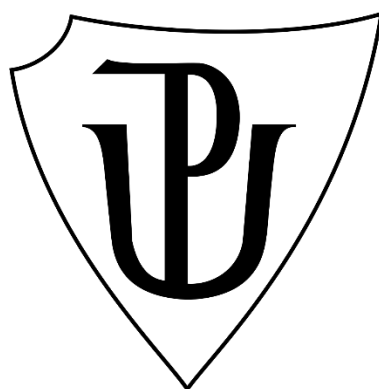


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Buněčné účinky nového imidazopyridazinového
inhibitoru onkogenní kinasy FLT3-ITD**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Monika Kinnertová
Studijní program:	B0512A130008 - Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 9.5.2023

Monika Kinnertová

Děkuji mé vedoucí práce, Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady a obrovskou ochotu mi vždy pomoci. Děkuji také všem ostatním členům laboratoře za rady, pomoc a milou společnost při práci v laboratoři. Poděkování patří také prof. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. a Katedře experimentální biologie za možnost vypracovat mou bakalářskou práci na tomto pracovišti.

Bakalářská práce byla podpořena Univerzitou Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2023_012), Grantovou agenturou České republiky (23-05462S) a projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Monika Kinnertová
Název práce	Buněčné účinky nového imidazopyridazinového inhibitoru onkogenní kinasy FLT3-ITD
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra experimentální biologie
Vedoucí práce	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Akutní myeloidní leukemie je stále častěji se vyskytujícím onemocněním. Jednou z jeho příčin je vznik mutace v transmembránovém receptoru FLT3. FLT3 je tyrozinkinasovým receptorem, který je po navázání ligandu fosforylován a následně aktivuje proteiny podřízených signálních drah, čímž reguluje buněčnou proliferaci. Mutací receptor získává schopnost autofosforylace i bez přítomnosti ligandu, buňka ztrácí kontrolu nad proliferací a dochází k propuknutí akutní myeloidní leukemie. Je známo mnoho FLT3 inhibitorů, jejich použití však často komplikuje rozvoj buněčné rezistence, takže je potřeba hledat stále nové terapeutické přístupy.

Analýzou proteinů pomocí western blottingu v FLT3-ITD pozitivní buněčné linii MV4-11 ovlivněné nově připraveným FLT3 inhibitorem s označením LGR8498 byla prokázána blokáda FLT3 i FLT3-podřízených signálních drah MAPK/ERK a STAT5. Delším působením látky bylo indukováno zablokování buněčného cyklu v G1 fázi. Látka LGR8498 v použitém koncentračním rozsahu neovlivňuje buněčný cyklus FLT3-nezávislé linie Jurkat a výsledky tak naznačují dobrou selektivitu naší látky vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám. Látka LGR8498 rovněž aktivuje kaspasovou dráhu a vykazuje mírný proapoptotický účinek na linii MV4-11, v použitých koncentracích ale převažuje její cytostatický účinek. Účinky LGR8498 jsou srovnatelné s klinicky testovaným FLT3 inhibitorem, quizartinibem, který na linii MV4-11 působí rovněž v nanomolárním koncentračním rozsahu.

Klíčová slova	akutní myeloidní leukemie, FLT3-ITD, inhibitor
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Monika Kinnertová
Title	Cellular effects of novel imidazopyridazine inhibitor of oncogenic kinase FLT3-ITD
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of experimental biology
Supervisor	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Acute myeloid leukemia is an increasingly common disease. One of its causes is a mutation in the transmembrane receptor FLT3. FLT3 is a tyrosine kinase receptor that is phosphorylated upon ligand binding. Subsequently, FLT3 activates downstream signaling pathway proteins to regulate cell proliferation. By mutating the receptor gains the ability to auto-phosphorylate even in the absence of the ligand, the cell loses control over proliferation and acute myeloid leukemia develops. Many FLT3 inhibitors are known, but their use is often complicated by the development of cellular resistance. Therefore, it is necessary to search for new therapeutic approaches.

Protein analysis by western blotting in the FLT3-ITD positive cell line MV4-11 affected by a newly prepared FLT3 inhibitor, LGR8498, demonstrated blockage of both FLT3 and FLT3-dependent MAPK/ERK and STAT5 signaling pathways. Prolonged treatment with the substance induced cell cycle blockage in G1 phase. The substance LGR8498 in the concentration range used did not affect the cell cycle of the FLT3-independent Jurkat cell line, and thus the results suggest a good selectivity of our substance towards FLT3-ITD positive cells. The substance LGR8498 also activates the caspase pathway and shows a mild proapoptotic effect on the MV4-11 line. However, the cytostatic effect is predominant at the concentrations used. The effects of LGR8498 are comparable to the clinically tested FLT3 inhibitor, quizartinib, which also acts on the MV4-11 line in the nanomolar concentration range.

Keywords	acute myeloid leukemia, FLT3-ITD, inhibitor
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE	2
2.1.1 Charakterizace a rizikové faktory onemocnění	2
2.1.2 Molekulární podstata onemocnění - známé mutace	3
2.1.2.1 Mutace v genu pro protein NPM.....	3
2.1.2.2 Mutace měnící přenos signálu.....	4
2.1.2.2.1 Mutace v genu <i>KIT</i> proteinu CD117.....	4
2.1.2.2.2 Mutace v genech RAS proteinů NRAS a KRAS.....	4
2.1.2.2.3 Mutace v genu tyrozinkinasového receptoru FLT3.....	5
2.2 FLT3	5
2.2.1 Zařazení	5
2.2.2 Struktura	6
2.2.3 Posttranslační modifikace.....	6
2.2.4 Dimerní FL ligand	8
2.2.5 Aktivace a inaktivace FLT3 a její zapojení v signálních drahách.....	8
2.2.5.1 Aktivace PI3K/AKT/mTORC2 dráhy.....	8
2.2.5.2 Aktivace RAS/RAF/MAPK dráhy.....	9
2.2.5.3 Aktivace JAK/STAT dráhy.....	10
2.2.6 Známé mutace FLT3	12
2.2.6.1 Interní tandemová duplikace (<i>FLT3-ITD</i>).....	12
2.2.6.2 Bodová mutace FLT3 (<i>FLT3-TKD</i>).....	12
2.3 INHIBICE FLT3 JAKO TERAPIE AML	12
2.4 FLT3 INHIBITORY PRO CÍLENOU INHIBICI FLT3	13
2.5 KLINICKY TESTOVANÉ FLT3 INHIBITORY A FLT3 INHIBITORY SCHVÁLENÉ PRO TERAPII AML.....	14
2.5.1 Klinicky schválené inhibitory.....	14
2.5.1.1 Inhibitory první generace	15
2.5.1.1.1 Midostaurin.....	15
2.5.1.1.2 Gilteritinib.....	15
2.5.1.2 Inhibitor druhé generace	15
2.5.1.2.1 Quizartinib	15
2.5.2 Klinicky testované FLT3 inhibitory.....	16
2.5.2.1 Inhibitory první generace	17
2.5.2.1.1 Sorafenib.....	17

2.5.2.1.2 Sunitinib.....	17
2.5.2.1.3 Lestaurtinib	18
2.5.2.2 Inhibitor druhé generace	18
2.5.2.2.1 Crenolanib.....	18
2.6 NOVÉ PŘÍSTUPY CÍLENÉ INHIBICE FLT3.....	19
2.6.1 FF-10101	19
2.6.2 PROTAC	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 MATERIÁL.....	21
3.1.1 Chemikálie.....	21
3.1.2 Roztoky	22
3.1.3 Biologický materiál	23
3.1.4 Protilátky	24
3.1.5 Inhibitory	24
3.1.6 Přístrojové vybavení a příslušenství.....	25
3.2 METODY	26
3.2.1 Kultivace nádorových buněk a sklizení.....	26
3.2.2 Lyzace buněk.....	26
3.2.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek, western blotting a imunodetekce	27
3.2.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií.....	27
3.2.5 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3/7	28
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ	29
4.2 ANALÝZA EXPRESE PROTEINŮ POMOCÍ IMMUNOBLOTTINGU	35
4.3 AKTIVACE APOPTÓZY	38
5 ZÁVĚR	42
6 LITERATURA.....	43
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování literární rešerše týkající se role FLT3 v akutní myeloidní leukémii a shrnutí dostupných informací o inhibici FLT3 jako terapeutickém přístupu v léčbě tohoto onemocnění.

Experimentální část

Experimentální stanovení biologických účinků nového kinasového inhibitoru pomocí vybraných biologických a biochemických metod (kultivace nádorových buněk, studium exprese vybraných proteinů pomocí immunoblottingu, analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií).

Analýza a zpracování získaných dat a jejich zasazení do kontextu publikovaných dat.

1 ÚVOD

Maligní onemocnění jsou celosvětově velmi častou příčinou smrti. V žebříčku České republiky jsou dokonce zařazeny na druhém místě, ihned za nemocemi oběhové soustavy. (Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech - 2012–2021, 2022) Aktuální výzvou vědeckých skupin je proto hledat dlouhodobě účinná léčiva těchto onemocnění.

Hematoonkologické onemocnění je rakovinným onemocněním, projevujícím se v kostní dřeni nebo buňkách imunitního systému. Existují tři typy hematologických malignit. Prvním typem je mnohočetný myelom. Jedná se o malignitu terminálně diferencovaných plazmatických buněk primárně lokalizovaných v kostní dřeni, v pozdějším stádiu pak i v periferní krvi. Druhým typem jsou lymfomy, malignity B - lymfocytů či T - lymfocytů běžně se nacházejících v různých stupních vývoje. Poslední z typů jsou leukemie. Jde o skupinu dosti odlišných onemocnění, jejichž společnými znaky jsou přítomnost vysokého počtu buněčných klonů a netypická proliferace nediferencovaných progenitorových buněk. (Mancuso et al., 2021)

Teoretická část této práce se věnuje problematice akutní myeloidní leukemie, úloze receptoru FLT3 (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, CD135, EC 2.7.10.1), způsobům jeho inhibice a konkrétním inhibitorům. Cílem experimentální části práce bylo porovnat účinky nového FLT3 inhibitoru s klinicky testovaným FLT3 inhibitorem na buněčných liniích lišících se přítomností FLT3-ITD mutace.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

2.1.1 Charakterizace a rizikové faktory onemocnění

Akutní myeloidní leukemie (AML) je rakovinným onemocněním krve charakteristickým pronikáním proliferujících, klonálních, netypicky diferencovaných či málo diferencovaných krevních buněk do kostní dřeně, krve a dalších tkání. (Döhner et al., 2015) Příčinou onemocnění je transformace kmenové buňky v buňku maligní. (Čerňan & Szotkowski, 2021)

Výskyt AML v populaci se za poslední století nepochybně zvyšuje. V roce 1973 byl ve Spojených státech amerických zahájen program SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) monitorující výskyt AML a úmrtnost osob na toto onemocnění. Tehdy se ročně nemoc vyskytovala průměrně u 3,43 osob ze 100 000 obyvatel. Hodnota postupně rostla a roku 2016 dosahovala až 4,3 osob ze 100 000 obyvatel. Četnosti výskytu onemocnění v USA jsou velmi blízké hodnoty většiny evropských zemí. (Shallis et al., 2019)

AML je nejčastější forma leukemie. Je typická brzkým úmrtím jedinců, u nichž se onemocnění projeví. Příčiny nemoci jsou různé, častý je vliv látek poškozujících DNA. Výjimkou není ani návrat onemocnění po předchozí léčbě. (Shallis et al., 2019) Významným faktorem v propuknutí leukemie jsou těžká nadváha či obezita. Se zvýšenou obezitou či nadváhou se zvyšuje riziko propuknutí choroby, zásadnější roli však sehrává u žen. Rizikovým faktorem je i kouření. Zatímco u žen má významný vliv vykouření již 100 a více cigaret, u mužů je riziková hranice výrazně nižší, v ohrožení jsou především muži kouřící více než 30 let. Nezaostává ani vliv expozice chemickým činidlům, riziko AML se zvyšuje nejen s koncentrací látky, ale i s délkou expozice. Rozdíl mezi muži a ženami zde není nijak významný. (Strom et al., 2012) Akutní myeloidní leukemie je častěji onemocněním mužů. U většiny případů však přesná příčina jejího vzniku není přesně známa. (Shallis et al., 2019)

AML je primárně onemocněním osob starších 65 let, u nichž incidence dosahuje hodnoty 20,1 osob na 100 000 obyvatel. Ve srovnání s lidmi ve věku nižším než 65 let je výskyt desetinásobný. Průměrný věk, v němž je onemocnění diagnostikováno, byl podle SEER a WHO (World Health Organization) původně stanoven na 62 let, v pozdějších průzkumech se posunul na hranici 68 let. (Shallis et al., 2019) AML je dnes

možné léčit zejména u osob s maximální věkovou hranicí 60 let, u nichž úspěšnost léčby dosahuje 35 – 40 %. Lidé ve vyšším věku jsou při léčbě vystaveni zvýšené hrozbě vedlejších účinků, které bývají častou příčinou jejich úmrtí během 5-10 měsíců od diagnózy onemocnění. (Döhner et al., 2015) Věk, v němž dochází k propuknutí onemocnění, je závislý taky na národnosti. Pro jednotlivé státy se hodnoty významně liší. (Shallis et al., 2019)

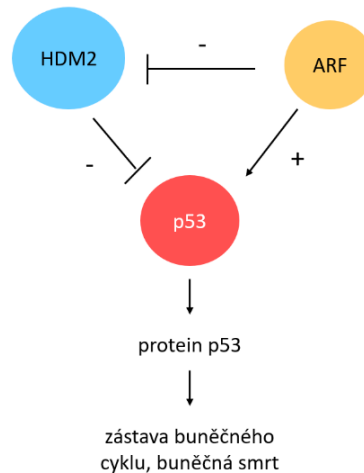
2.1.2 Molekulární podstata onemocnění - známé mutace

Mezi mutace způsobující AML patří mutace v genech zapojených v signálních drahách (*FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*), v epigenetických regulátorech účastnících se DNA metylace či modifikace chromatinu (*TET2*, *IDH1*). Dále zde řadíme mutace nukleofosminu (*NPM*), transkripčních faktorů (*CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*), tumor supresorových genů (*TP53/p53*), mutace genů zapojených v procesu sestřihu RNA (*U2AF1*, *SRSF2*) a mutace v kohezinovém komplexu (*RAD21*, *STAG1*). (DiNardo & Cortes, 2016) Níže jsou některé z těchto mutací více specifikovány.

2.1.2.1 Mutace v genu pro protein NPM

Jednou z nejčastějších mutací způsobujících AML je mutace v genu kódujícím chaperonový protein nukleofosmin (NPM). NPM je multifunkční protein regulující buněčný cyklus. Je zapojený do syntézy proteinů a ribosomů, jakož i do replikace DNA. (DiNardo & Cortes, 2016) Mutace ve 12. exonu genu pro NPM způsobuje ztrátu jednoho až dvou tryptofanových zbytků, které jsou nezbytné pro lokalizaci NPM v jádře. Ztráta tryptofanu následně vede k exportu nukleofosminu z jádra do cytoplazmy. Proto se poté onemocnění označuje jako $NPMc^+$, tedy NPM-cytoplazma pozitivní. (Falini et al., 2006)

Nemutovaný NPM interaguje se zásadními buněčnými regulátory. Jedním z nich je i nádorový supresor p53, který buňka při mutaci NPM není schopna aktivovat. (Colombo et al., 2002) Stabilita proteinu p53 je regulována negativním regulátorem známým pod označením HDM2 (MDM2). Jedná se o ubikvitinační E3 ligasu, která označuje p53 k degradaci v proteasomu. (Lohrum & Vousden, 1999; Haupt et al., 1997)



Obrázek č. 1: Schéma vzájemných interakcí ARF, HDM2 a p53, regulujících aktivitu a funkci proteinu p53 (Gjerset, 2006), upraveno

Opačný účinek zajišťuje pozitivní regulátor proteinu p53, protein ARF (p19^{Arf}), který vazbou na HDM2 iniciuje přesun proteinu p53 do jádérka. Touto aktivací je umožněna účast p53 v zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze buňky. (Kuo et al., 2004; Weber et al., 1999) Dráha je znázorněna v obrázku č. 1.

2.1.2.2 Mutace měnící přenos signálu

2.1.2.2.1 Mutace v genu *KIT* proteinu CD117

Gen *KIT* kóduje protein CD117, transmembránovou glykoproteinovou tyrozinkinasu. CD117 po navázání ligandu dimerizuje a autofosforyluje na tyrozinových koncích. Tímto aktivuje signální dráhy jako RAS/ERK, PI3K, JAK/STAT, důležité pro buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití. (Malaise et al., 2009)

Mutace v *KIT* má většinou charakter záměny kyseliny asparagové za valin v pozici 816 (*D816V*). (DiNardo & Cortes, 2016) Mutací dochází ke ztrátě závislosti dimerizace receptoru na ligandu nebo ke konformačním změnám monomerů receptoru, které jsou poté schopny i přes monomerní podobu předávat signál podřízeným drahám. (Malaise et al., 2009)

2.1.2.2.2 Mutace v genech RAS proteinů NRAS a KRAS

NRAS a KRAS (GTP fosfohydrolasa, EC 3.6.5.2) patří do rodiny RAS proteinů malých GTPas podporujících buněčnou proliferaci. Aktivují efekторы jako RAF (ATP:protein fosfotransferasa, EC 2.7.11.1) či PI3K (ATP:1-fosfatidyl-1D-myo-inositol-3-fosfotransferasa, EC 2.7.1.137). RAS proteiny jsou běžně aktivovány pomocí GEF

faktoru zajišťujícího výměnu GTP za GDP. Deaktivovány jsou spojením s GAP, proteiny napomáhajícími přeměně GTP v GDP, a tak urychlujícími GTPasovou aktivitu. (Li et al., 2018; Gazdová et al., 2009)

Pro narušení tohoto mechanismu stačí v leukemických případech jediná bodová mutace genu pro RAS protein. K mutaci RAS proteinu většinou dochází na glycinu 12/13 nebo na glutaminu 61. Následkem mutace ztrácí RAS protein vnitřní GTPasovou aktivitu nebo GAP stimulovanou GTPasovou aktivitu či dokonce obě tyto aktivity. NRAS a KRAS proteiny se tak hromadí v aktivní konformaci s navázaným GTP, což má za následek onkogenní projevy buňky. (Li et al., 2018)

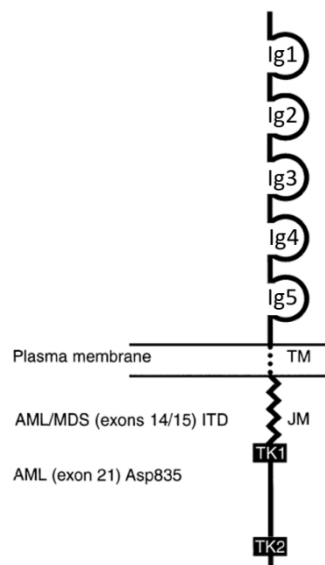
2.1.2.2.3 Mutace v genu tyrozinkinasového receptoru FLT3

Častou příčinou rozvoje AML, a proto také často studovanou mutací je mutace v transmembránovém tyrozinkinasovém receptoru FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), ovlivňujícím buněčnou proliferaci. Mutace může mít dvojí charakter. Prvním typem je interní tandemová duplikace v juxtamembránové doméně FLT3, známá pod zkratkou *ITD* a projevující se u 15-35 % AML případů. Druhým typem je bodová mutace nacházející se v tyrozinkinasové doméně. Mutaci označujeme zkratkou *TKD*, její četnost je nižší, vyskytuje se u 5-10 % pacientů s AML. *FLT3* mutace způsobují autofosforylaci kinasy FLT3 bez přítomnosti ligandu a konstantní aktivaci podřízených drah včetně AKT/PI3K, RAS/MAPK a STAT. (Meshinchi & Appelbaum, 2009; Gazdová et al., 2009)

2.2 FLT3

2.2.1 Zařazení

FLT3 (FMS-like receptor tyrosine kinase-3) je tyrozinkinasový receptor třídy III známý také jako FLK-2 (fetal liver kinase 2) v myších buňkách a STK-1 (stem cell kinase-1) v buňkách lidských. (Small et al., 1994; Gazdová et al., 2009) FLT3 je exprimována hematopoetickými kmenovými progenitorovými buňkami s lymfoidním a myeloidním diferenciačním potenciálem. FLT3 hraje významnou roli v proliferaci, diferenciaci a regulaci životnosti krvetvorných buněk. Diferenciací buňky je exprese FLT3 ukončena. Výjimkou, u níž je exprese zachována, jsou dendritické buňky. (Lyman & Jacobsen, 1998; Gazdová et al., 2009; Stirewalt & Radich, 2003)



Obrázek č. 2: Monomer receptoru třídy III procházejícího plazmatickou membránou. V extracelulární oblasti schopné vázat ligand nad membránou se nachází 5 domén podobných imunoglobulinu (Ig1-Ig5). Dále je znázorněna transmembránová doména (TM), juxtamembránová doména (JM) a dvě intracelulární kinasové domény (TK1, TK2) oddělené kinasovým insertem (KI). Nalevo od kinasy je označeno místo výskytu mutací při onemocnění AML. (Reilly, 2002), upraveno

Geny pro lidskou FLT3 jsou kódovány na chromosomu 13, zatímco myší homolog tohoto genu je kódován v chromosomu 5. *FLT3* vykazuje velkou sekvenční podobnost se skupinou genů kódujících receptory růstových faktorů FMS, CD117 a PDGFR (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1). (Rosnet et al., 1991)

2.2.2 Struktura

Tyrozinkinasové receptory třídy III (obrázek č. 2) jsou charakteristické přítomností pěti imunoglobulinových domén v extracelulární části, na kterou se váže ligand. Dále jsou přítomny jednoduchá transmembránová doména (TM) a juxtamembránová doména (JM). Katalytickou kinasovou doménu v intracelulární oblasti tvoří dvě části (TK1, TK2), jež jsou odděleny kinasovou inzertní doménou (KI). Intracelulární část je zakončena C-terminální doménou. (Yarden et al., 1987)

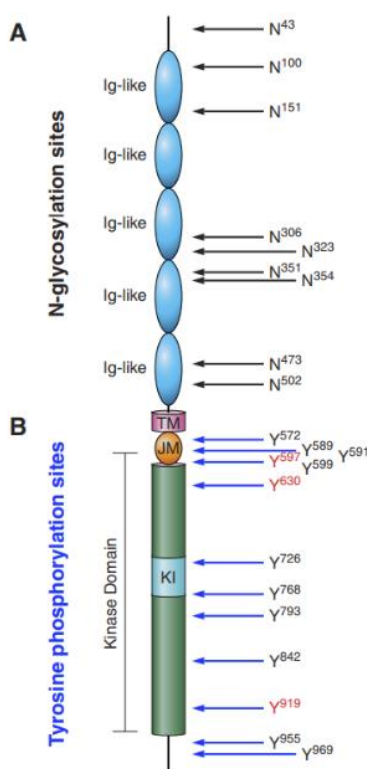
2.2.3 Posttranslační modifikace

Po translaci proteinového řetězce tvořeného 993 aminokyselinami o celkové hmotnosti 110 kDa podléhá FLT3 množství posttranslačních úprav. Jednou z úprav je proces glykosylace (obrázek č. 3), probíhající nejprve v endoplazmatickém retikulu. Z něj je částečně glykosylovaný protein přenesen do Golgiho komplexu, kde je glykosylace dokončena. FLT3 obsahuje nejméně 9 glykosylačních míst, nacházejících

se v extracelulární části proteinu. Plně glykosylovaný protein je poté inkorporován do cytoplazmatické membrány, kde plní funkci receptoru. Přesná glykosylace je podmínkou pro správné seskládání proteinu a jeho stabilitu. (Shental-Bechor & Levy, 2008; Kazi & Rönnstrand, 2019) Umístění sacharidového řetězce má významný vliv na termální stabilitu proteinu, ne tak zásadní je pak délka připojeného sacharidu. (Shental-Bechor & Levy, 2008)

Vlivem glykosylace je receptor při western blottingu rozdělen do dvou pásů a jako celek se jeví rozměrnější. První pás se nachází v rozmezí molární hmotnosti 132-143 kDa a reprezentuje částečně glykosylovaný protein. Pás druhý, nacházející se v rozmezí 155-158 kDa, je typický pro plně glykosylovaný protein. (Kazi & Rönnstrand, 2019)

Mezi další posttranslační úpravy řadíme ubiquitinaci nebo fosforylaci na serinu, threoninu či tyrozinu (obrázek č. 3). Fosforylační místa se nachází v intracelulární části proteinu, kde plní funkci aktivního místa pro navázání signálních proteinů, přenášejících receptorový signál v podřízených drahách. (Kazi & Rönnstrand, 2019)



Obrázek č. 3: Struktura FLT3 s vyznačenými místy posttranslačních modifikací. A: N-glykosylační místa extracelulární domény. B: Černě vyznačená fosforylační místa a červeně vyznačená předpovídaná fosforylační místa intracelulární domény. TM: transmembránová doména, JM: juxtamembránová doména, KI: kinasový inzert. (Kazi & Rönnstrand, 2019)

2.2.4 Dimerní FL ligand

Dimerní ligand z cytokinové rodiny známý pod zkratkou FL je stěžejní pro aktivaci FLT3 za fyziologického stavu. Jeho exprese byla u člověka prokázána v mnoha typech tkání, například v leukocytech, brzlíku, slezině, vaječnících, tenkém střevě, prostatě, ledvinách, kosterních svalech, játrech, plicích, srdci, varlately či slinivce břišní. (Kazi & Rönstrand, 2019)

Koncentrace FL v krevním séru zdravého jedince nabývá hodnot 14 ± 39 pg/ml, jelikož ligand FL běžně působí parakrinně. Nastane-li však patologický stav, při němž dochází k degradaci kostní dřeně, začne FL působit i endokrinně, takže se zvýší jeho koncentrace v krevním séru. Tento jev je pozorován i při chemoterapeutické léčbě leukemických pacientů, při níž dochází k deaktivaci buněk kostní dřeně. Koncentrace FL v séru takových jedinců dosahuje až 2 500 pg/ml, tedy téměř dvousetnásobně vyšší hodnoty, než je běžná u zdravého člověka. (Wodnar-Filipowicz et al., 1996; Kazi & Rönstrand, 2019)

2.2.5 Aktivace a inaktivace FLT3 a její zapojení v signálních drahách

FLT3 je aktivována navázáním FL na extracelulární část, přesněji na druhou a třetí imunoglobulinovou extracelulární doménu. (Verstraete et al., 2011) Připojením ligandu je zahájena dimerizace a koordinace cytoplazmatických domén dvou receptorových monomerů. Dimerizace stabilizuje katalytickou doménu v otevřené konformaci, takže jsou uvolněna vazebná místa pro navázání ATP, které následně zajišťuje fosforylaci tyrozinových zbytků nacházejících se v katalytické doméně. (Weiss & Schlessinger, 1998) Kinasová aktivita je negativně ovlivňována tyrozinofosfatasami, které defosforylují přítomné tyroziny. (Griffith et al., 2004)

Monomerní FLT3 umístěná v membráně je udržována v inaktivním stavu díky komunikaci mezi juxtamembránovou a kinasovou doménou. Juxtamembránová doména je v nepřítomnosti fosfátu na tyrozinech kinasové domény schopna překrýt aktivní místo a zamezit tak přístupu fosfátu. (Griffith et al., 2004) Nastane-li mutace v juxtamembránové doméně, dochází tak ke konstantní aktivaci FLT3 vlivem neschopnosti juxtamembránové domény zabránit vazbě fosfátu. (Kiyoi et al., 2002)

2.2.5.1 Aktivace PI3K/AKT/mTORC2 dráhy

Fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) jsou skupinou lipidových kinas fosforylujících fosfatidylinositol a fosfatidylinositidy na 3' hydroxylové skupině. PI3K se dělí do tří tříd,

tyrozinkinasami je regulována třída IA, tvořená heterodimerními komplexy s katalytickou a regulační podjednotkou. Aktivace PI3K je zajištěna asociací SH₂ domény regulační podjednotky PI3K s fosfotyrozinovými zbytky aktivovaného receptoru, například FLT3. (Vanhaesebroeck et al., 1997; Martelli et al., 2010)

PI3K je schopno fosforylovat PIP2 (fosfatidylinositol-4,5-difosfát), čímž dává vzniknout PIP3 (fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu). PIP3 následně reaguje s PH doménou lokalizovanou na NH₂ konci serin-treoninkinasy AKT (ATP:[protein]-L-tyrosine O-fosfotransferasa, EC 2.7.10.2), touto reakcí je zajištěno připojení AKT k cytoplazmatické membráně. Po navázání na membránu je AKT prostřednictvím PDK1 (ATP:protein serin/treonin-fosfotransferasa, PKA, EC 2.7.11.11) na T308 fosforylována. (Martelli et al., 2010)

PI3K se zároveň podílí na aktivaci hydrofobní serin-treoninkinasy označované jako mTORC2. Mechanismus aktivace zatím není dostatečně popsán. Je však známo, že aktivovaná mTORC2 fosforyluje další proteiny, včetně již zmíněné AKT. Na ní dochází k fosforylaci S473, ležícím v karboxyterminální části proteinu. mTORC2 na AKT nezajišťuje jen fosforylaci serinu, napomáhá totiž i fosforylaci T308, zajišťované činností PDK1. (Martelli et al., 2010; Sarbassov et al., 2005; Smith et al., 2020)

2.2.5.2 Aktivace RAS/RAF/MAPK dráhy

Na počátku dráhy stojí FLT3, která po stimulaci ligandem zajistí fosforylaci proteinu SHC. Interakcí fosforylovaného SHC s proteinem GRB2 je umožněn přesun výměnných faktorů guaninnukleotidů do blízkosti RAS proteinu. (Takeuchi et al., 1999) Výměnné faktory guaninnukleotidů, mezi něž patří například SOS protein, jsou aktivující proteiny, které mají schopnost aktivovat GTPasový RAS protein výměnou GDP za GTP. RAS protein patří mezi malé GTP-vázající proteiny. Typická je pro něj přítomnost pouze jedné podjednotky, proto se taky označuje jako monomerní GTP-vázající protein. Vykazuje podobnost s alfa podjednotkou trimerního GTP-vázajícího proteinu, takže je při vazbě s GTP v aktivní konformaci. Dojde-li k hydrolyze GTP za vzniku GDP, změní se konformace RAS a protein se stane inaktivním. (Takeuchi et al., 1999; Alberts, 1998)

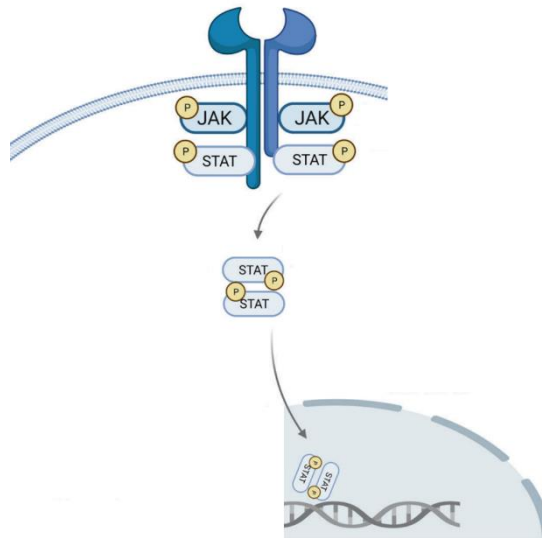
RAS s navázaným GTP iniciuje postupnou aktivaci tří kinas kinasové aktivační kaskády. (Alberts, 1998) Kaskáda je spuštěna asociací RAS se serin-treoninkinasou RAF. Jejich asociací je umožněno přiblížení RAF k membráně a její následná aktivace. (Takeuchi et al., 1999) RAF patří mezi MAPK kinasy kinasy (MKKK) zajišťující aktivaci MAPK kinas (ATP:protein fosfotransferasa, EC 2.7.12.2), v tomto případě označovaných

MEK1 nebo MEK2. Aktivované MEK1 a MEK2 zakončují kinasovou aktivační kaskádu duální fosforylací hydroxylové skupiny tyrozinu a treoninu dvou MAPK (ATP:protein fosfotransferasa, EC 2.7.11.24) známých pod označením ERK1 (MAPK3) a ERK2 (MAPK1). (Pritchard & Hayward, 2013; Uhlik et al., 2004)

ERK1/2 jsou téměř identické, liší se pouze v 15 %. Obě kinasy obsahují strukturní jednotku *T-E-Y*, jež má stěžejní roli při fosforylací, a tedy aktivaci ERK kinas. Na ERK1 se aminokyseliny vyskytují v místech *T202* a *Y204*, na ERK2 pak v místech *T185* a *Y187*. Proces aktivace je zahájen spojením aktivní MEK1/2 s ERK1/2 a fosforylací hydroxylové skupiny tyrozinu. Následně ERK1/2 disociuje od MEK1/2 a znovu se spojí s jinou či stejnou, opět aktivní MEK1/2. Druhým spojením ERK1/2 s MEK1/2 je umožněna fosforylace hydroxylové skupiny treoninu, díky níž je aktivace ERK1/2 dokončena. (Pearson et al., 2001; Roskoski, 2012) Aktivní ERK1/2 mají řadu odlišných funkcí, které obvykle zajišťují přímou interakcí se substráty. Interakce je umožněna aktivními místy na ERK1/2 a dvěma odpovídajícími místy substrátu. Substráty, jež mají funkci transkripčních faktorů, proteinových kinas a fosfatas, cytoskeletárních elementů či regulátorů apoptózy, následně hrají významnou roli v buněčných procesech jako jsou například proliferace a diferenciace. (Yoon & Seger, 2006)

2.2.5.3 Aktivace JAK/STAT dráhy

JAK (ATP:[protein]-L-tyrozin O-fosfotransferasa, EC 2.7.10.2) je rodinou nereceptorových tyrozinových kinas, jedná se o JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2. JAK3 je exprimována pouze v některých tkáních, ostatní JAK kinasy jsou přítomny téměř ve všech tkáních. STAT genová rodina je složena ze sedmi genů (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6). STAT proteiny jsou tvořeny šesti doménami, přičemž každá z nich má odlišnou funkci. N-terminální doména napomáhá dimerizaci proteinu, takzvaná „coiled-coil“ doména se účastní kontroly importu a exportu proteinu do jádra, spojovací doména spojuje DNA vazebnou doménu s doménou SH₂. DNA vazebná doména se váže na DNA v regulačním regionu cílového genu, SH₂ doména rozpoznává fosfotyrozinové motivy cytokinových receptorů a doména aktivující transkripci je zásadní pro regulaci transkripce. (Hu et al., 2021)

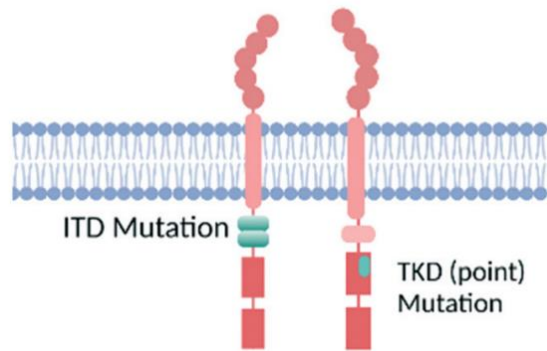


Obrázek č. 4: Na obrázku je znázorněna JAK/STAT dráha. Vzniklý dimerní STAT protein proniká přes jadernou membránu do jádra, kde reguluje genovou expresi (Hu et al., 2021), upraveno

Navázáním cytokinu na receptor cytoplazmatické membrány dochází k dimerizaci receptoru, na který se následně váže JAK kinasa. JAK kinasa je po připojení k receptoru fosforylována a díky této aktivaci může fosforylovat tyrozin v katalytické doméně receptoru, a tak aktivovat samotný receptor. Fosforylovaný receptor obsahuje aktivní místo pro navázání neaktivního STAT proteinu, který je po vazbě na receptor fosforylován aktivní JAK kinasou.

STAT proteiny obsahují konzervovanou SH₂ doménu, specifickou pro daný STAT typ. (Xin et al., 2020; Hu et al., 2021) Vzdáleně od SH₂ domény se nachází tyrozinový konec, sloužící jako substrát pro fosforylaci. (Horvath & Darnell, 1997) Aktivované STAT proteiny se odpojují od receptoru a vazbou SH₂ domény prvního STAT s fosfotyrozinem druhého STAT dimerizují v homodimer či heterodimer. Dimerizací STAT proteinů je umožněn jejich transport do buněčného jádra, kde aktivují genovou expresi. (Xin et al., 2020; Hu et al., 2021) (obrázek č. 4)

V nemutované formě není receptor FLT3 schopen tuto dráhu aktivovat. Nastane-li však mutace *FLT3-ITD*, narušením juxtamembránové domény receptoru FLT3 dochází ke zpřístupnění míst Y589/591, sloužících jako fosforylační místa STAT5 a dráha je tak nezávisle na JAK proteinech aktivována. (Rocnik et al., 2006)



Obrázek č. 5: FLT3 s ITD mutací nalevo a TKD mutací napravo. (Acharya et al., 2022)

2.2.6 Známé mutace FLT3

2.2.6.1 Interní tandemová duplikace (*FLT3-ITD*)

Při interní tandemové duplikaci (*ITD*) (obrázek č. 5) je duplikován fragment o velikosti 3 – 1 236 bp, nacházející se v juxtamembránové doméně, přesněji v exonu 14 a 15. (Choudhary et al., 2005; Kazi & Rönnstrand, 2019) *ITD* mutací získává FLT3 nezávislost na ligandu, schopnost dimerizace, autofosforylace a konstantní aktivace podřízených drah, čímž způsobuje nekontrolovanou buněčnou proliferaci. (Hayakawa et al., 2000; Acharya et al., 2022; Choudhary et al., 2005)

2.2.6.2 Bodová mutace FLT3 (*FLT3-TKD*)

Bodová mutace v aktivační smyčce či také mutace v tyrozinkinasové doméně (*TKD*) (obrázek č. 5) je mutací v kodonu 835 či 836 TK domény. Jedná-li se o mutaci v kodonu 835 (*D835*), je kyselina asparagová nahrazena nejčastěji tyrozinem, valinem nebo histidinem. Může však jít také o delecii izoleucinu v místě 836 (*I836*). (Choudhary et al., 2005) Výsledkem mutace je schopnost autofosforylace receptoru FLT3 bez přítomnosti ligandu a nezávislý buněčný růst. (Acharya et al., 2022)

2.3 INHIBICE FLT3 JAKO TERAPIE AML

Způsobů, jak inhibovat FLT3 je spousta. Jedním z nich je cílení na maturační proces FLT3, přesněji na glykosylaci, jejímž narušením je možné receptor deaktivovat. (Kazi & Rönnstrand, 2019)

Další možností inaktivace FLT3 je cílení na chaperonový protein Hsp90. Chaperon se v buněčném jádře podílí na seskládání proteinového receptoru FLT3 (*FLT3-ITD*), které je zásadní pro jeho funkčnost. Narušením funkce chaperonu Hsp90 je možné

ovlivnit receptor FLT3. Tento mechanismus byl testován pomocí inhibitoru chaperonu Hsp90 označovaného MS-275. Inhibitor způsobil acetylaci chaperonového proteinu Hsp90, jejímž následkem byla ubikvitinace a poté degradace receptoru FLT3 v proteasomu. Nakonec tak inhibitor chaperonu, MS-275, zabránil šíření fosforylačního signálu v podřízených drahách receptoru FLT3, zastavil buněčný růst a inicioval apoptózu buněk linie MV4-11 s mutantní FLT3-ITD. (Nishioka et al., 2008)

Možné je pro inhibici FLT3 využít i receptorové ubikvitinace. Inhibitor histondeacetylas označovaný LBH589 zajišťuje expresi genů potlačujících nádorové bujení. Přesněji podporuje expresi ubikvitinačního enzymu E2, UBCH8 (S-ubikvitinyl-[E1 ubikvitin-aktivační enzym]-L-cystein:[E2 ubikvitin-konjugační enzym] ubikvitinyl transferasa, EC 2.3.2.23), který následně společně s ubikvitinačním enzymem E3, SIAH1 ([E2 ubikvitin-kojugační enzym]-S-ubikvitinyl-L-cystein:[akceptorový protein] ubikvitin transferasa, EC 2.3.2.27) označuje FLT3-ITD k degradaci v proteasomu. (Buchwald et al., 2010)

Hlavním přístupem využívaným v praxi je však cílená inhibice FLT3.

2.4 FLT3 INHIBITORY PRO CÍLENOU INHIBICI FLT3

Inhibitory FLT3 se dělí do dvou generací. Mezi inhibitory první generace se řadí například midostaurin (Rydapt či PKC-412), lestaurtinib (CEP-701), sorafenib (Nexavar) a amuvatinib (MP-470). Inhibitory první generace jsou neselektivní, takže zasahují více buněčných cílů, zatímco inhibitory druhé generace vykazují vyšší selektivitu. Mezi inhibitory druhé generace se řadí například quizartinib (AC220) a crenolanib. (Kazi & Rönstrand, 2019; Zarrinkar et al., 2009)

Častým problémem inhibitorů je postupně vznikající rezistence, daná výskytem nových mutací v genu pro FLT3. Inhibitory jediného receptoru navíc vykazují poměrně nízkou účinnost. Pro zvýšení účinnosti tak byly vyvinuty duální inhibitory, inhibující dva receptory současně. Duálním inhibitorem je například pacritinib (SB1518), který zároveň s FLT3 inhibuje i JAK2. (Hart et al., 2011; Kazi & Rönstrand, 2019)

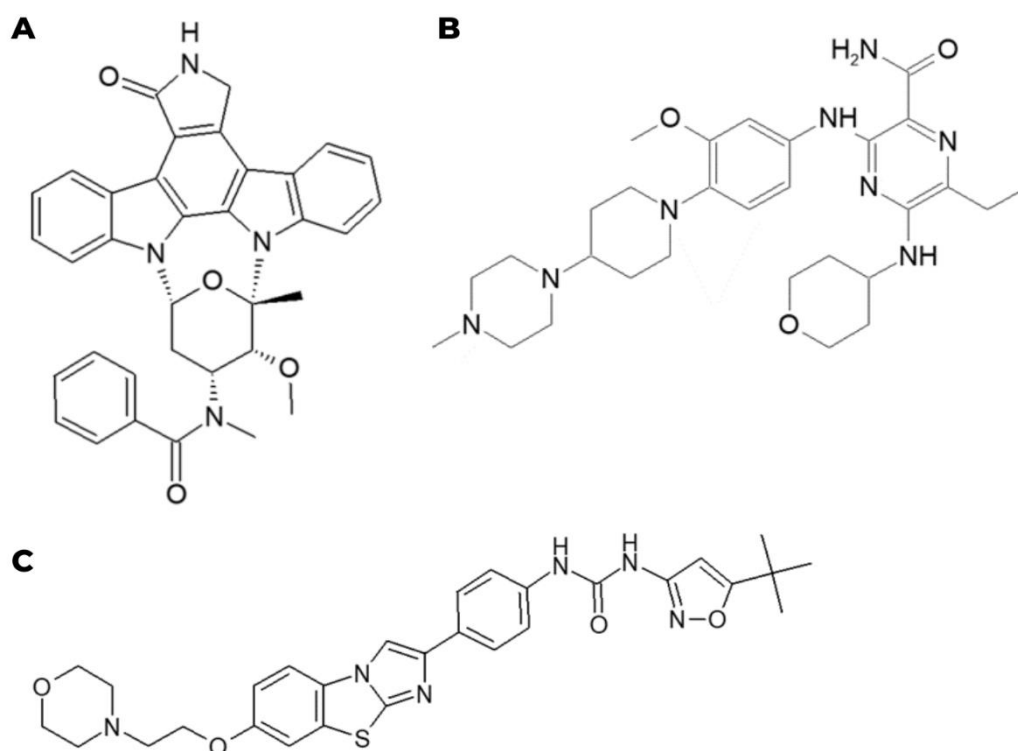
Druhou možností je rozdělení inhibitorů do dvou typových skupin, lišících se způsobem interakce s FLT3. Cílem působení FLT3 inhibitorů je ovlivnit ATP vazebné místo a tím zabránit autofosforylaci receptoru i aktivaci podřízených drah. Odlišnost mezi skupinami je ve schopnosti interagovat s vybranou konformací aktivního místa receptoru, která je dána překlápěním tří aminokyselinových zbytků. Jedná se o kyselinu asparagovou, fenylalanin a glycin (*DFG*). Inhibitory I. typu se do ATP vazebného místa

vází v případě, že je receptor v aktivní konformaci (DFG_{in}), proto jsou označovány jako ATP kompetitivní. Aktivitu vykazují vůči *ITD* i *TKD* mutacím. (Larrosa-Garcia & Baer, 2017; Acharya et al., 2022)

Inhibitory II. typu vykazují opačný mechanismus inhibice, reagují s hydrofobním regionem přístupným pouze v případě, že je receptor v inaktivní konformaci (DFG_{out}). Region se nachází poblíž ATP vazebného místa a jeho vazbou k inhibitoru je zabráněno aktivaci receptoru v ATP vazebném místě. Až na několik málo výjimek vykazujících aktivitu i vůči *TKD* mutacím, jsou inhibitory II. typu účinné pouze proti *ITD* mutacím. (Larrosa-Garcia & Baer, 2017; Acharya et al., 2022) Mezi inhibitory typu II, takzvané ATP nekompetitivní inhibitory, řadíme z níže zmíněných quizartinib a sorafenib. Ostatní níže zmíněné inhibitory patří do skupiny typu I, tudíž jsou ATP kompetitivní. (Acharya et al., 2022)

2.5 KLINICKY TESTOVANÉ FLT3 INHIBITORY A FLT3 INHIBITORY SCHVÁLENÉ PRO TERAPII AML

2.5.1 Klinicky schválené inhibitory



Obrázek č. 6: Struktury midostaurinu (A), gilteritinibu (B), quizartinibu (C)

2.5.1.1 Inhibitory první generace

2.5.1.1.1 Midostaurin

Midostaurin (Rydapt, PKC412) je multikinasový inhibitor používaný od roku 2017 pro léčbu dospělých pacientů s nově diagnostikovanou, FLT3 pozitivní AML. Použití je povoleno v kombinaci s cytarabinem a daunorubicinem. (Kim, 2017; Acharya et al., 2022) Midostaurin je derivát staurosporinu, původního inhibitoru proteinkinasy C (ATP:protein fosfotransferasa, EC 2.7.11.13). (obrázek č. 6A) Původně byl vyvinut za účelem zvýšení selektivity k této proteinkinase, bylo však prokázáno, že je inhibitorem celé řady dalších kinas. Kromě AKT, CD117, PKA, PDGFR β a dalších proteinů také FLT3. (Acharya et al., 2022; Larrosa-Garcia & Baer, 2017) IC₅₀ (koncentrace snižující enzymovou aktivitu o 50 %) pro FLT3-ITD je 9,3 nmol.l⁻¹, pro FLT3-D835Y pak 10 nmol.l⁻¹. (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Pacientům s AML je midostaurin podáván perorálně v dávce 50 mg dvakrát denně. Léčivo je účinné i proti dalším onemocněním jako jsou systémová mastocytóza nebo mastocytární leukemie. (Kim, 2017)

2.5.1.1.2 Gilteritinib

Strukturálním základem gilteritinibu (ASP2215) je pyrazinkarboxamid. (Mori et al., 2017) (obrázek č. 6B) IC₅₀ pro FLT3-ITD je 1,6 nmol.l⁻¹, pro FLT3-D835Y pak 1,4 nmol.l⁻¹. Gilteritinib je účinný také proti receptorům LTK, ALK a AXL (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1). (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Gilteritinib je duálním inhibitorem FLT3 a AXL, účinným proti FLT3-ITD i FLT3-TKD mutacím. AML buňky vykazují vlivem aktivace AXL rezistenci k běžným chemoterapiím, ale také terapii cílené na FLT3. Schopnost gilteritinibu působit inhibičně nejen na FLT3, ale také na AXL tak zvyšuje účinnost léčby AML. (Dumas et al., 2021)

Používání ASP2215 jako leukemického léčiva bylo povoleno americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2018. Od roku 2019 získal toto povolení také v Japonsku. (Acharya et al., 2022)

2.5.1.2 Inhibitor druhé generace

2.5.1.2.1 Quizartinib

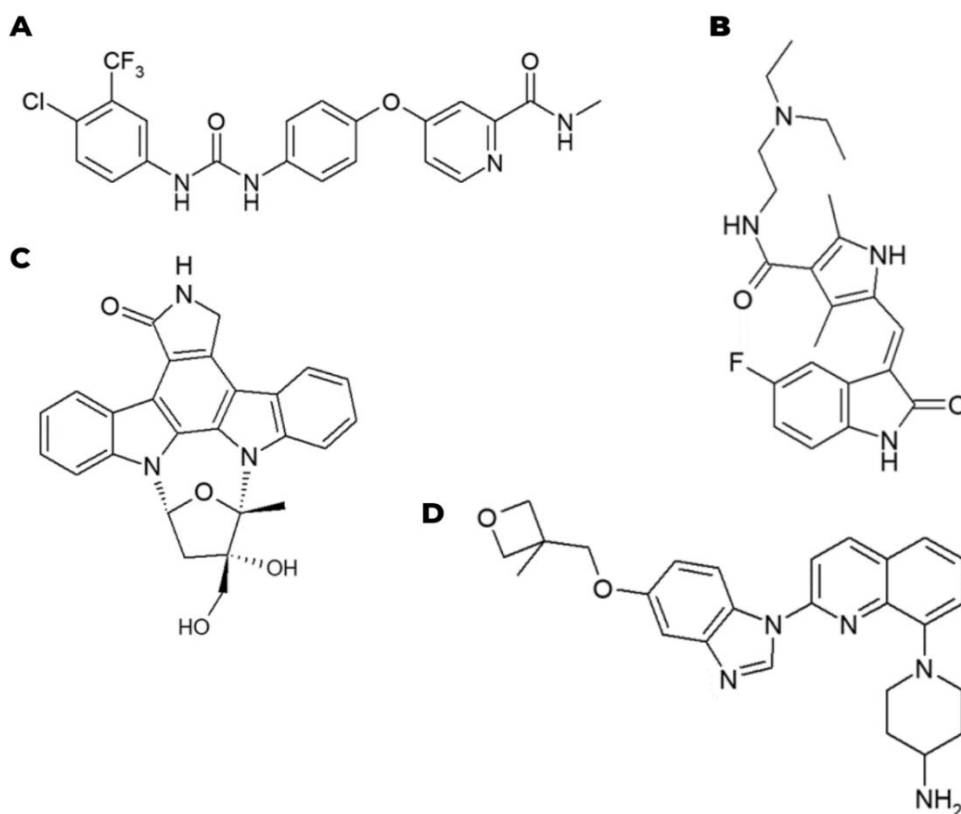
Quizartinib (AC220) je inhibitor s velmi vysokou specificitou a selektivitou k FLT3.

(Zarrinkar et al., 2009) (obrázek č. 6C) Hodnota IC_{50} pro FLT3-ITD je stanovena na $1,2 \text{ nmol.l}^{-1}$, ale pro FLT3-D835Y je více než 100 nmol.l^{-1} . Quizartinib inhibuje také CD117, PDGFR β , RET (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1). (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Inhibice FLT3-ITD quizartinibem může být zkomplikována tvorbou sekundárních TKD mutací. Jedná se především o bodové mutace *F691*, *D835* nebo *Y842*, způsobující rezistenci FLT3 ke quizartinibu. Rezistence takto modifikované FLT3 je dána destabilizací inaktivní konformace FLT3-ITD, kterou je znemožněna vazba quizartinibu na receptor. (Smith et al., 2012)

Jeho použití jako léčiva AML s FLT3-ITD je povoleno od roku 2019 v Japonsku. Americká FDA a evropská EMA (European Medicines Agency) provedly testování quizartinibu, jeho použití k léčbě však neschválily. (Kidoguch et al., 2021)

2.5.2 Klinicky testované FLT3 inhibitory



Obrázek č. 7: Struktury sorafenibu (A), sunitinibu (B), lestaurtinibu (C), crenolabinu (D)

2.5.2.1 Inhibitory první generace

2.5.2.1.1 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar) byl původně znám pod označením BAY 43-9006 a vyvinut byl za účelem inhibice dráhy RAS-RAF-MEK-ERK. Strukturně jde o biaryl močovinu. (Acharya et al., 2022; Knapper, 2007) (obrázek č. 7A) IC_{50} pro FLT3-ITD je stanovena na $18,5 \text{ nmol.l}^{-1}$, pro FLT3-D835Y více než 2000 nmol.l^{-1} . Sorafenib inhibuje i RAF, VEGFR1,2,3 (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1), PDGFR β , CD117 a RET. (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Sorafenib působí na buněčné linii MV4-11 s mutantní *FLT3-ITD* zástavu buněčného cyklu a indukuje apoptózu. Pro apoptózu více než 50 % buněk je však potřebný v mikromolárních koncentracích. (Auclair et al., 2007) V jiné studii s buněčnou linií Ba/F3, jejíž buňky vykazují mutace *FLT3-ITD*, *FLT3-D835G* a *FLT3-D835Y*, bylo zjištěno následující. Sorafenib byl tisíckrát až třítisícekrát efektivnější v působení zástavy buněčného cyklu a buněčné smrti na buňkách s mutací *FLT3-ITD* a *FLT3-D835G* oproti buňkám s mutantní *FLT3-D835Y*. (Zhang et al., 2008)

Momentálně je schválen pro léčbu jaterního a ledvinového karcinomu. (Wu et al., 2018)

2.5.2.1.2 Sunitinib

Sunitinib (SU11248) je strukturně 3-substituovaný indolinon. (Knapper, 2007) (obrázek č. 7B) IC_{50} sunitinibu má pro FLT3-ITD hodnotu $5,4 \text{ nmol.l}^{-1}$, pro FLT3-D835Y více než 100 nmol.l^{-1} . Vykazuje účinnost i proti VEGFR2, PDGFR β , CD117 a RET (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Významný je krom protinádorového účinku také antiangiogenní účinek (působí proti vzniku cév). (Mendel et al., 2003) V roce 2006 byl schválen FDA k užívání pro léčbu nádorů gastrointestinálního traktu a jater. (Atkins et al., 2006)

Sunitinib inhiboval autofosforylaci receptoru FLT3 v buněčné linii MV4-11 a zároveň negativně ovlivnil fosforylaci proteinů ERK a AKT. Tyto účinky vykazoval po jednododinovém působení v koncentraci 10 - 40 nmol.l^{-1} . Ve stejné buněčné linii působil apoptózu buněk při koncentraci inhibitoru 20 či 40 nmol.l^{-1} . Inhibitoru byly buňky vystaveny 48 hodin. Inhibiční účinek sunitinibu na proliferaci buněk s mutantní FLT3-ITD je možné podpořit použitím RAD001, inhibitoru mTORC2. Tento analog rapamycinu byl aplikován na buňky linie MV4-11 a EOL-1, experimenty na obou liniích

poskytovaly srovnatelné výsledky. Účinek samotného RAD001 na buňky byl zanedbatelný, samotný sunitinib proliferaci buněk inhiboval. Použitím obou látek současně však byla inhibice buněčné proliferace výrazně zesílena. (Ikezoe et al., 2006)

2.5.2.1.3 Lestaurtinib

Lestaurtinib je inhibitor FLT3 dříve známý jako CEP-701. Strukturně je lestaurtinib derivátem indolkarbazolu K252a. (obrázek č. 7C) Původně byl vytvořen za účelem inhibice neurotropinového receptoru TrkA (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1) k léčbě rakoviny prostaty. (George et al., 1999; Acharya et al., 2022) Později byl navržen k využití jako inhibitor FLT3. (Knapper, 2007) IC_{50} pro FLT3-ITD je $8,6 \text{ nmol.l}^{-1}$, pro FLT3-D835Y $9,8 \text{ nmol.l}^{-1}$. Krom inhibice TrkA je účinný také proti JAK2, JAK3, TrkB a TrkC (ATP:L-tyrosin O-fosfotransferasa, tyrosin kinasa, EC 2.7.10.1). (Larrosa-Garcia & Baer, 2017).

V klinické studii byl lestaurtinib podáván perorálně 17 pacientům s nevléčitelnou nebo recidivní AML. U 5 pacientů s nevléčitelnou AML došlo k výraznému snížení množství nezralých krevních buněk v kostní dřeni a periferní krvi. (Smith et al., 2004)

2.5.2.2 Inhibitor druhé generace

2.5.2.2.1 Crenolanib

Crenolanib (CP868596) je selektivní inhibitor vůči PDGFR β , váže se však i ke kinasám třídy III, včetně FLT3. Strukturně je crenolanib benzamidin chinolonovým derivátem. (Acharya et al., 2022) (obrázek č. 7D) IC_{50} pro FLT3-ITD má hodnotu 57 nmol.l^{-1} , pro FLT3-D835Y pak 58 nmol.l^{-1} . (Larrosa-Garcia & Baer, 2017)

Crenolanib je právě ve fázi III testování účinnosti léčby ve spojení s chemoterapií. (Acharya et al., 2022) Výhodou crenolanibu je schopnost inhibovat cíle, které jsou ke quizartinibu a sorafenibu rezistentní. Je tak účinný proti různým substitucím v FLT3-ITD/D835 či FLT3-D835. Vůči mutacím FLT3-ITD/F691L pak vykazuje sníženou aktivitu. Tyto inhibiční schopnosti, charakteristické pro inhibitory typu I, potvrzují jeho zařazení k inhibitorům I. typu.

Cílem syntézy nových potenciálních inhibitorů je vyvinout látky, které budou specifické pro konkrétní receptor a k ostatním receptorům budou inertní. Takovéto inhibitory by pak vykazovaly nižší toxicitu při procesu krvetvorby. Crenolanib je významný dostatečnou selektivitou k FLT3 a výrazně nižší účinností k CD117 a dalším receptorům. Pro buňky linie TF-1 s receptorem CD117 je méně toxický, protože má velmi

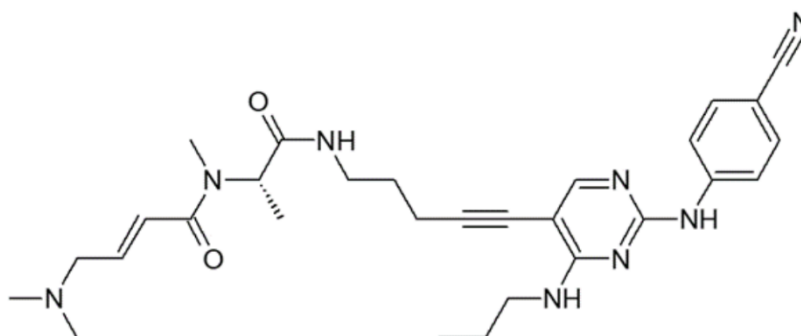
slabý účinek v redukci fosforylace receptoru CD117. Tím je výrazně omezena možnost ovlivnění krvetvorby. (Smith et al., 2014; Warkentin et al., 2014; Galanis et al., 2014)

2.6 NOVÉ PŘÍSTUPY CÍLENÉ INHIBICE FLT3

2.6.1 FF-10101

FF-10101 (obrázek č. 8) je potenciálním léčivem AML, které vyniká tvorbou kovalentní vazby s cysteinovým zbytkem na pozici 695 (C695) receptoru FLT3. To umožňuje blokaci nejen *FLT3-ITD*, ale též *FLT3-TKD* mutací. Významný je inhibiční účinek na sekundární mutace *D835* a *F691*, známé rezistencí například vůči quizartinibu. FF-10101 vykazuje vyšší selektivitu vůči FLT3 v porovnání s ostatními kinasami. (Yamaura et al., 2018)

V místě 693 receptoru FLT3 se nachází tyrozin (*Y693*), který díky interakci aromatického zbytku s FF-10101 umožňuje správnou orientaci inhibitoru k C695 tyrozinkinasy. Substitucí cysteinu za tyrozin *Y693* (*Y693C*) je zabráněno vzniku kovalentní vazby FF-10101 s FLT3, a tak se zvyšuje rezistence FLT3 k potenciálnímu léčivu. V případě substituce tyrozinu za fenylalanin (*Y693F*) nebo serin (*Y693S*) bylo zjištěno následující. Buňky se substitucí *Y693F* si díky aromatickému zbytku fenylalaninu zachovaly citlivost k FF-10101, zatímco buňky obsahující serin (*Y693S*) byly vůči FF-10101 rezistentní. Experiment tedy naznačuje, že jakákoli záměna tyrozinu za nearomatickou aminokyselinu v místě 693 způsobí rezistenci k FF-10101 vlivem nesprávné orientace FLT3. (Ferng et al., 2022)



Obrázek č. 8: Struktura inhibitoru FF-10101

Při použití ve stejné koncentraci jako gilteritinib toto potenciální léčivo vykazuje vyšší míru cytotoxicity. (Feng et al., 2022) Během experimentů na myších bylo účinnější podání FF-10101 v dávce 5 mg/kg dvakrát denně než aplikace 10 mg/kg jednou denně. (Yamaura et al., 2018)

Tento kovalentní inhibitor však nevykazuje jen pozitivní vlastnosti. Jeho nevýhodou je neschopnost inhibovat NRAS mutantní formy buněk, u nichž působí jen mírným potlačením proliferace. Takovéto buňky totiž aktivují MAPK dráhu přispívající k zachování jejich činnosti. (Feng et al., 2022)

2.6.2 PROTAC

Nadějným přístupem, který by mohl překonávat limity momentální AML léčby je vytvoření heterobifunkčního chimérického konjugátu (PROTAC), konceptu známého od roku 2001. (Huang et al., 2018) Konjugát se skládá z hlavice vázající se na cílový protein buňky. (Řezníčková et al., 2022) K ní je přes linker napojen ligand umožňující přiblížení E3 ligasy, tou je většinou CRBN nebo VHL. Typ hlavy komplexu i délka linkeru mají významný vliv na účinnost PROTAC. (Huang et al., 2018) Následně dochází k polyubikvitinaci cílového proteinu a jeho proteosomové degradaci, díky níž je možné účinně blokovat veškeré jeho funkce. (Řezníčková et al., 2022)

Výhodou PROTAC je možnost aplikovat jej v nízkých koncentracích. Vlivem vyšší specifity inhibuje méně ostatních proteinů, takže není ve srovnání s běžně používanými inhibitory tak silně toxický. Použitím v podobě komplexu navíc často vykazuje vyšší účinnost než samotný inhibitor. (Burslem et al., 2018)

První PROTAC cílený na FLT3 byl vyvinut roku 2018. (Burslem et al., 2018) Byl tvořen quizartinibem, přes linker propojeným s VHL ligandem. Následně byla potvrzena účinnost na buněčné linii MV4-11 i Molm-14. Nevýhodou tohoto konkrétního komplexu je neschopnost indukovat degradaci cílového proteinu v případě inverze stereocenter hydroxyprolinu VHL. Toto omezení by se mohlo projevit při aplikaci v živém organismu. (Burslem et al., 2018) V roce 2018 byl vyvinut také PROTAC založený na struktuře quizartinibu, propojeného přes linker s pomalidomidem. Pomalidomid zde slouží jako ligand pro CRBN ubikvitin ligasu. (Huang et al., 2018)

Přestože může mít PROTAC oproti nekonjugovanému quizartinibu až pětikrát nižší aktivitu, je jeho použití namísto quizartinibu celkově výhodnější. (Burslem et al., 2018; Huang et al., 2018)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Chemikálie

- 2-merkapt ethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- akrylamid - AA (VWR, USA)
- aprotinin, lyofilizovaný (Merck, Německo)
- bovinní sérový albumin – BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Merck, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý (Lachema, Česká republika)
- dimethylsulfoxid (DMSO), pro buněčné kultury (Merck, Německo)
- dithiotreitol (DTT) (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný (SDS) ($\geq 98\%$, Lach-Ner, Česká republika)
- ethanol 96% (Lach-Ner, Česká republika)
- fenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Merck, Německo)
- fetální bovinní sérum (FS) (Biowest, Francie)
- fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-Ner, Česká republika)
- glycerol (PENTA, Česká republika)
- glycin ($\geq 99\%$, Merck, Německo)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Penta, Česká republika)
- hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- chemiluminiscenční kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate a West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorid draselný ($\geq 99\%$, Lachema, Česká republika)
- chlorid hořečnatý (hexahydrát, $\geq 98\%$, Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid sodný (Penta, Česká republika)
- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES) ($\geq 98\%$, Merck, Německo)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) ($\geq 98,5\%$, Merck, Německo)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA) ($\geq 97\%$, Merck, Německo)

- kyselina fosforečná 85% (PENTA, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, Česká republika)
- leupeptin, lyofilizovaný (Merck, Německo)
- L-glutamin, pro buněčné kultury (Merck, Německo)
- marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Biowest, Francie)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) ($\geq 99\%$, Merck, Německo)
- N,N'-methylenbisakrylamid (BIS) ($\geq 98\%$, Merck, Německo)
- Nonidet P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Merck, Německo)
- penicilin-streptomycin v 0,9% NaCl, pro buněčné kultury – 10 000 U/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu (Merck, Německo)
- peroxidisíran amonný (APS) ($\geq 98\%$, Merck, Německo)
- PIPES (MP Biomedicals, Čína)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- propidium jodid ($\geq 98\%$, Merck, Německo)
- substrát pro kaspasový test: Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), A1086 (Enzo Life Sciences, Švýcarsko)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) ($\geq 99\%$ Serva, Německo)
- Triton X-100 (Merck, Německo)
- Tween 20 (Merck, Německo)

3.1.2 Roztoky

- APS:10%
- Blokovací roztok: 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20
- Blotovací pufr: 25 mmol \cdot l⁻¹ Tris; 192 mmol \cdot l⁻¹ glycin; v dH₂O
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) H₃PO₄; v dH₂O
- Elektroforetický dělicí gel (10% AA+Bis): 3,125 ml AA+Bis, 2,67 ml dH₂O, 3,5 ml Tris 8,8, 94 μ l 10% SDS, 6,25 μ l TEMED, 37,5 μ l 10% APS
- Elektroforetický dělicí gel (15% AA+Bis): 4,69 ml AA+Bis, 1,11 ml dH₂O, 3,5 ml Tris 8,8, 94 μ l 10% SDS, 6,25 μ l TEMED, 37,5 μ l 10% APS

- Elektroforetický zaostřovací gel (5% AA+Bis): 0,84 ml AA+Bis, 3,51 ml dH₂O, 0,63 ml Tris 6,8, 50 µl 10% SDS, 5 µl TEMED, 30 µl 10% APS
- Fosfátový pufr (PBS): 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,7 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 6,4 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄·12H₂O; pH = 7,4
- Kultivační médium RPMI 1640 doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 U·ml⁻¹; streptomycin 0,1 mg·ml⁻¹; 2 mmol·l⁻¹ L-glutamin
- Lyzační pufr: 10 mmol·l⁻¹ HEPES; 5 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 1 mmol·l⁻¹ EGTA; 0,5% (v/v) Nonidet P40; v dH₂O, pH = 7,4. Před použitím přidáno 1 mmol·l⁻¹ NaF; 1 mmol·l⁻¹ PMSF; 1 mmol·l⁻¹ Na₂VO₃; 1 mmol·l⁻¹ DTT; 2 µg·ml⁻¹ aprotinin; 0,5 µg·ml⁻¹ leupeptin; v dH₂O
- Reakční pufr pro fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3/7: 25 mmol·l⁻¹ PIPES/KOH; pH = 7,3, 2 mmol·l⁻¹ EGTA, 2 mmol·l⁻¹ MgCl₂, před použitím přidán: 5 mmol·l⁻¹ DTT, 100 µmol·l⁻¹ substrát Ac-DEVD-AMC v DMSO
- Roztok akrylamidu (AA+Bis): 30% (w/v) akrylamid + 0,8% (w/v) bisakrylamid v dH₂O
- Roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v dH₂O
- SDS:10%
- Tris – pufr s Tweenem (TBS-T): k TBS přídavek 0,05% (v/v) Tween 20
- Tris-glycinový elektrodový pufr: 25 mmol·l⁻¹ Tris; 192 mmol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS (w/v); v dH₂O; pH = 8,3
- Tris-HCl pH 6,8: 1 mol·l⁻¹ Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 6,8
- Tris-HCl pH 8,8: 1 mol·l⁻¹ Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- Tris-pufr (TBS): 20 mmol·l⁻¹ Tris; 137 mmol·l⁻¹ NaCl; v dH₂O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na výslednou hodnotu 6,8
- Vzorkovací pufr (5x): 0,3 mol·l⁻¹ Tris pH = 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) glycerol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkptoethanol

3.1.3 Biologický materiál

Buněčná linie odvozená od akutní myeloidní leukemie MV4-11 původem ze CLS Cell lines service GmbH (Německo). Buněčná linie odvozená od akutní lymfoblastické leukémie Jurkat původem z Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Německo).

3.1.4 Protilátky

Seznam použitých protilátek a jejich specifikace je uveden v tabulce č. 1 a tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Seznam používaných primárních protilátek s popisem cíle, molekulové hmotnosti, zdroje a klonu, výrobce, ředění

Název cíle	Molekulová hmotnost (kDa)	Protilátka klon/zdroj	Výrobce	Ředění
FLT3	130, 160	králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pFLT3 (Y589/Y591)	130, 160	králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
STAT5	90	králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pSTAT5 (Y694)	90	králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
Erk ½	42, 44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pErk ½ (T202/Y204)	42, 44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
PARP-1	113, 89	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:1 000
Kaspasa 7 fragment	20	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
PCNA	37	myší monoklonální	Dr. B. Vojtěšek (Masarykův onkologický ústav)	1:500

Tabulka č. 2: Seznam používaných sekundárních protilátek s popisem výrobce a ředění

Protilátka	Výrobce	Ředění
HRP-konjugovaná prasečí Ig proti králičí Ig (SWAR)	Cell Signalling (USA)	1:1 000
HRP-konjugovaná krysí Ig proti myší Ig (RAM)	Cell Signalling (USA)	1:1 000

3.1.5 Inhibitory

V experimentální části bakalářské práce byly testovány biologické účinky nového imidazopyridazinového FLT3 inhibitoru LGR8498, který byl připraven dr. Petrou Břehovou z Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB) v Praze. Chemická struktura a čistota této látky byla potvrzena pomocí standardně používaných fyzikálně-chemických metod v ÚOCHB. Z důvodu případné přípravy patentové přihlášky nebude struktura testované látky LGR8498 v bakalářské práci uvedena.

Jako referenční látky byly v experimentech používány komerčně dostupné sloučeniny quizartinib (MedChemExpress, USA), bortezomib (Merck, Německo) a doxorubicin (Merck, Německo).

Všechny studované látky byly rozpuštěny v DMSO a dále dle potřeby ředěny do kultivačního média. Výsledná koncentrace DMSO v buněčných experimentech nikdy nepřesáhla koncentraci 0,1 %.

3.1.6 Přístrojové vybavení a příslušenství

- aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- blokový termostat MBR 250 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- centrifuga BR4i (Jouan, Francie)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- flowbox BIO130 A2 – II BSC (Alpina, Polsko)
- fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Labsystems Diagnostics, Finsko)
- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka RCT Basic (IKA, Německo)
- mikrocentrifuga iFuge M08 (Neuaton, Indie)
- odsávač FLASK-TRAP 2i (Biosan, Lotyšsko)
- průtokový cytometr BD FACSVersé (BD Biosciences, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- stolní centrifuga Centrifuge 5702 R (Eppendorf, Německo)
- třepačka VORTEX WIZARD (VELP Scientifica, Itálie)
- váha 440-33N (Kern, Německo)
- váha EMS (Kern, Německo)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Používané spotřební zboží: sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika), sterilní Petriho misky s průměrem 10 cm a 5 cm (TPP, Švýcarsko), mikrozukavky 0,6 ml, 1,5 ml, 5 ml (Eppendorf, Německo), nitrocelulosová membrána pro western blot (Bio-Rad, USA), Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika).

Používané běžné laboratorní vybavení: kádinky, zkumavky, odměrné válce, skleněné tyčinky, chemické lžičky, váženky, špičky, stříčky, stojany na mikrozukavky a zkumavky, odměrné válce, skalpely, pinzety apod.

3.2 METODY

3.2.1 Kultivace nádorových buněk a sklizení

Během experimentu byly použity buňky linie MV4-11 a Jurkat. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 obsahujícím 10% fetální sérum, penicilin (100 U.ml^{-1}), streptomycin ($0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$) a glutamin (2 mmol.l^{-1}). Kultivace probíhala při $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 100% vlhkosti vzduchu v atmosféře s 5% oxidem uhličitým.

Pro biologické experimenty byly buňky vysazeny do Petriho misek v počtu 7 milionů buněk v 8 ml kultivačního média pro proteinovou analýzu a 2 miliony buněk v 5 ml kultivačního média pro cytometrickou analýzu. Buňky byly ovlivněny testovanými inhibitory po dobu 1 nebo 24 hodin. Inhibitory (quizartinib a LGR8498) byly ve všech provedených experimentech aplikovány v koncentracích 0 nmol.l^{-1} (CTRL), $0,2 \text{ nmol.l}^{-1}$, 1 nmol.l^{-1} , 5 nmol.l^{-1} , 25 nmol.l^{-1} , 125 nmol.l^{-1} . Rozpouštědlem pro ředění protilátek bylo DMSO, které bylo aplikováno v odpovídajícím množství do kontrolních vzorků.

3.2.2 Lyzace buněk

Buňky určené k immunoblotting procházely díky působení lyzačního pufru po dobu 30 minut procesem lyzace. Následně byly vzorky 30 minut centrifugovány při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, zrychlení $17\,000 \text{ g}$ a odebraný supernatant byl použit ke stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou. Ke kvantifikaci bylo využito spektrofotometrické detekce při vlnové délce 595 nm .

Poté došlo podle vzorku s nejnižší koncentrací k naředění ostatních vzorků lyzačním pufrům. Ke vzorkům byl přidán 5x SDS pufr, s nímž byly vzorky vortexovány a zahřívány 5 minut v termobloku při $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Po zahřátí byly zamrazeny na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek, western blotting a imunodetekce

Rozehřáté vzorky (3 minuty při 95 °C) byly separovány v polyakrylamidovém gelu. Pro separaci byly použity dva různě koncentrované dělicí gely. Gel s 10% a 15% zastoupením AA+Bis a 5% zaostřovací gel. Šířka všech gelů byla 1 mm. Separace byla urychlena průchodem elektrického proudu. Napětí 80 V bylo aplikováno během průchodu vzorků zaostřovacím gelem, poté bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po průchodu vzorků celým gelem byla separace ukončena.

Při western blottingu, zajišťujícím přenos elektroforeticky rozdělených proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu, bylo použito napětí 280 mA. Děj probíhal 3 hodiny za chlazení, po 1,5 hodině byla vyměněna nádoba s ledem.

Po western blottingu byla membrána vložena do roztoku Ponceau S, pomocí něhož došlo k reverzibilnímu obarvení proteinů. Následně byly z membrány pomocí markeru molekulové hmotnosti vyříznuty pruhy se studovanými proteiny. Ty pak byly podrobeny immunoblottingu. Byly vloženy do 4% roztoku BSA v TBS s Tween 20, kde se po dobu 1 hodiny membrána blokovala proti nespecifickým vazbám protilátek. Po zablokování byla membrána opláchnuta v 1x PBS. Primární protilátka byla naředěna v roztoku BSA. Membrány byly s protilátkou inkubovány v lednici přes noc. Po ukončení inkubace byla membrána promývána v TBS a TBS s 0,1% Tween 20. V roztoku BSA byla naředěna sekundární protilátka. Se sekundární protilátkou byly membrány inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Inkubaci následovalo promývání membrány v TBS a TBS s 0,1% Tween 20.

Pro chemiluminiscenční detekci byly membrány pokryty směsí peroxidu vodíku a luminolu (1:1). Signál chemiluminiscence byl následně detekován pomocí CCD kamery LAS-4000 v různých časových intervalech. Záznam byl zpracován programem Multi Gauge 2.2 (Fujifilm, Japonsko).

3.2.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Buňky byly nejprve promyty PBS, následně resuspendovány ve 100 µl PBS a zafixovány 70% etanolem, který byl za pomalého míchání postupně přikapáván. Zkumavky s buňkami byly zamrazeny a dále použity při analýze buněčného cyklu.

Zamražené buňky byly centrifugovány (8 minut, teplota 4 °C, 1 000 g) a suspendovány v PBS. Po další centrifugaci byl supernatant opět odsán a buňky byly suspendovány v 600 µl předem připravené směsi PBS a propidium jodidu, výsledná koncentrace

propidium jodidu byla $0,01 \text{ mg.ml}^{-1}$. Vzorke byly inkubovány 30 minut ve tmě za občasného promíchání. Po uplynutí 30 minut byly vzorky podrobeny analýze buněčného cyklu. Průtokový cytometr využíval excitační laser s vlnovou délkou 488 nm, emitované záření mělo délku 560 nm a vyšší. Výsledky byly zpracovány programem ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA).

3.2.5 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3/7

Buněčné lyzáty, získané během lyzace buněk pro immunoblotting, byly pipetovány do mikrotitrační destičky v množství $15 \mu\text{g}$ na jamku. Do každé jamky bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ reakčního pufru pro stanovení aktivity kaspasy 3/7 (kaspasa-3, EC 3.4.22.56, kaspasa-7, EC 3.4.22.60). Takto připravené vzorky byly inkubovány ve tmě (4 hodiny, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Nakonec byla změřena fluorescence readerem pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Labsystems Diagnostics, Finsko).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

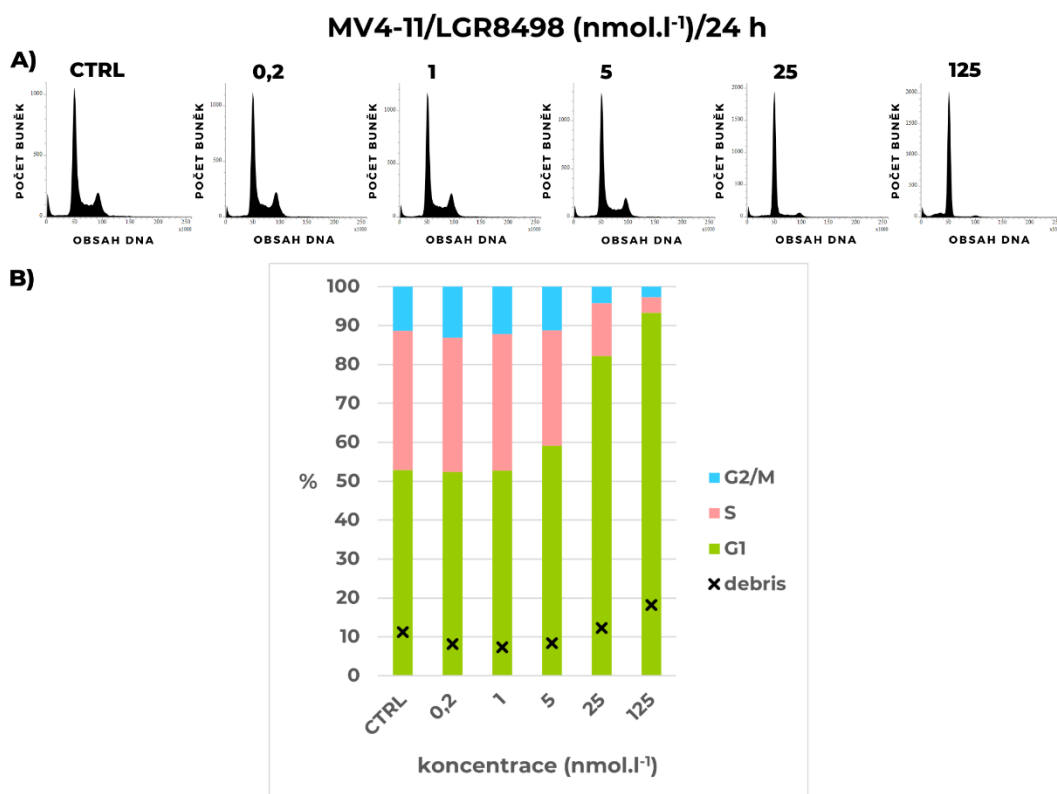
4.1 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Buněčný cyklus je dělen do čtyř fází, fáze G1, S, G2, M. Klidový režim buňky je pak označován jako fáze G0. Každá fáze má své typické rysy. Hlavním rysem S fáze je významný nárůst množství DNA vlivem replikace. Množství DNA se však mění charakteristicky s jednotlivými fázemi, a právě toho je možné využít k určení fáze buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. V takzvané subG1 fázi (debris) se vyskytují buňky, které prošly buněčnou smrtí.

Průtokový cytometr je přístroj umožňující analýzu jednotlivých buněk v krátkém časovém úseku. Vzorek je v něm ozařován paprskem, který je rozptýlen nebo lomen do strany. Příčný rozptyl světla je zaznamenán detektorem, poskytujícím informaci o velikosti ozařované částice. Boční rozptyl světla zaznamenává detektor, monitorující strukturní charakter částice. Detektory mohou být uzpůsobeny pro práci s fluorescenčním zářením. Toho se využívá při kvantifikaci DNA, kterou je možné značit fluorescenčním interkalačním činidlem, propidium jodidem.

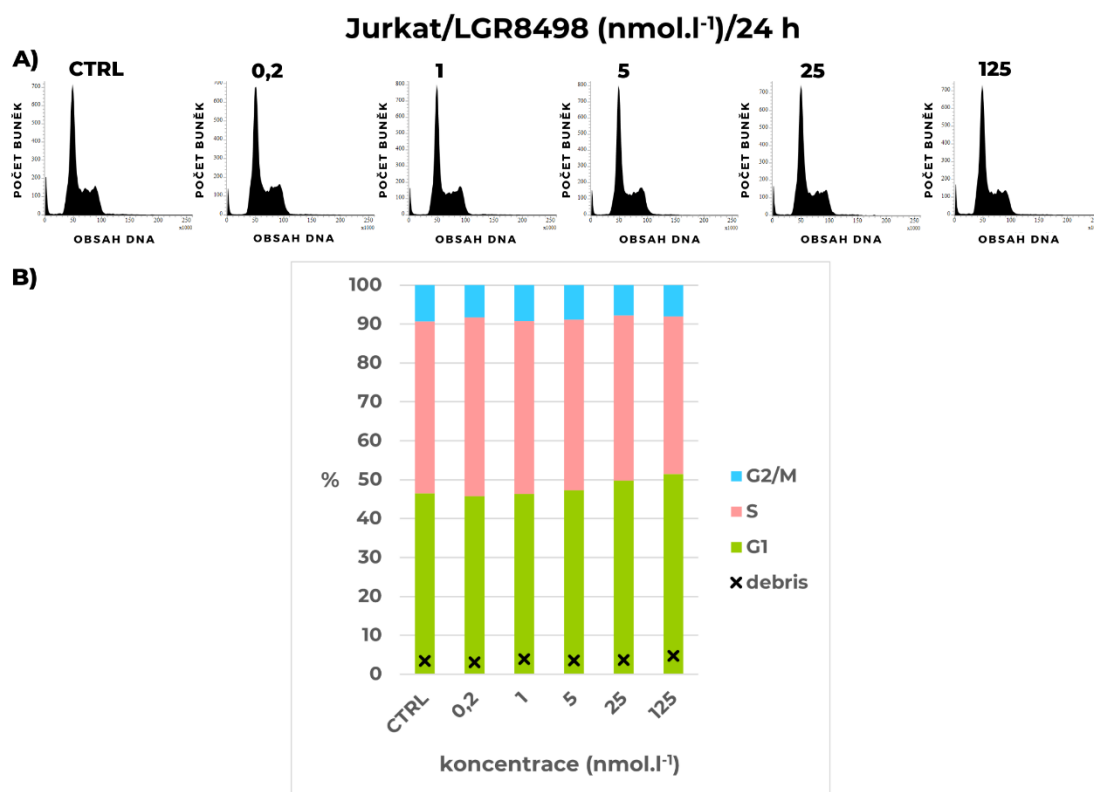
Experimenty byly prováděny na dvou lidských nádorových buněčných liniích, liniích MV4-11 a Jurkat. MV4-11 je linie odvozená od akutní myeloidní leukemie s *FLT3-ITD* mutací. Vzhledem ke známé závislosti této linie na FLT3 způsobuje inhibice této kinasy inhibici podřízených drah FLT3, inhibici buněčné proliferace, a nakonec i řízenou buněčnou smrt. (Auclair et al., 2007) Pro srovnání byla vybrána linie Jurkat, odvozená od akutní lymfoblastické leukemie. U této linie není popsána žádná aktivační mutace v genu FLT3, tudíž by tyto buňky neměly být k cílené inhibici FLT3 citlivé.

Linie byly po dobu 24 hodin podrobeny působení dvou FLT3 inhibitorů o koncentracích 0 nmol.l⁻¹ (CTRL), 0,2 nmol.l⁻¹, 1 nmol.l⁻¹, 5 nmol.l⁻¹, 25 nmol.l⁻¹, 125 nmol.l⁻¹. FLT3 inhibitory jsou schopné svým působením indukovat zablokování buněčného cyklu FLT3 závislých buněk v G1 fázi. (Cilibrasi et al., 2022) Jedním z použitých inhibitorů byla nově syntetizovaná látka LGR8498, u níž byla v naší laboratoři již dříve potvrzena účinnost vůči *FLT3-ITD* mutaci. Pro srovnání biologických účinků nové látky byl použit komerčně dostupný inhibitor, quizartinib. Ten je známý inhibicí buněčné proliferace a schopností iniciace apoptózy buněk linie MV4-11 či Molm-14 vlivem inhibice mutovaného receptoru FLT3. (Kampa-Schittenhelm et al., 2013)



Obrázek č. 9: A) Cytometrická analýza buněk linie MV4-11 po vystavení vlivu LGR8498 po 24 h. B) Graf znázorňující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po působení LGR8498.

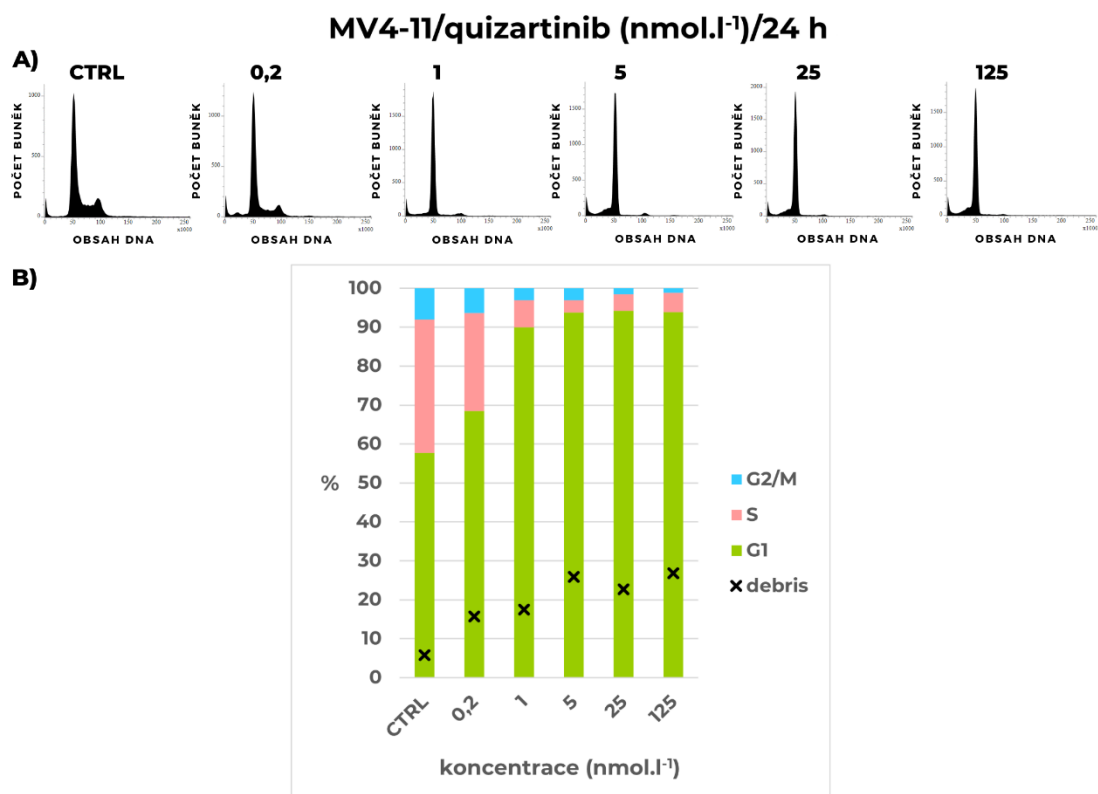
Analýza buněčného cyklu linie MV4-11 po ovlivnění látkou LGR8498 (obrázek č. 9) prokázala, že se zvyšující se koncentrací testované látky dochází k postupnému zvyšování počtu buněk v G1 fázi buněčného cyklu za současného poklesu počtu buněk v S a G2/M fázi. Zatímco kontrolní vzorek měl zastoupení buněk v G1 fázi 53 %, působením 5nmol.l⁻¹ koncentrace LGR8498 došlo k navýšení počtu buněk v G1 fázi téměř na 60 %. Významný nárůst počtu buněk v G1 fázi je zjevný při 25nmol.l⁻¹ koncentraci látky, kdy se v G1 fázi vyskytuje přes 80 % testovaných buněk. Po působení nejvyšší testované koncentrace (125 nmol.l⁻¹) se zastoupení buněk v G1 fázi blížilo téměř 95 % a je rovněž patrné nejvyšší zastoupení buněk v subG1 fázi buněčného cyklu (téměř 20 %), což by mohlo naznačovat indukci buněčné smrti.



Obrázek č. 10: A) Cytometrická analýza buněk linie Jurkat po vystavení vlivu LGR8498 po 24 h. B) Graf znázorňující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po působení LGR8498.

Analýzou buněčného cyklu linie Jurkat po ovlivnění látkou LGR8498 (obrázek č. 10) bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací testované látky nedochází k žádným významným změnám v distribuci analyzovaných buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Rovněž zastoupení buněk v subG1 fázi vykazuje ve všech analyzovaných vzorcích jednotkové zastoupení, proto nelze uvažovat o vlivu testované látky na indukci buněčné smrti.

Závěrem lze potvrdit účinnost látky LGR8498 v nanomolárních koncentracích vůči linii MV4-11, vyznačující se přítomností *FLT3-ITD* mutace. Vůči linii Jurkat je látka LGR8498 neúčinná.

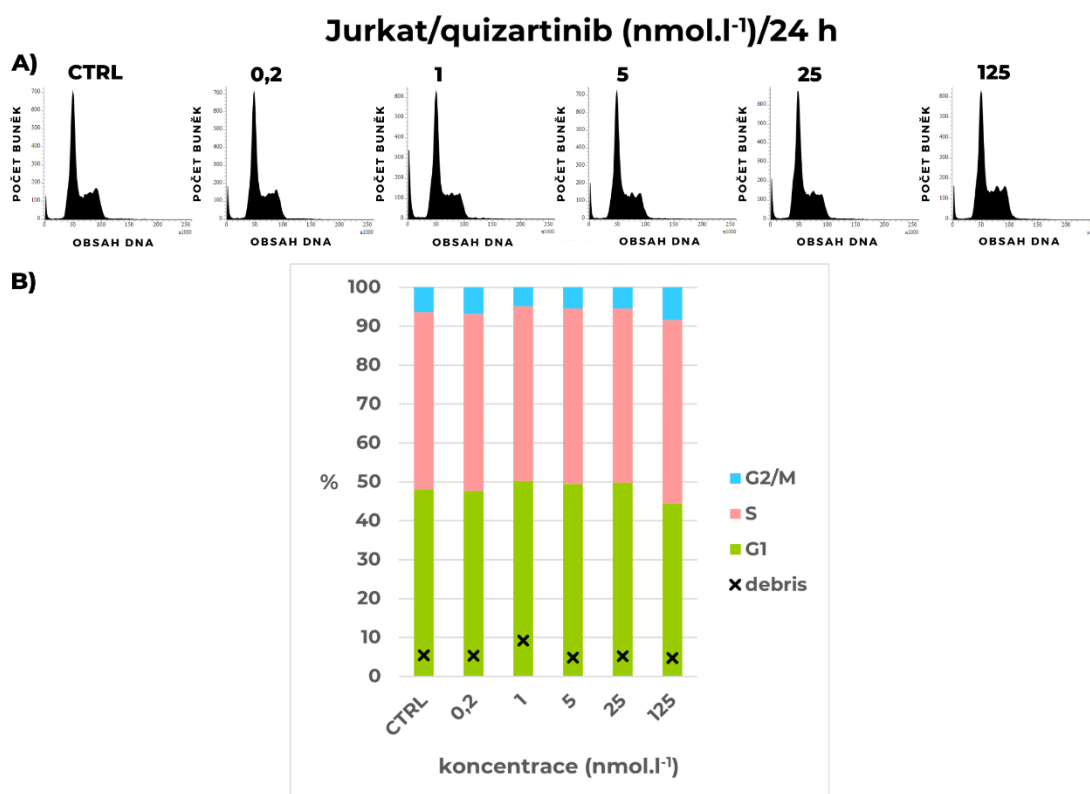


Obrázek č. 11: A) Cytometrická analýza buněk linie MV4-11 po vystavení quizartinibu po 24 h. B) Graf znázorňující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po působení LGR8498.

Pro srovnání účinnosti LGR8498 byl jako standard zvolen klinicky testovaný inhibitor FLT3, quizartinib (obrázek č. 11). Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací testované látky dochází k výraznému zvyšování počtu buněk v G1 fázi buněčného cyklu a současnému snižování počtu buněk v S a G2/M fázi. Zastoupení buněk v G1 fázi buněčného cyklu v kontrolním vzorku bylo 58%, tato hodnota je srovnatelná s experimentem pro látku LGR8498. Již při koncentraci quizartinibu 0,2 nmol.l⁻¹ narostla hodnota zastoupení buněk v G1 fázi přibližně o 10 %. Při 1nmol.l⁻¹ koncentraci quizartinibu bylo pozorováno významné navýšení množství buněk v G1 fázi na 90 % buněk. Působením 5nmol.l⁻¹ koncentrace quizartinibu narostlo množství buněk v G1 fázi přibližně na 95 % a tato hodnota zůstala neměnná i při vyšších koncentracích (25 nmol.l⁻¹ a 125 nmol.l⁻¹). Se zvyšující se koncentrací quizartinibu se zvyšuje také počet buněk v subG1 fázi. Nárůst o 10 % je zjevný mezi koncentracemi 0 nmol.l⁻¹ a 0,2 nmol.l⁻¹. Zastoupení buněk subG1 fáze je po působení quizartinibu v koncentraci 0,2 nmol.l⁻¹ a 1 nmol.l⁻¹ téměř srovnatelné. Další nárůst v počtu buněk subG1 fáze nastal při koncentraci 5 nmol.l⁻¹, kde množství buněk dosahuje srovnatelně se 125nmol.l⁻¹ koncentrací téměř 30 %. Jelikož jsou tyto dvě hodnoty shodné, mírný propad v množství

buněk subG1 fáze při 25nmol.l^{-1} koncentraci je přisuzován experimentální chybě. Zatímco kontrolní vzorek měl zastoupení buněk v subG1 fázi téměř 10%, vzorek po ovlivnění quizartinibem v nejvyšší testované koncentraci (125 nmol.l^{-1}) má zastoupení buněk v subG1 fázi téměř 30%. To by mohlo značit indukci buněčné smrti. Inhibice buněčné proliferace quizartinibem byla pozorována i na buňkách linie Molm-14 s *FLT3 - ITD* mutací. Quizartinib však na této linii nepůsobí tak silným antiproliferačním účinkem jako na linii MV4-11. (Sexauer et al., 2012)

Při analýze buněčného cyklu linie Jurkat po ovlivnění quizartinibem (obrázek č. 12) o vybraných koncentracích nedocházelo k žádným významným změnám v počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Zastoupení buněk v subG1 fázi zůstává téměř neměnné a nabývá hodnoty okolo 5 %, proto nelze uvažovat možnost buněčné smrti. Zvýšená hodnota zastoupení subG1 fáze při koncentraci 1 nmol.l^{-1} je pouze chybou měření, jelikož hodnoty pro koncentrace $0,2\text{ nmol.l}^{-1}$ a 5 nmol.l^{-1} jsou shodné.



Obrázek č. 12: A) Cytometrická analýza buněk linie Jurkat po vystavení quizartinibu po 24 h. B) Graf znázorňující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po působení LGR8498.

Tímto byla potvrzena účinnost quizartinibu v nanomolárních koncentracích vůči linii MV4-11, vyznačující se přítomností *FLT3-ITD* mutace. Vůči linii Jurkat je quizartinib neúčinný. Výsledky analýzy byly porovnány s experimentem Cilibrasiho. V jeho experimentu byly použity buňky stejné linie (MV4-11), které byly taktéž ovlivněny quizartinibem, působícím po dobu 24 hodin tak, jako tomu bylo při měření v této bakalářské práci. Calibrasim byla koncentrace quizartinibu působícího inhibičně na buněčný cyklus buněk linie MV4-11 s mutantní *FLT3-ITD* stanovena na $0,9 \pm 0,02 \text{ nmol.l}^{-1}$. Měření v této bakalářské práci tedy koresponduje s publikovanými daty. (Cilibrasi et al., 2022)

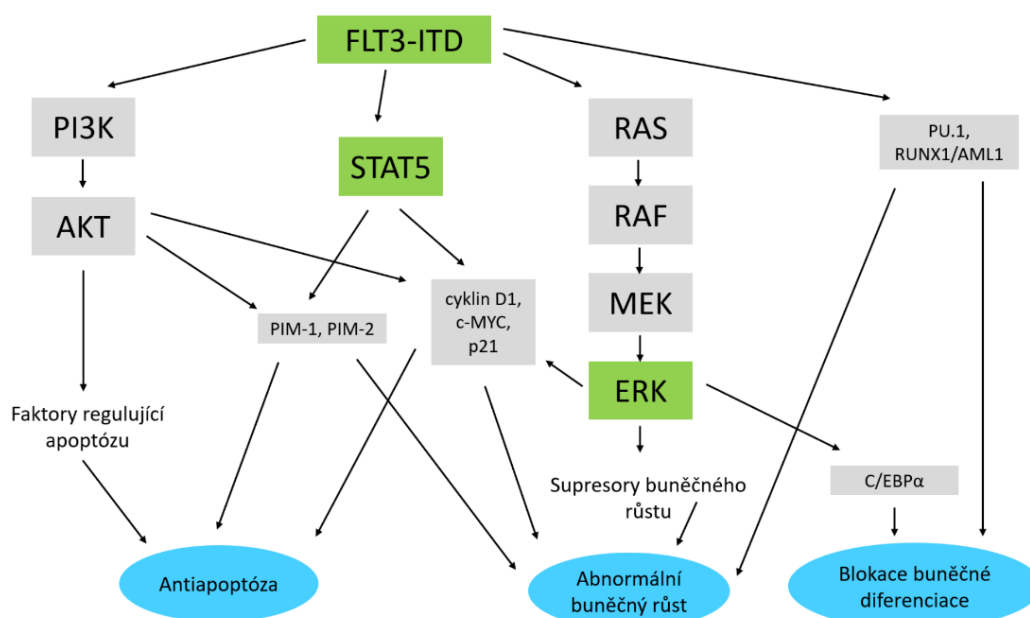
Při porovnávání vlivu inhibitoru LGR8498 a quizartinibu na buněčný cyklus buněk linie MV4-11 je jednoznačné, že quizartinib ovlivňuje buněčný cyklus již při nižších koncentracích. Významnější vliv oproti látce LGR8498 vykazuje až do koncentrace 25 nmol.l^{-1} . Při koncentraci 125 nmol.l^{-1} je však jejich schopnost zásahu do buněčného cyklu shodná.

Ačkoli je quizartinib v tomto experimentu účinnější, látka LGR8498 přesto dosahuje výborných výsledků díky její účinnosti již při nanomolárních koncentracích. Absence změn buněčného cyklu linie Jurkat po ovlivnění LGR8498 naznačují, že látka neovlivňuje proliferaci buněk bez *FLT3* mutace, a tudíž vykazuje dobrou selektivitu vůči *FLT3-ITD* pozitivním buňkám.

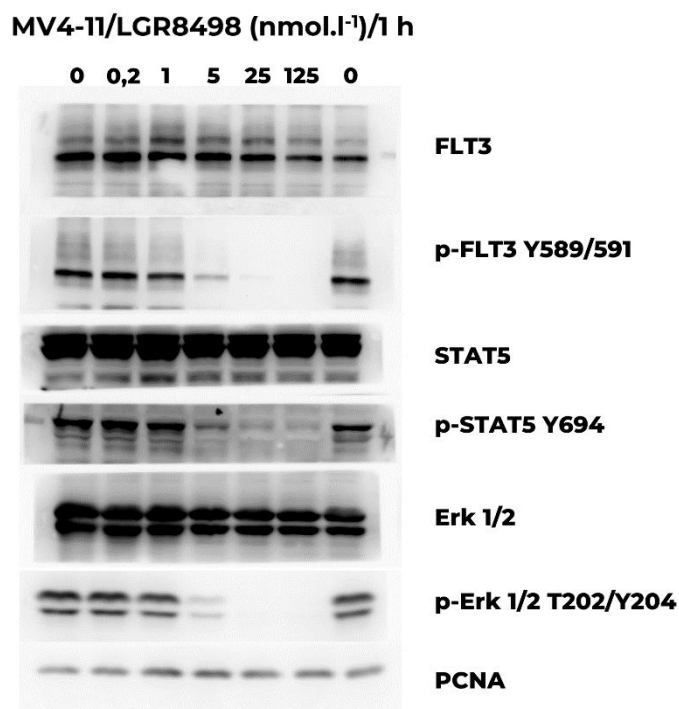
4.2 ANALÝZA EXPRESE PROTEINŮ POMOCÍ IMMUNOBLOTTINGU

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, FLT3 má vliv na množství podřízených signálních drah. Analýzou vybraných proteinů je tak možné určit, zda byla inhibice FLT3 úspěšná, či nikoli. Na obrázku č. 13 je znázorněno schéma s některými proteiny podřízených drah.

Immunoblotting byl prováděn na linii MV4-11. Linie byla vystavena po dobu 1 hodiny působení dvou FLT3 inhibitorů o koncentracích 0 nmol.l^{-1} (CTRL), $0,2 \text{ nmol.l}^{-1}$, 1 nmol.l^{-1} , 5 nmol.l^{-1} , 25 nmol.l^{-1} , 125 nmol.l^{-1} . Použitými inhibitory byly látka LGR8498, pro srovnání síly inhibičního účinku na linii MV4-11 byl použit komerčně dostupný inhibitor quizartinib.

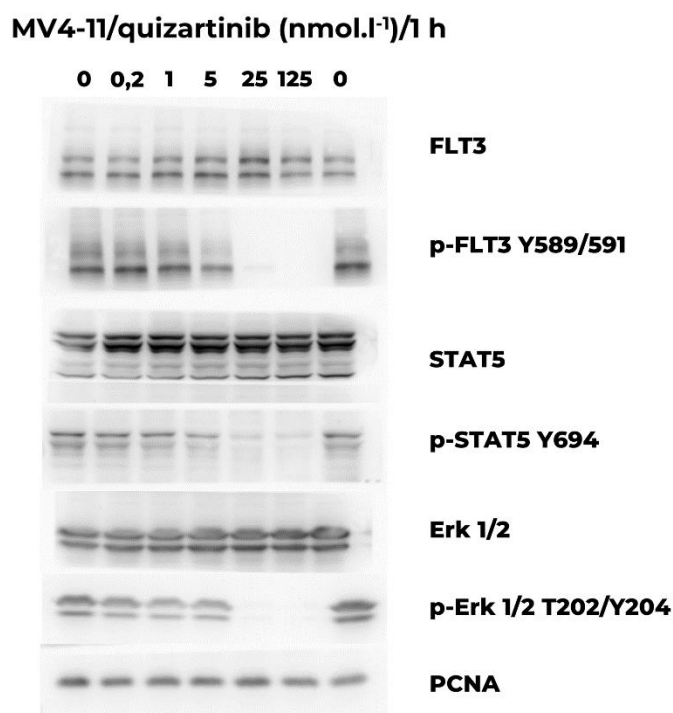


Obrázek č. 13: Některé z podřízených drah kinas FLT3. Zeleně jsou vyznačeny studované proteiny. (Takahashi, 2011), upraveno



Obrázek č. 14: Imunodetekce proteinů z buněk linie MV4-11 vystavené působení inhibitoru LGR8498 (nmol.l⁻¹) po dobu 1 hodiny. PCNA slouží jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků.

Immunoblottingem na linii MV4-11 po ovlivnění látkou LGR8498 (obrázek č. 14) bylo prokázáno následující. Působením 5nmol.l⁻¹ koncentrace látky LGR8498 došlo k významnému snížení fosforylace FLT3 v místech Y589/591, která jsou FLT3 autofosforylačními místy. Se zvyšující se koncentrací testované látky pak došlo k úplnému vymizení fosforylace FLT3. Koncentračně-závislý vliv působení látky LGR8498 byl zjevný i v případě podřízených drah, MAPK/ERK a STAT5 dráhy, kdy byla pozorována významná redukce míry fosforylace na Y694 proteinu STAT5 i T202/Y204 proteinu ERK1/2. Přestože fosforylace proteinu STAT5 nebyla ani při 125nmol.l⁻¹ koncentraci látky LGR8498 redukována úplně, byl pozorován významný pokles fosforylace. Úplné vymizení fosforylace proteinu ERK1/2 v místě T202/Y204 se projevilo při 25nmol.l⁻¹ a 125nmol.l⁻¹ koncentraci. Při koncentraci 5 nmol.l⁻¹ fosforylace proteinu ERK1/2 ztelně poklesla.



Obrázek č. 15: Imunodetekce proteinů z buněk linie MV4-11 vystavené působení komerčního inhibitoru quizartinibu (nmol.l⁻¹) po dobu 1 hodiny. PCNA slouží jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků.

Působením 5nmol.l⁻¹ koncentrace quizartinibu na linii MV4-11 (obrázek č. 15) došlo při immunoblottingu ke zdatelné redukci fosforylace receptoru FLT3 v autofosforylačních místech Y589/591. Experiment Aikawy potvrzuje, že při delším působení inhibitoru na buněčnou linii je fosforylace receptoru FLT3 inhibována již při nižších koncentracích quizartinibu. (Aikawa et al., 2020) Se vzrůstající koncentrací inhibitoru se fosforylace snižovala natolik, že při 125nmol.l⁻¹ koncentraci quizartinibu bylo dosaženo její úplné redukce. Stejně jako u látky LGR8498 bylo i zde pozorováno koncentračně-závislé působení inhibitoru na fosforylaci podřízených drah MAPK/ERK a STAT5. Významnější pokles fosforylace se v místě Y694 proteinu STAT5 projevil při koncentracích 25 nmol.l⁻¹ a 125 nmol.l⁻¹. Jsou-li buňky ovlivněny quizartinibem o jednu hodinu déle, je možné docílit úplné redukce fosforylace proteinu STAT5, a to již při 4nmol.l⁻¹ koncentraci. (Aikawa et al., 2020) Šíření fosforylačního signálu na proteinu ERK mírně pokleslo při koncentracích 0,2 nmol.l⁻¹, 1 nmol.l⁻¹ a 5 nmol.l⁻¹. Úplné redukce bylo dosaženo použitím 25nmol.l⁻¹ a 125nmol.l⁻¹ koncentrace quizartinibu.

Vědecká skupina Pratze prokázala inhibici autofosforylace na mutovaném receptoru FLT3 při 1nM koncentraci quizartinibu, takže potvrdila jeho účinnost v nanomolárních koncentracích. Výsledky účinnosti quizartinibu tedy korespondují s publikovanými daty.

Důvodem, proč je v experimentu Pratz quizartinib účinný již při 1nM, přestože v této práci účinkoval až při 5nM koncentraci, je pravděpodobně použití odlišné buněčné linie, Molm-14. (Pratz et al., 2010)

Quizartinib testovaný na buněčné linii MV4-11 byl porovnáván s dalšími látkami včetně sorafenibu, sunitinibu, lestaurtinibu a midostaurinu. Nejnižší hodnotu IC_{50} pro inhibici autofosforylace FLT3 měl právě quizartinib, který byl aktivní v $1,1\text{nmol.l}^{-1}$ koncentraci. Následován byl lestaurtinibem ($IC_{50} = 1,5\text{ nmol.l}^{-1}$) a poté sorafenibem ($IC_{50} = 2\text{ nmol.l}^{-1}$). (Zarrinkar et al., 2009)

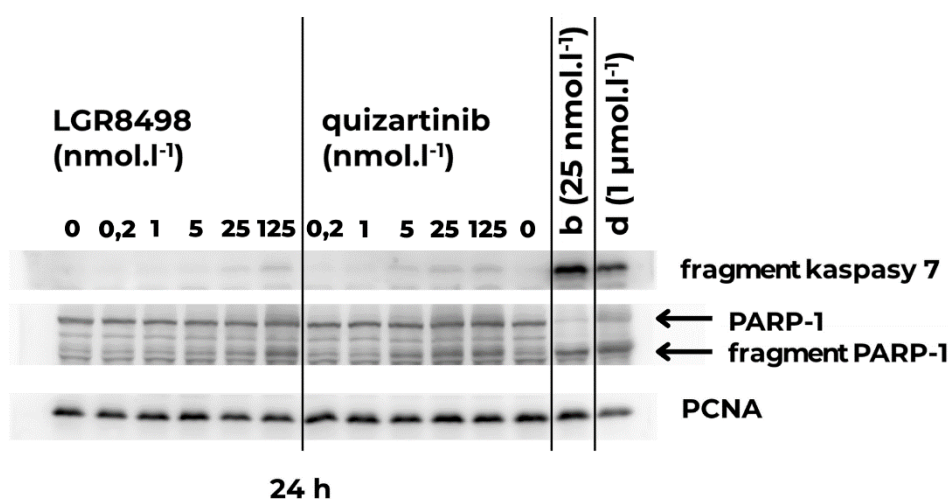
Látka LGR8498 po působení na buněčné linii MV4-11 a analýze proteinů pomocí immunoblottingu dosahuje výsledků blízkých quizartinibu. Oba inhibitory působí od 5nmol.l^{-1} koncentrace postupný pokles fosforylace proteinu p-FLT3 Y589/591, při 125nmol.l^{-1} koncentraci pak působí její úplné vymizení. Koncentračně-závislý vliv působení obou látek se projevil i v případě podřízených drah, MAPK/ERK a STAT5 dráhy. Významná redukce míry fosforylace byla pozorována na Y694 proteinu STAT5, jakož i na T202/Y204 proteinu ERK1/2. Významnějšího snížení fosforylace proteinu STAT5 dosahují inhibitory při 25nmol.l^{-1} a 125nmol.l^{-1} koncentraci. Úplné vymizení fosforylace na proteinu ERK1/2 se projevilo při 25nmol.l^{-1} a 125nmol.l^{-1} koncentraci obou inhibitorů.

4.3 AKTIVACE APOPTÓZY

Aktivace apoptózy byla nejprve studována metodou immunoblottingu. Testování proběhlo na buněčné linii MV4-11, jejíž výsledky nárůstu počtu buněk v subG1 fázi buněčného cyklu naznačovaly možnost iniciace apoptózy. Proto byly testovány inhibitory FLT3, používané již při cytometrické analýze buněčného cyklu, tedy látka LGR8498 a quizartinib. Pro srovnání síly apoptotického účinku byly vybrány dvě komerčně používané látky. Přestože se látky liší mechanismem inhibičního účinku, jejich působení vede ke stejnému cíli, apoptóze. První látkou byl bortezomib, inhibitor proteasomu. Inhibitory proteasomu blokují funkční proteasom, takže v něm nedochází k degradaci proteinů. Ubikvitinylované proteiny se hromadí v buňce, a tak vytváří buněčný stres, který nakonec vede ke spuštění apoptózy. (de Wilt et al., 2011) Druhou látkou byl doxorubicin, inhibitor DNA topoisomeras II (ATP-hydrolasa, EC 5.6.2.2) a běžně používané chemoterapeutikum. Doxorubicin zabraňuje reparaci DNA po replikaci, což následně vede k apoptóze. (Swift et al., 2006) Působení inhibitorů byly buňky vystaveny po dobu 24 hodin.

Analyzován byl protein PARP-1 (NAD⁺:poly(ADP-D-ribosyl)-akceptor ADP-D-ribosyl-transferasa, EC 2.4.2.30) a jeho fragment sloužící jako marker apoptózy. Hlavní úlohou PARP-1 v buňce je oprava poškozené DNA, PARP-1 se však podílí také na transkripci. Dojde-li v buňce k rozsáhlému poškození DNA, je pro buňku energeticky výhodnější spustit proces programované buněčné smrti. Jedna z možných drah vedoucí k apoptóze je kaspasová kaskáda. Protein PARP-1 je kaspasami štěpen na dvě části. Větší z nich, zde označovaná jako fragment PARP-1, má velikost 89 kDa. (Chaitanya et al., 2010) Dalším analyzovaným proteinem byl fragment aktivní kaspasy 7 signalizující aktivaci kaspasové dráhy.

Při immunoblottingu na linii MV4-11 ovlivněné látkou LGR8498 (obrázek č. 16) se s koncentrací zvyšuje také intenzita signálu pro fragment kaspasy 7. Stejný výsledek můžeme pozorovat i při působení quizartinibu. Quizartinib však indukuje apoptózu ve srovnání s látkou LGR8498 o stejné koncentraci účinněji. Žádný z testovaných FLT3 inhibitorů však nezpůsobil tak výraznou aktivaci kaspasy 7 jako bortezomib a doxorubicin, látky použité jako pozitivní kontroly. Štěpení PARP-1 koreluje ve všech analyzovaných vzorcích s aktivací kaspasy 7. Tým Gunawardanové provedl identické testování, v němž se shodovaly délka expozice quizartinibu i buněčná linie. Výsledkem jejich práce bylo štěpení PARP-1 na aktivní PARP-1 fragment. V tomto se naše výsledky shodují. Diference se projevuje ve snížení intenzity signálu neaktivního proteinu PARP - 1 po jeho štěpení na aktivní fragment, který může být zapříčiněn odlišnými použitými protilátkami. (Gunawardane et al., 2013)



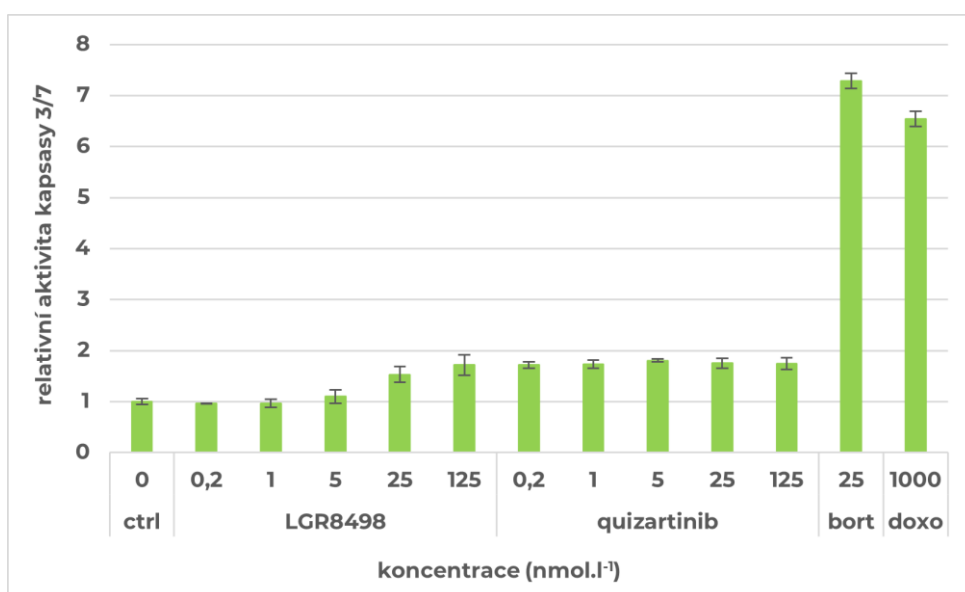
Obrázek č. 16: Analýza aktivace apoptózy metodou immunoblottingu na linii MV4-11 ovlivněné po dobu 24 hodin látkou LGR8498, quizartinibem, bortezomibem (b) a doxorubicinem (d). PCNA slouží jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků.

Látky LGR8498 a quizartinib poskytují v iniciaci apoptózy buněk linie MV4-11 obdobné výsledky. Rozdílem je schopnost quizartinibu působit již v nižších koncentracích. S jejich narůstající koncentrací vzrůstá jak množství aktivované kaspasy 7, vedoucí k aktivaci apoptózy, tak i množství fragmentu PARP-1, markeru apoptózy. Indukce apoptózy je však velmi slabá.

Pro nezávislé ověření správnosti výsledků získaných immunoblottingem byl dále proveden kaspasový test. Kaspasy jsou klíčové enzymy apoptotické kaskády. Principem stanovení aktivity kaspasy 3/7 v této práci je proteolytické štěpení kaspasově specifického peptidu (Acetyl-DEVD) konjugovaného s fluorescenční látkou, 7-amido-4-trifluormethylkumarinem (AMC). Proteolyticky odštěpenou AMC je možné detekovat zářením o vlnové délce 442 nm. Po interakci se zářením emituje AMC fluorescenční signál délky 346 nm. Aktivita kaspasy 3/7 je přímo úměrná tomuto fluorescenčnímu signálu.

Pro určení aktivity kaspasy 3/7 byla použita linie MV4-11 ovlivněná opět LGR8498, quizartinibem, bortezomibem a doxorubicinem.

S koncentrací LGR8498 roste i aktivita kaspasy 3/7 (obrázek č. 17). Stejně jako látka LGR8498 působí na aktivaci kaspasy 3/7 i quizartinib. Jeho aktivační účinek je však v koncentracích 0,2 nmol.l⁻¹, 1 nmol.l⁻¹ a 5 nmol.l⁻¹ téměř dvakrát silnější než u látky LGR8498. Ve 125nmol.l⁻¹ koncentraci je jeho aktivační účinek shodný s látkou LGR8498.



Obrázek č. 17: Relativní aktivita kaspasy 3/7 v buněčné linii MV4-11 po 24hodinovém působení látky LGR8498, quizartinibu, bortezomibu (bort) a doxorubicinu (doxo). Měření hladiny fluorescence proběhlo po 4hodinové inkubaci.

V porovnání látky LGR8498 i quizartinibu s doxorubicinem nebo bortezomibem je zjevný výrazně slabší účinek LGR8498 i quizartinibu na aktivaci kaspasy 3/7. Aktivita kaspasy 3/7 ovlivněné LGR8498 či quizartinibem je více než třikrát nižší než aktivita kaspasy 3/7 vystavené působení bortezomibu a doxorubicinu. LGR8498 tedy působí pozitivně na aktivaci kaspasové kaskády vedoucí k apoptóze, její účinnost je však poměrně nízká.

Působením LGR8498 i quizartinibu na buňky linie MV4-11 došlo pouze k mírné aktivaci kaspasové kaskády a iniciaci apoptózy a získané výsledky potvrzují pouze poměrně slabý proapoptotický účinek obou látek. V kombinaci s pozorovaným nárůstem buněk v G1 fázi tak výsledky naznačují spíše cytostatické působení LGR8498 a quizartinibu za vybraných podmínek. K zesílení proapoptotického účinku by mohlo přispět navýšení koncentrací obou látek nebo prodloužení doby působení inhibitorů na buněčné linii.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovit biologické účinky kinasového inhibitoru pomocí vybraných biologických a biochemických metod. Byly testovány účinky nové látky LGR8498 na buněčné linii MV4-11 s mutantní FLT3-ITD a na linii Jurkat, u které není známa žádná aktivační mutace v genu pro FLT3. LGR8498 byla ve vybraných koncentracích srovnávána ve svých účincích s klinicky testovaným FLT3 inhibitorem, quizartinibem.

Buňky vystavené působení LGR8498 či quizartinibu byly podrobeny cytometrické analýze buněčného cyklu a analýze proteinů pomocí immunoblottingu. Na základě analýzy proteinů pomocí western blottingu v FLT3-ITD pozitivní linii MV4-11 ovlivněné látkou LGR8498 byla prokázána blokáda FLT3, ale i podřízených signálních drah tohoto receptoru. Při delším působení látky bylo indukováno zablokování buněčného cyklu v G1 fázi. Tyto účinky jsou srovnatelné s quizartinibem, který na linii MV4-11 působí v nanomolárních koncentracích stejně jako látka LGR8498.

Pozitivním zjištěním je fakt, že látka LGR8498 v použitém koncentračním rozsahu neovlivňuje buněčný cyklus linie Jurkat, která je na FLT3 nezávislá. Získané výsledky tak naznačují, že látka LGR8498 neovlivňuje proliferaci buněk bez této mutace a vykazuje dobrou selektivitu vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám.

Buňky linie MV4-11 ošetřené látkami LGR8498, quizartinibem, bortezomibem a doxorubicinem prošly analýzou apoptózy. K určení proapoptotických účinků látek bylo použito metody analýzy proteinů pomocí immunoblottingu a fluorimetrické detekce aktivity kaspasy 3/7.

Látka LGR8498 působila aktivaci kaspasové dráhy a vykazovala mírný proapoptotický účinek. Ve srovnání s ostatními inhibitory byl však její proapoptotický účinek poměrně slabý, látka tedy v použitých koncentracích působí spíše cytostaticky. K zesílení proapoptotického účinku by mohlo přispět použití inhibitoru ve vyšších koncentracích nebo jeho delší působení na buněčné linii. Výsledky opět odpovídají výsledkům komerčního inhibitoru, quizartinibu.

Přestože se potvrdila schopnost LGR8498 inhibovat buňky linie MV4-11 s mutantní FLT3-ITD, je potřeba provést podrobnější testování.

6 LITERATURA

Acharya, B., Saha, D., Armstrong, D., Lakkaniga, N., & Frett, B. (2022). FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: successes, defeats, and emerging paradigms. *RSC Medicinal Chemistry*, 13(7), 798-816. <https://doi.org/10.1039/D2MD00067A>

Aikawa, T., Togashi, N., Iwanaga, K., Okada, H., Nishiya, Y., Inoue, S., Levis, M., & Isoyama, T. (2020). Quizartinib, a selective FLT3 inhibitor, maintains antileukemic activity in preclinical models of RAS-mediated midostaurin-resistant acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 11(11), 943-955. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27489>

Alberts, B. (1998). *Molecular Biology Of The Cell* (2. vyd). Espero.

Atkins, M., Jones, C., & Kirkpatrick, P. (2006). Sunitinib maleate. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 279-280. <https://doi.org/10.1038/nrd2012>

Auclair, D., Miller, D., Yatsula, V., Pickett, W., Carter, C., Chang, Y., Zhang, X., Wilkie, D., Burd, A., Shi, H., Rocks, S., Gedrich, R., Abriola, L., Vasavada, H., Lynch, M., Dumas, J., Trail, P., & Wilhelm, S. (2007). Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia*, 21(3), 439-445. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404508>

Buchwald, M., Pietschmann, K., Müller, J., Böhmer, F., Heinzl, T., & Krämer, O. (2010). Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation. *Leukemia*, 24(8), 1412-1421. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.114>

Burslem, G., Song, J., Chen, X., Hines, J., & Crews, C. (2018). Enhancing Antiproliferative Activity and Selectivity of a FLT-3 Inhibitor by Proteolysis Targeting Chimera Conversion. *Journal of the American Chemical Society*, 140(48), 16428-16432. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10320>

Cilibrasi, V., Spanò, V., Bortolozzi, R., Barreca, M., Raimondi, M., Rocca, R., Maruca, A., Montalbano, A., Alcaro, S., Ronca, R., Viola, G., & Barraja, P. (2022). Synthesis of 2H-Imidazo[2',1':2,3] [1,3]thiazolo[4,5-e]isoindol-8-yl-phenylureas with promising therapeutic features for the treatment of acute myeloid leukemia (AML) with FLT3/ITD mutations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 235114292. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114292>

Colombo, E., Marine, J., Danovi, D., Falini, B., & Pelicci, P. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biology*, 4(7), 529-533. <https://doi.org/10.1038/ncb814>

Čerňan, M., & Szotkowski, T. (2021). Současné trendy v léčbě akutní myeloidní leukemie - od indukční chemoterapie "7+3" po cílenou léčbu. *Klinická farmakologie a farmacie*, 35(3), 61-69.

de Wilt, L., Jansen, G., Assaraf, Y., van Meerloo, J., Cloos, J., Schimmer, A., Chan, E., Kirk, C., Peters, G., & Kruyt, F. (2011). Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(2), 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.10.009>

DiNardo, C., & Cortes, J. (2016). Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology*, 2016(1), 348-355. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.348>

Döhner, H., Weisdorf, D., & Bloomfield, C. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 373(12), 1136-1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>

Dumas, P., Villacreces, A., Guitart, A., El-habhab, A., Massara, L., Mansier, O., Bidet, A., Martineau, D., Fernandez, S., Leguay, T., Pigneux, A., Vigon, I., Pasquet, J., & Desplat, V. (2021). Dual Inhibition of FLT3 and AXL by Gilteritinib Overcomes Hematopoietic Niche-Driven Resistance Mechanisms in FLT3 -ITD Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 27(21), 6012-6025. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3114>

Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M., & Mecucci, C. (2006). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109(3), 874-885. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-012252>

Ferng, T., Terada, D., Ando, M., Tarver, T., Chaudhary, F., Lin, K., Logan, A., & Smith, C. (2022). The Irreversible FLT3 Inhibitor FF-10101 Is Active Against a Diversity of FLT3 Inhibitor

Resistance Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, 21(5), 844-854. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0317>

Galanis, A., Ma, H., Rajkhowa, T., Ramachandran, A., Small, D., Cortes, J., & Levis, M. (2014). Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*, 123(1), 94-100. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-529313>

Gazdová, J., Dvořáková, D., Ježíšková, I., Rázga, F., Jurček, T., & Mayer, J. (2009). Úloha FLT3 mutací v patogenezi akutní myeloidní leukemie. *Transfúze a hematologie dnes*, 15(4), 229-336.

George, D., Dionne, C., Jani, J., Angeles, T., Murakata, C., Lamb, J., & Isaacs, J. (1999). Sustained in Vivo Regression of Dunning H Rat Prostate Cancers Treated with Combinations of Androgen Ablation and Trk Tyrosine Kinase Inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555). *Cancer Research*, 59(10), 2395-2401.

Gjerset, R. (2006). DNA damage, p14ARF, Nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *Journal of Molecular Histology*, 37(5-7), 239-251. <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9040-y>

Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., & Saxena, K. (2004). The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Molecular Cell*, 13(2), 169-178. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00505-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00505-7)

Gunawardane, R., Nepomuceno, R., Rooks, A., Hunt, J., Ricono, J., Belli, B., & Armstrong, R. (2013). Transient Exposure to Quizartinib Mediates Sustained Inhibition of FLT3 Signaling while Specifically Inducing Apoptosis in FLT3-Activated Leukemia Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(4), 438-447. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0305>

Hart, S., Goh, K., Novotny-Diermayr, V., Hu, C., Hentze, H., Tan, Y., Madan, B., Amalini, C., Loh, Y., Ong, L., William, A., Lee, A., Poulsen, A., Jayaraman, R., Ong, K., Ethirajulu, K., Dymock, B., & Wood, J. (2011). SB1518, a novel macrocyclic pyrimidine-based JAK2 inhibitor for the treatment of myeloid and lymphoid malignancies. *Leukemia*, 25(11), 1751-1759. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.148>

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>

Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., & Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, 19(5), 624-631. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203354>

Horvath, C., & Darnell, J. (1997). The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 233-239. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80067-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80067-1)

Huang, H., Dobrovolsky, D., Paulk, J., Yang, G., Weisberg, E., Doctor, Z., Buckley, D., Cho, J., Ko, E., Jang, J., Shi, K., Choi, H., Griffin, J., Li, Y., Treon, S., Fischer, E., Bradner, J., Tan, L., & Gray, N. (2018). A Chemoproteomic Approach to Query the Degradable Kinome Using a Multi-kinase Degradator. *Cell Chemical Biology*, 25(1), 88-99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.005>

Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>

Chaitanya, G., Alexander, J., & Babu, P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 831. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>

Choudhary, C., Schwäble, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W., Müller-Tidow, C., & Serve, H. (2005). AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*, 106(1), 265-273. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2942>

Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Yang, Y., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H., & Taguchi, H. (2006). The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(10), 2522-2530. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0071>

- Kampa-Schittenhelm, K., Heinrich, M., Akmut, F., Döhner, H., Döhner, K., & Schittenhelm, M. (2013). Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. *Molecular Cancer*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-19>
- Kazi, J., & Rönstrand, L. (2019). FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiological Reviews*, 99(3), 1433-1466. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2018>
- Kidoguch, K., Shibusawa, M., & Tanimoto, T. (2021). A critical appraisal of Japan's new drug approval process: a case study of FLT3-ITD inhibitor quizartinib. *Investigational New Drugs*, 39(6), 1457-1459. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01151-0>
- Kim, E. (2017). Midostaurin: First Global Approval. *Drugs*, 77(11), 1251-1259. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0779-0>
- Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., & Naoe, T. (2002). Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, 21(16), 2555-2563. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205332>
- Knapper, S. (2007). FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 138(6), 687-699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06700.x>
- Kuo, M., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M., & Sherr, C. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes & Development*, 18(15), 1862-1874. <https://doi.org/10.1101/gad.1213904>
- Larrosa-Garcia, M., & Baer, M. (2017). FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(6), 991-1001. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0876>
- Li, S., Balmain, A., & Counter, C. (2018). A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nature Reviews Cancer*, 18(12), 767-777. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0076-6>
- Lohrum, M., & Vousden, K. (1999). Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death & Differentiation*, 6(12), 1162-1168. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400625>
- Lyman, S., & Jacobsen, S. (1998). c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood*, 91(4), 1101-1134. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.4.1101>
- Malaise, M., Steinbach, D., & Corbacioglu, S. (2009). Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 4(2), 77-82. <https://doi.org/10.1007/s11899-009-0011-8>
- Mancuso, R., Foglio, M., & Olalla Saad, S. (2021). Artemisinin-type drugs for the treatment of hematological malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 87(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04170-5>
- Martelli, A., Evangelisti, C., Chiarini, F., & McCubrey, J. (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*, 1(2), 89-103. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.114>
- Mendel, D., Laird, A., Xin, X., Louise, S., Christensen, J., Li, G., Schreck, R., Abrams, T., Ngai, T., Lee, L., Murray, L., Carver, J., Chan, E., Moss, K., Haznedar, J., Sukbuntherng, J., Blake, R., Sun, L., Tang, C. et al. (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research*, 9(1), 327-337.
- Meshinchi, S., & Appelbaum, F. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 15(13), 4263-4269. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1123>
- Mori, M., Kaneko, N., Ueno, Y., Yamada, M., Tanaka, R., Saito, R., Shimada, I., Mori, K., & Kuromitsu, S. (2017). Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*, 35(5), 556-565. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0470-z>
- Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., Takeuchi, S., Phillip Koeffler, H., & Yokoyama, A. (2008). MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces

degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. *Leukemia Research*, 32(9), 1382-1392. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.02.018>

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153-183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>

Pratz, K., Sato, T., Murphy, K., Stine, A., Rajkhowa, T., & Levis, M. (2010). FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*, 115(7), 1425-1432. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-242859>

Pritchard, A., & Hayward, N. (2013). Molecular Pathways: Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mutations and Drug Resistance. *Clinical Cancer Research*, 19(9), 2301-2309. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0383>

Reilly, J. (2002). Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *British Journal of Haematology*, 116(4), 744-757. <https://doi.org/10.1046/j.0007-1048.2001.03294.x>

Rocnik, J., Okabe, R., Yu, J., Lee, B., Giese, N., Schenkein, D., & Gilliland, D. (2006). Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood*, 108(4), 1339-1345. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-011429>

Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>

Rosnet, O., Mattei, M., Marchetto, S., & Birnbaum, D. (1991). Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, 9(2), 380-385. <https://doi.org/10.1126/science.3291115>

Řezníčková, E., Krajčovičová, S., Peřina, M., Kovalová, M., Sural, M., & Kryštof, V. (2022). Modulation of FLT3-ITD and CDK9 in acute myeloid leukaemia cells by novel proteolysis targeting chimera (PROTAC). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114792>

Sarbassov, D., Guertin, D., Ali, S., & Sabatini, D. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, 307(5712), 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

Sexauer, A., Perl, A., Yang, X., Borowitz, M., Gocke, C., Rajkhowa, T., Thiede, C., Frattini, M., Nybakken, G., Pratz, K., Karp, J., Smith, B., & Levis, M. (2012). Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood*, 120(20), 4205-4214. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402545>

Shallis, R., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, 36, 70-87. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>

Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8256-8261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801340105>

Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajczak, M., & Gewirtz, A. (1994). STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34 human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 459-463. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.459>

Smith, B., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K., Dausers, T., Allebach, J., & Small, D. (2004). Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103(10), 3669-3676. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3775>

Smith, C., Wang, Q., Chin, C., Salerno, S., Damon, L., Levis, M., Perl, A., Travers, K., Wang, S., Hunt, J., Zarrinkar, P., Schadt, E., Kasarskis, A., Kuriyan, J., & Shah, N. (2012). Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 485(7397), 260-263. <https://doi.org/10.1038/nature11016>

Smith, C., Lasater, E., Lin, K., Wang, Q., McCreery, M., Stewart, W., Damon, L., Perl, A., Jeschke, G., Sugita, M., Carroll, M., Kogan, S., Kuriyan, J., & Shah, N. (2014). Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5319-5324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320661111>

- Smith, S., Collins, S., & Charest, P. (2020). Ras, PI3K and mTORC2 – three's a crowd?. *Journal of Cell Science*, 133(19), jcs234930. <https://doi.org/10.1242/jcs.234930>
- Stirewalt, D., & Radich, J. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 3(9), 650-665. <https://doi.org/10.1038/nrc1169>
- Strom, S., Oum, R., Elhor Gbitto, K., Garcia-Manero, G., & Yamamura, Y. (2012). De novo acute myeloid leukemia risk factors. *Cancer*, 118(18), 4589-4596. <https://doi.org/10.1002/cncr.27442>
- Swift, L., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D., & Cutts, S. (2006). Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Research*, 66(9), 4863-4871. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3410>
- Takahashi, S. (2011). Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*, 4(13). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-13>
- Takeuchi, Y., Pausawasdi, N., & Todisco, A. (1999). Carbachol activates ERK2 in isolated gastric parietal cells via multiple signaling pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(6), G1484-G1492. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.6.G1484>
- Uhlik, M., Abell, A., Cuevas, B., Nakamura, K., & Johnson, G. (2004). Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochemistry and Cell Biology*, 82(6), 658-663. <https://doi.org/10.1139/o04-114>
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M., Kotani, K., Stein, R., Warne, P., Zvelebil, M., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., & Waterfield, M. (1997). p110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4330-4335. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4330>
- Verstraete, K., Vandriessche, G., Januar, M., Elegheert, J., Shkumatov, A., Desfosses, A., Van Craenenbroeck, K., Svergun, D., Gutsche, I., Vergauwen, B., & Savvides, S. (2011). Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. *Blood*, 118(1), 60-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329532>
- Warkentin, A., Lopez, M., Lasater, E., Lin, K., He, B., Leung, A., Smith, C., Shah, N., & Shokat, K. (2014). Overcoming myelosuppression due to synthetic lethal toxicity for FLT3-targeted acute myeloid leukemia therapy. *eLife*, 303445. <https://doi.org/10.7554/eLife.03445>
- Weber, J., Taylor, L., Roussel, M., Sherr, C., & Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology*, 1(1), 20-26. <https://doi.org/10.1038/8991>
- Weiss, A., & Schlessinger, J. (1998). Switching Signals On or Off by Receptor Dimerization. *Cell*, 94(3), 277-280. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81469-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81469-5)
- Wodnar-Filipowicz, A., Lyman, S., Gratwohl, A., Tichelli, A., Speck, B., & Nissen, C. (1996). Flt3 Ligand Level Reflects Hematopoietic Progenitor Cell Function in Aplastic Anemia and Chemotherapy-Induced Bone Marrow Aplasia. *Blood*, 88(12), 4493-4499.
- Wu, M., Li, C., & Zhu, X. (2018). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(133). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0675-4>
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D., & Sun, S. (2020). The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*, 80, 106210. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106210>
- Yamamoto, Y. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8), 2434-2439. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.8.2434>
- Yamaura, T., Nakatani, T., Uda, K., Ogura, H., Shin, W., Kurokawa, N., Saito, K., Fujikawa, N., Date, T., Takasaki, M., Terada, D., Hirai, A., Akashi, A., Chen, F., Adachi, Y., Ishikawa, Y., Hayakawa, F., Hagiwara, S., Naoe, T. et al. (2018). A novel irreversible FLT3 inhibitor, FF-10101, shows excellent efficacy against AML cells with FLT3 mutations. *Blood*, 131(4), 426-438. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786657>
- Yarden, Y., Kuang, W., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., & Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal*, 6(11), 3341-3351. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x>

Yoon, S., & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21-44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>

Zarrinkar, P., Gunawardane, R., Cramer, M., Gardner, M., Brigham, D., Belli, B., Karaman, M., Pratz, K., Pallares, G., Chao, Q., Sprankle, K., Patel, H., Levis, M., Armstrong, R., James, J., & Bhagwat, S. (2009). AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 114(14), 2984-2992. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222034>

Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech - 2012–2021. (2022). Český statistický úřad. Retrieved 2023-04-28, from <https://www.czso.cz/csu/czso/kraje-podle-pohlavi-a-veku-za-rok-2021>

Zhang, W., Konopleva, M., Shi, Y., McQueen, T., Harris, D., Ling, X., Estrov, Z., Quintás-Cardama, A., Small, D., Cortes, J., & Andreeff, M. (2008). Mutant FLT3: A Direct Target of Sorafenib in Acute Myelogenous Leukemia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100(3), 184-198. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm328>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ALK – anaplastic lymphoma kinase
AML – akutní myeloidní leukemie
ARF (p19Arf) – adenosine diphosphate-ribosylation factor
CD117 – cluster of differentiation 117
CEBPA – CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CRBN – cereblon
EMA – European Medicines Agency
ERK – extracellular signal-regulated kinase
FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration
FL – FLT3 ligand
FLK-2 – fetal liver kinase 2
FLT3 – FMS-like receptor tyrosine kinase-3
FRAP – FKBP and rapamycin-associated protein
GAP – GTPase-activating proteins
GATA2 – GATA-binding factor 2
GEF – guanine nucleotide exchange factor
GRB2 – growth factor receptor-bound protein 2
GTPasa – GTP fosfohydrolasa
HDM2 – human double minute 2 protein
HOX – homeobox gene
Hsp90 – heat-shock protein 90
IC50 – koncentrace inhibitoru snižující životnost buněk či aktivitu enzymu o 50 %
IDH1 – isocitrate dehydrogenase 1
ITD – interní tandemová duplikace
JAK – janus activated kinases
JM – juxtamembránová doména
Kaspasa – cysteine-aspartic protease
KI – kinasový inzert
KRAS – Kirsten rat sarcoma virus
LTK – leukocyte receptor tyrosine kinase
MAPK – mitogen-Activated Protein Kinase

MDM2 – mouse double minute 2 homolog
MKKKs – MAPK kinasy kinasy
mTOR – mammalian target of rapamycin
mTORC2 – mTOR complex 2
NPM/NPM1 – protein nukleofosmin
NPMc+ – protein nukleofosmin 1 vyskytující se namísto jádra v cytoplazmě
NRAS – neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PARP-1 – poly [ADP-ribose] polymerase 1
PCNA – proliferating cell nuclear antigen
PDGFR – platelet-derived growth factor receptor
PDK1 – 3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K – fosfatidylinositol-3-kinasa
PIP2 – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3 – fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKA – protein kinase A
PROTAC(s) – Proteolysis Targeting Chimeras
RAF – rapidly accelerated fibrosarcoma
RET – RET proto-oncogene
RUNX1 – runt-related transcription factor 1
SEER – Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SOCS – suppressor of cytokine signal-1
SOS – son of sevenless
SRSF2 – splicing factor, arginine/serine-rich 2
STAT – signal transducer and activator of transcription
STK-1 – FLT3 v lidských buňkách
TET2 – tet methylcytosine dioxygenase 2
TKD – tyrozinkinasová doména
TM – transmembránová doména
(T)P53 – tumor protein P53
TrkA/B/C – tropomyosin receptor kinase A/B/C
UBCH8 – ubikvitinační enzym
VEGFR1,2,3 – VEGF receptor
VHL – von Hippel–Lindau tumor suppressor
WHO – World Health Organization