.org/products/crl-9591> Přístup 13.5.2024
31. ATCC. *THP-1 – TIB-202*. 2024. Dostupné na URL: <https://www.atcc.org/products/tib-202> Přístup 13.5.2024
32. Česká hematologická společnost. Červená kniha – Léčebné postupy v hematologii. *Akutní myeloidní leukemie* (verze 02-2024). Dostupné na URL: https://www.hematology.cz/wp-content/uploads/2024/02/03-Akutni_myeloidni_leukemie-verze-02-2024.pdf Přístup 23.3.2024
33. EMA. *Rydapt: EPAR – Summary for the public*. Medicines, Rydapt. 2017. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/rydapt-epar-public-assessment-report_en.pdf Přístup 6.4.2024
34. EMA. *Rydapt*. Medicines. 2023. Dostupné na URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt> Přístup 21.3.2024
35. EMA. *Vanflyta*. Medicines. 2023. Dostupné na URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vanflyta-0> Přístup 21.3.2024
36. EMA. *Xospata*. Medicines. 2023. Dostupné na URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xospata> Přístup 21.3.2024
37. FDA. *Midostaurin*. Drugs. 2017. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/midostaurin> Přístup 21.3.2024

38. FDA. *FDA approves new combination treatment for acute myeloid leukemia*. 2018. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-combination-treatment-acute-myeloid-leukemia> Přístup 21.3.2024
39. FDA. *FDA approves gilteritinib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) with FLT3 mutation*. Drugs. 2018. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation> Přístup 21.3.2024
40. FDA. *FDA approves quizartinib for newly diagnosed acute myeloid leukemia*. Drugs. 2023. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-quizartinib-newly-diagnosed-acute-myeloid-leukemia> Přístup 21.3.2024
41. Chang CC, Kuzu A. *What's new in AML Classification (WHO 2022 vs International Consensus Classification)*. College of American Pathologists 2023. Dostupné na URL: <https://www.cap.org/member-resources/articles/whats-new-in-aml-classification-who-2022-vs-international-consensus-classification> Přístup 30.3.2024
42. Kristo F, Merinopoulou E, Radhakrishnan, A, Joseph C, Dalal M. *Global Incidence and Survival of Acute Myeloid Leukemia with 20-29% Blasts: A systematic Literature Review*. Virtual ISPOR Europe 2021. Poster POSA179. Dostupné na URL: https://www.ispor.org/docs/default-source/euro2021/global-epi-of-amlispor-eu-posterfinal-version20211104-pdf.pdf?sfvrsn=8cbaa495_0#:~:text=Incidence%20of%20AML,-Incidence%20was%20reported&text=The%20most%20recent%20age%20Dadjusted,regional%20estimates%20showed%20considerable%20variation Přístup 24.3.2024
43. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. *Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ)*. 2024. Dostupné na URL: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/adult-aml-treatment-pdq> Přístup 30.3.2024

44. Promega. Caspase-Glo® 3/7 Assay. G8090. 2023. Dostupné na URL:
https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090 Přístup 13.5.2024
45. Rockland Immunochemicals, Inc. *Apoptosis Pathway Antibodies*. Dostupné na URL:
<https://www.rockland.com/resources/apoptosis-pathway-antibodies/> Přístup 21.3.2024
46. Rockland Immunochemicals, Inc. *AKT/PI3K Signaling Pathway*. Dostupné na URL:
<https://www.rockland.com/resources/akt-pi3k-signaling-pathway/> Přístup 21.3.2024
47. Rockland Immunochemicals, Inc. *MEK-ERK Pathway Antibodies*. Dostupné na URL:
<https://www.rockland.com/resources/mek-erk-pathway-antibodies/> Přístup 21.3.2024
48. Šálek C. Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* 2012; 14(10): 366-372. Dostupné na URL:
<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/10/05.pdf> Přístup 29.1.2024
49. Zatloukalová S, Azeem K, Čerňan M, Holý O. *Epidemiologie, rizikové faktory a možnosti prevence akutních leukemií*. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 2021, 3. Dostupné na URL: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2021-3-20/epidemiologie-rizikove-factory-a-moznosti-prevence-akutnich-leukemii-128264>
Přístup 24.3.2024