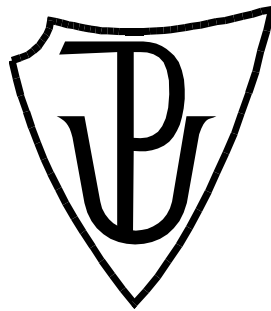


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Inhibice signální dráhy FLT3 v leukemických buňkách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Karolína Kozlanská**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**
Rok: 2020

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

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, PhD. za odborné vedení, pomoc se zpracováním a v neposlední řadě za cenné rady a trpělivost. Za poskytnutí grantu bych chtěla poděkovat Univerzitě Palackého v Olomouci v rámci grantového projektu IGA PrF 2020 021 a Grantové agentuře České republiky za poskytnutí grantu GACR 19-09086S. Dále bych touto cestou chtěla poděkovat jmenovitě paní Janě Hudcové a panu kolegovi Bc. Miroslavu Peřinovi za veškerou pomoc v laboratoři, rady a znalosti, které mi předali. Poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů za vstřícnost. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za veškerou podporu během studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Kozlanská
Název práce	Inhibice signální dráhy FLT3 v leukemických buňkách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

FLT3/ITD je nejčastěji se vyskytující mutace receptoru FLT3. FLT3 signalizace reguluje vývoj a přežití hematopoetických buněk a je známo, že mutace v receptoru značně přispívají ke vzniku závažného onemocnění akutní myeloidní leukémie. Teoretická část je věnována charakterizaci receptoru FLT3, signálních drah, které spouští ve fyziologickém a v patologickém stavu. Dále je v teoretické části řešena otázka léčby akutní myeloidní leukémie. V praktické části je věnována pozornost nově syntetizovaným inhibitorům FLT3/ITD. V rámci této práce byl studován jejich vliv na buněčný cyklus a intracelulární signální dráhy leukemických buněk.

Klíčová slova	Receptorová kinasa FLT3, onkogenní mutace, akutní myeloidní leukémie, chemoterapie, selektivní inhibitory
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karolína Kozlanská
Title	Inhibition of FLT3 signaling pathway in leukemia cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth regulators
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

FLT3/ITD is the most common FLT3 receptor mutation. FLT3 signaling regulates the development and survival of hematopoietic cells and mutations in the receptor contribute significantly to the development of a severe acute myeloid leukemia disease. The theoretical part is devoted to characterization of FLT3 receptor, signaling pathways it triggers in physiological and pathological state. Furthermore, the theoretical part deals with the treatment of acute myeloid leukemia. In the practical part, attention is paid to new synthesized inhibitors of FLT3/ITD. Their effect on the cell cycle and signal transduction pathways on leukemic cells were studied in this bachelor thesis.

Keywords	FLT3 receptor kinase, oncogenic mutation, acute myeloid leukemia, chemotherapy, selective inhibitors
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Receptorové tyrosin-kinasy (RTK)	2
2.2	Receptor FLT3	4
2.2.1	Struktura a lokalizace	5
2.2.2	Funkce a autoregulační mechanismy.....	6
2.2.3	Ligand FL	7
2.2.4	Signalizace.....	9
2.2.4.1	Vazba FL na receptor FLT3	9
2.2.4.2	Signální kaskády podřízené FLT3	9
2.3	Akutní myeloidní leukémie	12
2.3.1	Mutace u AML	14
2.3.2	Deregulace FLT3 u AML.....	14
2.3.2.1	Zvýšená exprese FLT3 receptoru	15
2.3.2.2	Bodové mutace v aktivní smyčce FLT3	15
2.3.2.3	FLT3/ITD a signalizace.....	15
2.4	Léčba AML	18
2.4.1	Kurativní cytotoxická chemoterapie.....	18
2.4.2	Cílená léčba	19
2.4.3	I. generace inhibitorů.....	21
2.4.3.1	Sorafenib	21
2.4.3.2	Midostaurin	21
2.4.3.3	Lestaurtinib.....	21
2.4.3.4	Sunitinib	22
2.4.3.5	Ponatinib.....	23
2.4.4	II. generace selektivních inhibitorů	23
2.4.4.1	Quizartinib.....	23
2.4.4.2	Tandutinib	23
2.4.4.3	Gilteritinib	24
2.4.4.4	Pacritinib	24
2.4.4.5	Crenolanib	24
2.4.4.6	AMG925 (FLX925)	25
2.4.5	Rezistence ke specifické léčbě a vývoj dalších sloučenin.....	26
3	PRAKTICKÁ ČÁST	29
3.1	Materiál	29

3.1.1	Použité chemikálie	29
3.1.2	Roztoky	30
3.1.3	Kultivační média a seznam použitých protilátek.....	31
3.1.4	Testované inhibitory	33
3.1.5	Buněčné kultury	33
3.1.6	Přístrojové vybavení.....	34
3.1.7	Programy	35
3.2	Metody.....	35
3.2.1	Práce s buněčnými kulturami	35
3.2.2	Ovlivnění a sklízení buněk	35
3.2.3	SDS-PAGE a western blotting s imunodetekcí	36
3.2.4	Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií.....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	39
4.1	Analýza buněčného cyklu	39
4.2	Proteinová analýza	47
5	ZÁVĚR	53
6	LITERATURA	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60

Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo charakterizovat tyrosin-kinasový receptor FLT3, popsat jeho strukturu a expresi v hematopoetických buňkách, jeho vliv na aktivaci molekulárních drah, buněčný růst a vývoj ve fyziologickém a deregulovaném stavu. Dále zpracovat rešerši se zaměřením na léčbu akutní myeloidní leukémie prostřednictvím nových terapeutik cílených právě na onkogenně aktivovanou kinasu FLT3. Cílem experimentální části bylo objasnit vliv nově syntetizovaných nízkomolekulárních inhibitorů FLT3 na buněčný cyklus a mechanismus účinku těchto látek na deregulované signální dráhy FLT3 u nádorových buněčných linií.

1 ÚVOD

Zralé krevní buňky vznikají procesem diferenciací hematopoetických buněk. Hematopoeze je složitý a přísně regulovaný proces, řízený růstovými faktory. Růstové faktory regulují aktivaci tyrosin-kinasových receptorů, které v hematopoetické tkáni řídí vývojové procesy diferenciací, proliferace a růstu buněk.

Receptor FLT3, který lze nalézt také pod názvy fetální jaterní kinasa 2 nebo kinasa lidských kmenových buněk 1, patří do třídy III. receptorových tyrosin-kinas a řadí se mezi cytokinové receptory (Carow C. *et al.*, 1996; Grafone *et al.*, 2012). Tyto receptory jsou aktivovány dimerizací závislou na ligandu. Aktivované receptory poté spouští podřízené signální kaskády fosforylací substrátů (Lavagna-Sevenier *et al.*, 1998). Kontrola aktivity RTK je tedy klíčová pro udržování požadované úrovně proliferace za fyziologických podmínek. V případě vzniku aktivační (onkogenní) mutace v genu kódujícím RTK dochází k deregulaci podřízených molekulárních drah a v důsledku toho může dojít i ke vzniku maligního onemocnění.

Mutace v receptorové kinase FLT3 přispívá k vývoji akutní myeloidní leukémie, což je maligní hematologické onemocnění, které se projevuje abnormální proliferací a diferenciací mutované populace myeloidních prekurzorů v kostní dřeni. Výsledkem je akumulace nezralých buněk v kostní dřeni a jejich expanze do periferní krve. Jedná se o závažné onemocnění vyskytující se napříč všemi věkovými kategoriemi s různými příčinami vzniku.

Akutní myeloidní leukémie je skupina hematopoetických neoplasmů, které vznikají i na základě různých dalších genových mutací a chromozomálních abnormalit, které způsobují různé deregulace různých molekulárních drah (Češka *et al.*, 2015). V minulých letech byla maligní onemocnění léčena převážně chemoterapeutickými cytotoxickými látkami, bez ohledu na typ či mechanismus vzniku neoplasmu. V dnešní době je významná část úsilí farmaceutického průmyslu spojeného s onkologií zaměřena na vývoj nových preparátů, které specificky zasahují klíčové molekulární mechanismy transformované buňky. Často se jedná o nízkomolekulární ATP kompetitivní inhibitory onkogenních proteinkinas (včetně RTK), které by měly mít minimalizovány vedlejší účinky (Watson *et al.*, 2014).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Receptorové tyrosin-kinasy (RTK)

U lidí bylo doposud charakterizováno celkem 58 receptorových protein-kinas, jejichž aktivita spočívá ve fosforylaci hydroxylových skupin tyrosinových reziduí cílových proteinů. Jedná se o relativně malou skupinu integrálních membránových receptorů, ale navzdory tomu jsou RTK centrálními uzly složitých signalizačních kaskád zahrnujících mnoho důležitých regulačních a signalizačních proteinů, jejichž aktivita je regulována fosforylací a defosforylací (Watson *et al.*, 2014). Aktivita RTK je také kontrolována autoinhibiční aktivitou v nepřítomnosti ligandu v juxtamembránové oblasti a konzervované katalytické oblasti kinasové domény. Autoinhibiční konformace je poté destabilizována vazbou aktivačního ligandu (Griffith *et al.*, 2004).

Receptory zastávají v buňkách významné funkce při regulaci diferenciaci, růstu, migraci, proliferaci, embryonálního vývoje, přežití a metabolických drah. Všechny receptory mají podobnou molekulární strukturu. RTK jsou tvořeny extracelulární částí, která může být u některých skupin glykosylována a do níž se váže extracelulární ligand. Současně je extracelulární oblast charakteristická pro každou skupinu receptorů a dle její struktury lze rozdělovat receptory do podskupin, dále se RTK od sebe vzájemně odlišují způsobem interakce a aktivace receptoru ligandem. Receptory jsou dále tvořeny samostatnou transmembránovou částí s helikální strukturou, katalytickou a intracelulární částí s tyrosin-kinasovou doménou a juxtamembránovou doménou. Tyrosin-kinasová doména navíc obsahuje 11 vysoce konzervovaných úseků, například sekvence Gly-X-Gly-X-X-Gly-(15-20)-Lys, která je součástí vazebného místa pro ATP, nebo další sekvence účastníci se fosfotransferové reakce (Lemmon a Schlessinger, 2010). Jak již bylo zmíněno, RTK se dělí do několika podskupin, například:

- I. skupina jsou monomerní receptory se dvěma extracelulárními na cystein bohatými úseky. Do této skupiny patří receptor pro epidermální růstový faktor.
- II. skupina je charakteristická disulfidově vázanými heterotetramerními strukturami v extracelulární oblasti s částí bohatou na cystein. Do této skupiny patří inzulínový receptor a receptor pro růstový faktor 1 (Watson *et al.*, 2014).
- III. skupina je charakterizována pěti imunoglobulinu-podobnými strukturami v extracelulární oblasti receptoru. Do této skupiny se řadí například receptory PDGFR, FLT3, KIT (Parcells *et al.*, 2006).

- IV. skupina je charakterizována třemi imunoglobulinu-podobnými strukturami v extracelulární oblasti. Do skupiny patří receptor pro růstový faktor fibroblastu. Společným znakem skupiny III. a IV. je charakteristická tyrosin-kinasová doména, která je rozdělena hydrofobní inzerční (interkinasovou) spojkou variabilní délky. Kromě těchto čtyř zmíněných bylo doposud charakterizováno dalších 16 podskupin RTK, které se vzájemně liší funkcí a strukturou (Watson *et al.*, 2014).

Transdukce signálu u RTK je iniciovaná dimerizací nebo oligomerizací receptoru, kterou indukuje vazba specifického ligandu (růstového faktoru) na receptor, výjimkou v tomto mechanismu je receptor pro inzulín (Watson *et al.*, 2014). Ligand aktivující receptor může mít buď monomerní či dimerní strukturu. Ligand svou vazbou na receptor vyvolává konformační změny, které se šíří do cytoplasmatické části a následně způsobují autofosforylaci vedoucí k vazbě fosforylovaného Tyr rezidua receptoru s SH2 vazebnými doménami proteinů podřízené signální kaskády. Skupina RTK je významná právě z důvodu vzniku mnohých onemocnění v důsledku genetických mutací majících vliv na míru exprese, funkci a regulaci receptorů. Deregulace v RTK mohou vést ke kancerogenezi, vzniku zánětů, diabetes, neurologických a plicních onemocnění a poruch angiogeneze. Inhibice RTK je tedy v současné době považována za slibný terapeutický cíl (Lemmon a Schlessinger, 2010).

Významným terapeutickým cílem je například receptor pro inzulín, který s dalšími třemi receptory tvoří samostatnou malou skupinu RTK. U vyšších obratlovců receptor slouží ke kontrole hladiny glukosy v krvi, mimo to zastává důležité funkce během růstu a vývoje, buněčného přežití, proliferace a proteosyntézy (Deyev *et al.*, 2011). Receptor pro inzulín lze aktivovat pouze jedinou molekulou inzulínu. Konformační změna vyvolaná ligandem indukuje autofosforylaci tří Tyr reziduí v aktivační smyčce, což způsobuje mnohonásobné zvýšení katalytické účinnosti receptoru. Deregulace aktivity receptoru pro inzulín vede ke vzniku diabetes a má podporující vliv na maligní transformaci buněk (Watson *et al.*, 2014). Druhým významným receptorem je tropomyosinová receptorová kinasa, která zastává důležitou funkci ve vývoji nervového systému savců, udržování nervového fenotypu neuronů u dospělých jedinců, synaptické modulaci a udržování paměti (Minichiello, 2009). Další funkcí receptoru je regulace přežití, diferenciace a apoptózy. Během exprese receptoru mohou vznikat *in vivo* různé alternativní sestřihy, například pro mutantní receptor tropomyosinová kinasa C nesoucí krátkou inzerci v tyrosin-kinasové doméně, která moduluje aktivitu receptoru, snižuje

schopnost vázat a fosforylovat substráty a snižuje schopnost diferenciacie buněk. Proto je tento receptor atraktivním cílem pro léčbu neurodegenerativních chorob jako: Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova choroba a léčbu depresí. Deregulované mutantní receptory mohou indukovat vznik zánětu dýchacích cest, astmatu a rakoviny prsu (Allen *et al.*, 2013). Další z receptorů, který má v deregulovaném stavu vliv na vznik maligního onemocnění je receptor FLT3. Receptor, jak již bylo zmíněno, patří do třídy RTK III. Kódující oblast tvoří stejné množství exonů, které mají vysoce konzervovanou délku a sekvenci. Svou aminokyselinovou sekvencí a strukturou, je FLT3 podobný FMS, PDGFR a KIT (Carow *et al.*, 1996).

2.2 Receptor FLT3

Gen *Flt3* kóduje membránově vázaný tyrosin-kinasový receptor FLT3 (Stirewalt a Radich, 2003). Lidský gen pro FLT3 má délku 96 kb a je složen z 24 exonů umístěných na chromosomu 13 (13q12) (Parcells *et al.*, 2006). V otevřeném čtecím rámci má transkript délku 3,7 kb a konečná posttranslační verze receptoru je tvořena z 993 aminokyselin (Abu-Duhier *et al.*, 2001).

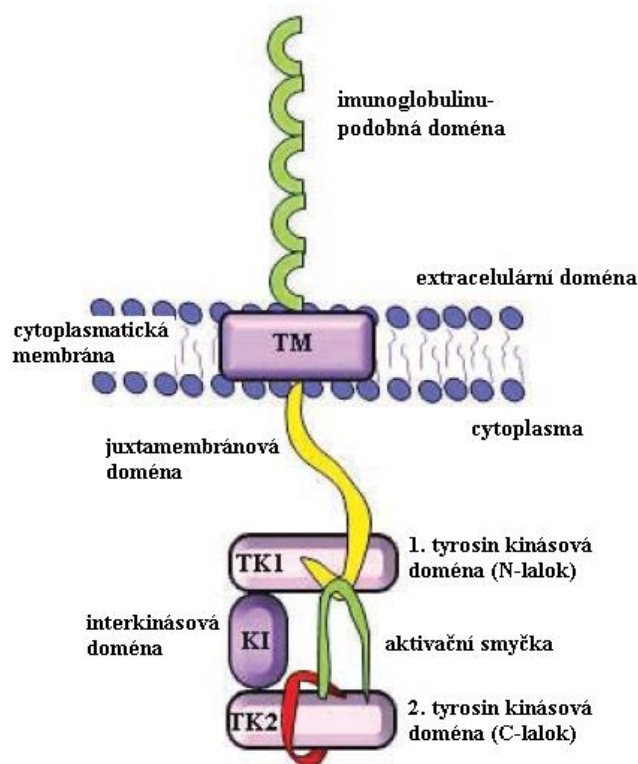
K expresi FLT3 dochází především v lidských myeloidních a B-lymfoidních buněčných liniích. Progenitorové buňky exprimující FLT3 mají vývojový potenciál granulocytů, monocytů, B a T buněk (Parcells *et al.*, 2006). Exprese v kostní dřeni je limitována na kmenové, rané progenitorové buňky a CD 34⁺ buňky s vysokým stupněm exprese KIT, zatímco k expresi ligandu dochází v celé řadě tkání: slezině, játrech, plicích, srdci, placentě nebo brzlíku (Gilliland a Griffin, 2002). Z toho důvodu exprese receptoru FLT3 určuje tkáňovou specifitu (Griffith *et al.*, 2004).

Na základě imunoprecipitačních studií FLT3 byly popsány dva membránově vázané proteiny s rozdílnou molekulovou hmotností. Jeden o hmotnosti 130-143 kDa a druhý s molekulovou hmotností 158-160 kDa. Protein 130-143 kDa představuje nevyzrálou formu bez glykosylace, zatímco protein s hmotností 158-160 kDa má glykosylovanou svou extracelulární doménu a je lokalizován na plasmatické membráně (Gilliland a Griffin, 2002; Schmidt-Arras *et al.*, 2005).

2.2.1 Struktura a lokalizace

Receptor se nachází v cytoplasmatické membráně hematopoetických buněk, v místech krvetvorby. Receptor je tvořen extracelulární doménou, která se nachází z vnější strany na buněčném povrchu, dále transmembránovou, juxtamembránovou a intracelulární doménou (Obr. 1) (Tse *et al.*, 2000). Extracelulární, N-terminální část kóduje 541 aminokyselin. Obsahuje 5 imunoglobulinům podobných struktur, které jsou silně glykosylované. Na proteiny jsou vázány N-acetylglukosaminové, galaktosové, fukosové a manosové zbytky. Tři imunoglobulinu podobné struktury, které jsou nejvíce vzdálené od cytoplasmatické membrány, se účastní vazby ligandu. Dvě proximální imunoglobulinu podobné struktury jsou zapojeny do procesu dimerizace (Grafone *et al.*, 2012).

Transmembránová doména je zakotvená v cytoplasmatické membráně a je kódovaná 21 aminokyselinami. Juxtamembránová doména navazuje na transmembránovou doménu



Obr. 1 Schéma monomerního receptoru FLT3: Extracelulární doména tvořená z imunoglobulinu podobných struktur, TM = transmembránová doména, TK1 = tyrosin-kinasová doména, N-terminální část, TK2 = tyrosin-kinasová doména C-terminální část, KI = interkinasová spojnka, žlutě = juxtamembránová doména, zeleně = aktivační smyčka, červeně = regulační smyčka (převzato a upraveno z Grafone *et al.*, 2012).

a nachází se v cytoplasmatickém prostoru uvnitř buňky (Obr. 1). Intracelulární, C-terminální část je tvořena 431 aminokyselinami. Doména obsahuje kinasovou doménu rozdělenou na dvě části: N-terminální část TK1 (N-lalok) a C-terminální část TK2 (C-lalok), které jsou spojeny interkinasovou spojkou (Obr. 1). Interkinasová spojka má strukturu flexibilního peptidu, díky čemuž získává doména schopnost autoregulace (Griffith *et al.*, 2004).

2.2.2 Funkce a autoregulační mechanismy

Biologická funkce receptoru závisí především na vazbě ligandu, která spouští podřízenou signální kaskádu. Signál je veden kinasovou kaskádou a ukončován terminačním signálem. Defosforylaci do základního stavu katalyzují fosfatasy. Přísná pozitivní a negativní regulace dějů závisí na rychlosti vzniku dynamických molekulárních komplexů, které jsou postavené na asociaci vazebných domén. Proteinové substráty obvykle obsahují fosfo-tyrosinové vazebné motivy SH2/3, PTB/PH, WW, které mohou samy obsahovat několik Tyr reziduí sloužících v případě fosforylace aktivovanou FLT3 jako skeletární a dokovací místa právě pro sestavení multiproteinových komplexů (Watson *et al.*, 2014). Složitost mechanismů potvrzuje skutečnost, že proteiny jsou multifunkční, nebo obsahují multifunkční domény (Lavagna-Sevenier *et al.*, 1998). Hlavní funkcí receptoru je udržování pluripotence hematopoetických kmenových buněk a regulace metabolismu fosfolipidů, regulace vývoje a přežití progenitorových buněk a stupně diferenciaci B-buněk, NK buněk a dendrických buněk (Tse *et al.*, 2000).

Pro kontrolu aktivity receptoru slouží autoregulační mechanismy. Jedním z nich je autoinhibiční smyčka v aktivačním místě intracelulární domény. Smyčka je v neaktivní formě složena do aktivačního místa a stericky blokuje vazbu ATP a substrátů. Tuto regulaci zajišťuje pozice fenylyalaninového rezidua v aktivační smyčce. Konzervovaný motiv DFG (aspartát-fenylyalanin-glycin) rozhoduje o konformaci smyčky. Pokud je fenylová skupina fenylyalaninového rezidua orientovaná dovnitř ATP vazebného místa, DFG získává uzavřenou konformaci (DFG-in) složením aktivační smyčky do mezery mezi N a C lalok tyrosin-kinasové domény. Takto blokuje přístup k vazebným místům pro ATP a substráty. Pokud je fenylová skupina fenylyalaninového rezidua orientovaná směrem ven z ATP vazebného místa, přijímá motiv otevřené konformace (DFG-out), která umožní vazbu ATP a substrátů (Ke *et al.*, 2015).

Dalším autoinhibičním mechanismem FLT3 je regulace enzymatické aktivity konformací juxtamembránové domény (Grafone *et al.*, 2012). Nefosforylovaná helikální

struktura juxtamembránové domény vytváří malý lalok, který silnými interakcemi s kinasovou doménou blokuje vznik aktivní konformace. Juxtamembránová doména obsahuje dvě klíčová rezidua Y589 a Y591, která jsou odpovědná za aktivaci. Vznikem mutace v této doméně může dojít k oslabení interakcí mezi juxtamembránovou a kinasovou doménou (Rocnik, 2006).

Důležitým regulačním prvkem receptoru FLT3 je jeho ligand FLT3 (FL). FL je nezbytně nutný pro změnu konformace a aktivaci celého receptoru. Ve starších studiích bylo dokázáno, že ani po nahrazení specifického ligandu jiným strukturně podobným ligandem, nedojde k plné aktivaci receptoru, pouze k jeho dimerizaci (Gilliland a Griffin, 2002). Po vazbě ligandu na receptor dochází k homodimerizaci původně monomerního FLT3. Následně se začne N-terminální část intracelulární domény otáčet směrem k C-terminální části a vytváří tak aktivní konformaci. Aktivní konformace odhalí 3 tyrosinová rezidua připravená k fosforylaci. V neaktivní formě je N-terminální lalok natočen směrem pryč od C-terminální části. Rotační pohyb domény je umožněn pomocí flexibilní interkinasové spojky spojující obě části (Grafone *et al.*, 2012). Plně aktivní receptor je posléze inaktivován defosforylací protein tyrosin-fosfatasou a přibližně 20 minut po aktivaci je komplex FL-FLT3 degradován. Na regulaci aktivity se podílejí SH2 vazebné domény protein tyrosin-fosfatasy zároveň se tyrosin-fosfatasová aktivita zvyšuje v reakci na aktivaci receptorové kinasy (Griffith *et al.*, 2004).

2.2.3 Ligand FL

Protein tvořící ligand patří do skupiny cytokinů (Parcells *et al.*, 2006). U FL bylo prokázáno na myších modelových buňkách, že podporuje expanzi CD34⁺ a NK buněčných progenitorů, které reagují na interleukin-15. To dokazuje zásadní roli FL ve vývoji NK buněk. Kromě vývoje NK buněk FL stimuluje vývoj dendrických buněk, což vedlo později k úvaze využití FL jako širokospektrálního protinádorového činidla. Již dříve bylo dokázáno, že FL indukuje regresi fibrosarkomu *in vivo*, inhibici růstu buněk C3L5 rakoviny prsu, inhibici melanomu a lymfomu (Gilliland a Griffin, 2002). Antitumorová aktivita byla prokázána také u chronické myeloidní leukémie. U AML však dochází k proliferaci buněk. Podávání FL má tedy dispozice k tomu, aby byl používán jako protinádorové činidlo u jiných typů malignit než AML. Na druhou stranu může způsobit u pacientů nežádoucí expanzi leukemických buněk (Gilliland a Griffin, 2002).

Gen pro FL o délce sekvence 4 a 5,9 kb se nachází na chromosomu 19 (19q13.3-13.4). Kódující oblast obsahuje osm exonů (McClanahan *et al.*, 1996). Primárním translačním

produktem je transmembránový protein typu 1. Celková délka proteinu je 235 aminokyselin. Z toho prvních 26 aminokyselin kóduje signální peptid, který poté ve zralé formě proteinu chybí. Extracelulární část proteinu kóduje 156 aminokyselin, transmembránová oblast je kódována 23 aminokyselinami a následně část cytoplasmatickou kóduje 30 aminokyselin. Dále je FL posttranslačně N-glykosylovaný. Ligand má strukturu homodimerního proteinu a v organismu se vyskytuje buď membránově vázaný, nebo v rozpustné formě. FL obsahuje tři intramolekulární disulfidické vazby, které nekovalentně spojují obě části homodimeru. Pro biologickou aktivitu je klíčová jádrová oblast proteinu, kterou utváří extracelulární část a obsahuje cysteinová rezidua zapojená do nekovalentní vazby. Cytoplasmatická a transmembránová oblast proteinu není důležitá pro biologickou aktivitu proteinu (Escobar *et al.*, 1995).

V organismu se může FL vyskytovat v těchto izoformách:

- Transmembránová forma s molekulovou hmotností 30 kDa. Je tvořena 4 transmembránovými alfa helixy, aminoterminální transmembránovou doménou a malou cytoplasmatickou doménou. Jedná se o nejvíce exprimovanou formu v organismu, která je aktivní na buněčném povrchu (Lyman *et al.*, 1994).
- Rozpustná biologicky aktivní forma, která vzniká proteolytickým odštěpením extracelulární části transmembránové isoformy (Lyman *et al.*, 1994).
- Rozpustná aktivní forma FL95 kódována 220 aminokyselinami. Jedná se o protein vázaný na membránu, ale ne o transmembránový protein. Tato forma je vytvořena alternativním sestřihem 6. exonu, ve kterém chybí sekvence zajišťující hydrofobní ukotvení v cytoplasmatické membráně, současně obsahuje předčasný stop kodon blízko extracelulární oblasti (Griffith *et al.*, 2004).

Membránově vázaná a rozpustná FL forma se vzájemně liší svými vlastnostmi i po tvorbě komplexu s receptorem FLT3. Zatímco rozpustná forma v komplexu FL/FLT3 podléhá rychlé internalizaci a následné degradaci, membránově vázaná forma v komplexu s FLT3 nepodléhá rychlé degradaci, což může vést k prodloužení kinasové aktivity (Stewart *et al.*, 1998).

2.2.4 Signalizace

2.2.4.1 Vazba FL na receptor FLT3

FL signalizace je vysoce závislá na růstových faktorech a bez jejich přítomnosti FL není schopen indukovat proliferaci *in vitro*. Společným účinkem s růstovými faktory a interleukiny se stává silným induktorem hematopoetické buněčné expanze. Nejvyšší proliferální účinek vykazuje FL v kombinaci s ligandem receptoru KIT a interleukinem-3 (Parcells *et al.*, 2006).

Neaktivní receptory se nacházejí na membráně ve formě monomerů, následnou indukci ligandu dojde k jejich homodimerizaci. K interakci dochází mezi třetí imunoglobulinu podobnou strukturou extracelulární domény receptoru a N-terminální doménou FL (Grafone *et al.*, 2012). Vazba FL na monomerní FLT3 receptor vede ke konformačním změnám receptoru, které umožní homodimerizaci dvou cytoplasmatických domén TK1 a TK2. Dimerové páry vystaví místa pro příjem fosfátů, což umožní transfosforylaci specifických tyrosinových residuí Tyr-589 a Tyr-591 a Tyr-842 v juxtamembránové doméně (Tse *et al.*, 2000; Lagunas-Rangel a Chavez-Valencia, 2017).

2.2.4.2 Signální kaskády podřízené FLT3

Signální transdukce byla prokázána již dříve na chimérických receptorech. Transdukce je zprostředkována asociací nebo fosforylací cytoplasmatických substrátů a efektorů, mezi něž patří p85 podjednotky fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), RAS/GTPasy, fosfolipasy C- γ , VAV, FYN, SRC, GRB2 a další (Obr. 2) (Tse *et al.*, 2001).

Jakmile je receptor aktivovaný, může asociovat s vazebným proteinem pro receptor růstového faktoru 2 (GRB2) a regulovat tak signalizaci efektorů (Masson *et al.*, 2009; Chonabayashi *et al.*, 2013). Komplex se může vázat přes SH2 doménu na SHC, nebo přes doménu SH3 na prolin, čímž aktivuje SOS1 (Scholl *et al.*, 2008). Experimenty dokazující tyto asociace byly provedeny již dříve na myších modelových buňkách. (Masson *et al.*, 2009; Chonabayashi *et al.*, 2013).

GRB2 aktivuje SOS1 a následně dochází ke spuštění signální kaskády ERK (Obr. 2). SOS1 je guaninový nukleotidový výměnný faktor pro RAS protein. SOS1 aktivuje výměnu nukleotidů RAS z neaktivní formy vázané s GDP, na aktivní formu vázanou s GTP (Grafone *et al.*, 2012).

Dráha RAS-RAF-MEK-ERK reguluje proliferaci, diferenciaci, přežití, senescenci a migraci buněk. K aktivaci dochází na základě odpovědi na růstové faktory, hormony a cytokiny. Vazba těchto stimulů k receptorům na plasmatické membráně podporuje GEF-zprostředkovanou aktivaci RAS a iniciuje třístupňovou kaskádu MAP kinas. RAS vázaný s GTP aktivuje RAF (Roskoski, 2010). Aktivovaný RAF fosforyluje MAP kinasové proteiny MEK1 a MEK2, které fosforylují kinasy ERK1 a ERK2 (Obr. 2) (Roskoski, 2012). Aktivované proteiny ERK mohou podlehnout dimerizaci a dále figurovat v signalizaci v cytosolu, část aktivovaných proteinů ERK je relokalizována do jádra (Roskoski, 2012). Dráha byla dříve považována pouze za lineární, pocházející z plasmatické membrány a kulminující v jádře. V současné době je známo, že RAS/RAF/MAP kinasová dráha je aktivována různými podněty přes různé receptory. Časová a prostorová specifita dráhy je částečně dána interakcí proteinů s cytoskeletárními proteiny.

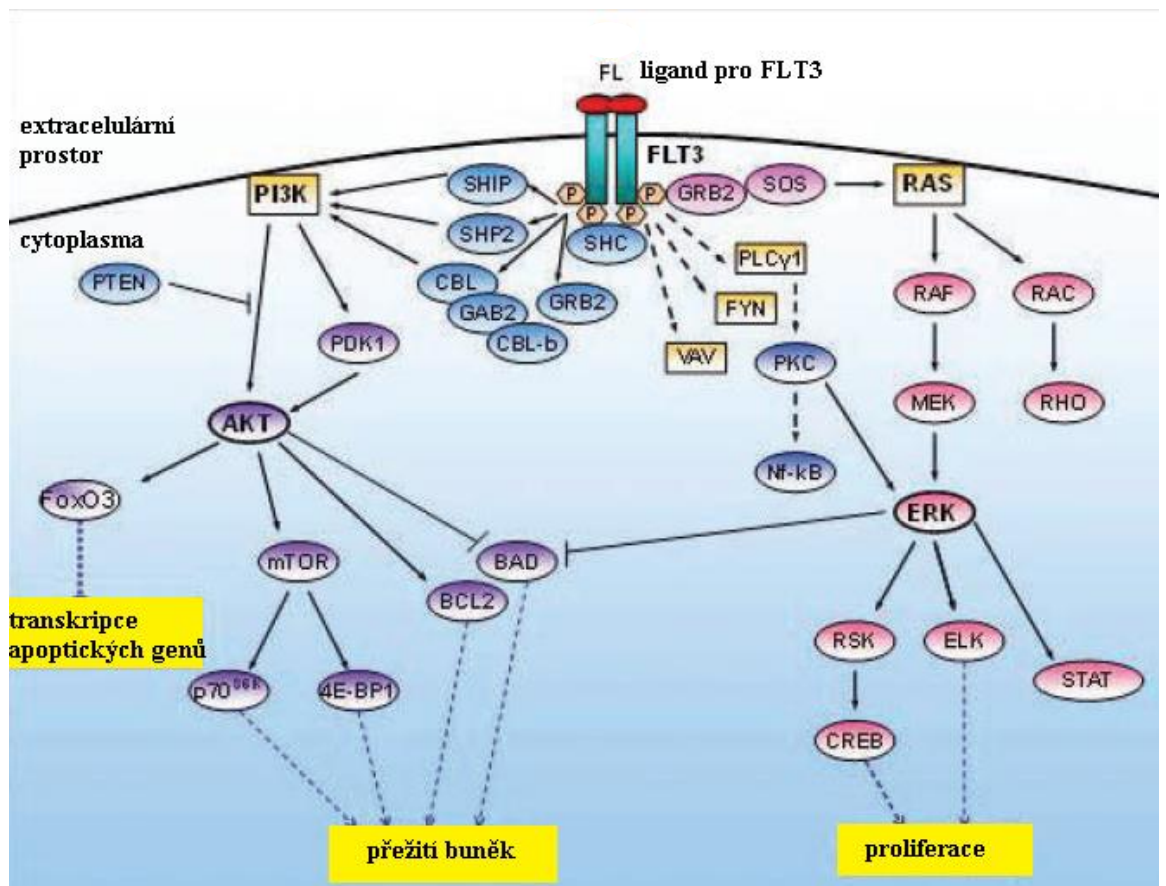
Podle provedených studií na myších modelových buňkách dochází po asociaci aktivovaného FLT3 a GRB2 k vazbě GRB2, SHP2 s GAB2 (GRB2-asociovaný vazebný protein 2) (Zhang *et al.*, 2000; Masson *et al.*, 2009; Chonabayashi *et al.*, 2013). V důsledku toho dochází k fosforylaci GAB2 a aktivaci regulační podjednotky α -fosfatidylinositol-3-kinasy. Dále dochází k vazbě p85 alfa regulační podjednotky PI3K na protein GAB2. Následně dochází k aktivaci dráhy PI3K/AKT (Zhang *et al.*, 2000; Masson *et al.*, 2009; Chonabayashi *et al.*, 2013). Aktivita PI3K je regulována SHC a SHIP (Obr. 2). Regulace probíhá na základě kompetice faktorů SHC, SHP2 a GRB2 (Zhang *et al.*, 2000).

Signální dráha PI3K/AKT stimuluje PDK1 a AKT. Dochází k aktivaci m-TOR. Podle studií na myších modelových buňkách, GAB2 váže tyrosin-fosfatasu nereceptorového typu 11 (PTPN11). Do této vazby je zapojen Ser623 v GAB2. (Zhang *et al.*, 2000). Typ 11 (PTPN11) se váže do fosforylačního místa Y599 receptorů FLT3, čímž usnadňuje regulaci efektorů (Heiss *et al.*, 2006; Nabinger *et al.*, 2013). Interakce FLT3 s PTPN11 je spouštěčem aktivity STAT5 zejména v patologických stavech (Heiss *et al.*, 2006; Nabinger *et al.*, 2013).

Tyrosin protein-kinasa FYN se váže na aktivovaný FLT3 v pozicích Y591, Y599 a Y955 prostřednictvím SH2 domény. FYN, společně s VAV ovlivňuje metabolismus fosfatidylinositolu (Chougule *et al.*, 2016).

Transduktor signálu a aktivátor transkripce (STAT) tvoří rodinu univerzálních transkripčních faktorů. STAT5 je komplexní označení pro dva příbuzné proteiny,

STAT5A a STAT5B. Oba proteiny mají důležitou funkci pro regulaci buněčné proliferace a přežití. Několik signálů včetně růstových faktorů a cytokinů je schopných aktivovat STAT5 (Nabinger *et al.*, 2013) Aktivace RAF/ERK/MAP kinasové dráhy aktivuje CREB a spouští expresi ELK a STAT (Obr. 2). Aktivace těchto transkripčních faktorů umožní buňkám proliferovat. FL neaktivuje proteiny z JAK rodiny, a proto se předpokládá, že u FLT3/ITD dochází k jiným aktivačním mechanismům, nezávislých na JAK dráze. To znamená, že v případě mutace FLT3/ITD je STAT5 fosforylován přímo (Choudhary *et al.*, 2005).



Obr. 2 Signální dráha aktivovaná receptorem FLT3 v normálních hematopoetických buňkách (upraveno a převzato z Grafone *et al.*, 2012).

2.3 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je skupina heterogenních maligních onemocnění hematopoetických buněk. Charakteristickým znakem je nekontrolovatelná proliferace a hromadění abnormálních blastových buněk v kostní dřeni, které infiltrují do periferní krve. Buňky se liší svou morfologií a karyotypem na základě získaných genových mutací a změn genové exprese (Šálek, 2012). Porušením krvetvorby buněk dochází k potlačení fyziologických funkcí těchto buněk, útlaku normální hematopoézy a tím k narušení imunitního systému. Dále se leukémie klinicky projevuje anémií, trombocytopenií, která způsobuje zvýšenou krvácivost a neutropenií. Klinicky se typ onemocnění klasifikuje podle výsledků imunofenotypizace, cytogenetických změn a molekulárně genetického profilu blastů. Existuje několik možností klasifikace AML.

Dnes již méně využívaná francouzsko-americko-britská klasifikace (FAB) rozděluje podtypy onemocnění na základě mikroskopického hodnocení buněk dle jejich morfologie. M1, M2 a M4 jsou podtypy s nejčastějším výskytem. Typ M3 se morfologicky vyznačuje výskytem velkého množství granul a auerových tyčí. Zároveň se jedná o typ s rychlým nástupem a bouřlivým průběhem doprovázeným koagulopatií. Podtypy M4 a M5 jsou charakteristické infiltrací leukemických buněk do orgánů (CNS, játra, slezina) (Tab. 1).

Další dnes hojně využívaná klasifikace je rozdělení skupin onemocnění ustanovené světovou zdravotnickou organizací (WHO). Jednotlivé podskupiny jsou charakterizovány imunofenotypizací podle CD antigenů na povrchu blastů a současně má prognostický význam. Onemocnění se dělí do tří skupin na AML s diagnostikovanou genetickou abnormalitou, AML s multilineární dysplasií a AML vznikající po léčbě cytostatiky (Tab. 2) (Šálek, 2012; Češka *et al.*, 2015).

Tab. 1 FAB klasifikace AML založená na mikroskopickém hodnocení buněk (Převzato z Česká leukemická skupina-pro život, kolektiv autorů, 2013).

Podtyp	Popis
M0	Minimální diferenciace buněk
M1 myeloblastická bez vyzrávání	V kostní dřeni jsou převážně nezralé blasty
M2 myeloblastická s vyzráváním	V kostní dřeni nezralé myeloblasty i zralé leukocyty
M3 promyelocytární	Translokace chromozomu 15 a 17
M4 myelomonocytární	Translokace/inverze chromozomu 16
M5 monocytární	Leukemické buňky mají znaky vyvíjejících se monocytů
M6 erytrocytární	Leukemické buňky mají znaky vyvíjejících se erytrocytů
M7 megakaryocytární	Leukemické buňky mají znaky vyvíjejících se megakaryocytů

Tab. 2 WHO klasifikace AML prezentující genetický profil (Převzato z Česká leukemická skupina-pro život, kolektiv autorů, 2013).

1. AML s rekurentními genetickými abnormalitami
AML s translokací chromozomu 8 a 12
AML s translokací/inverzí chromozomu 16
AML se změnami v chromozomu 11
Akutní promyelocytární leukémie s translokací chromozomu 15 a 17
AML s mutací v genu pro <i>Npm1</i>
AML s mutací genu <i>Cebpa</i>
2. AML s multilineární dysplasií
Vznikající z předchozího myelodysplastického syndromu
Nevznikající z předchozího myelodysplastického syndromu
3. AML vznikající v reakci na léčbu cytostatiky
Alkylačními cytostatiky
Ionizujícím zářením
Inhibitory topoizomerasy II.

2.3.1 Mutace u AML

Dle WHO je v současné době největší pozornost věnována vývoji léčby AML s mutacemi v genech *Flt3*, *Npm1*, *Cebpa*, *Runx1*, *Ras*, *Asx11* (Tab. 2) a některých dalších (Arber *et al.*, 2016). Nejčastější deregulace u AML je v receptoru KIT a jeho ligandu. Vazbou ligandu dochází k dimerizaci KIT a jeho aktivaci. Receptor aktivuje dráhy PI3K a RAS/RAF/MEK/ERK, výsledkem je proliferace hematopoetických buněk (Lennartsson *et al.*, 2005). Aktivační mutace KIT jsou v AML spojovány s t(8,21)(q22 ,q22) a inv(16)(p13, q22) (Scholl *et al.*, 2005). Mutace v nereceptorových tyrosin-kinasach jsou méně časté a vyskytují se v 1 % všech případů, například mutace JAK2 (V617F) (Dohner *et al.*, 2006).

2.3.2 Deregulace FLT3 u AML

RTK regulují síť komplexního přenosu signálu během procesu krvetvorby, proto změny ve struktuře receptoru či jeho expresi mohou způsobit leukemogenezi (Tse *et al.*, 2001). Genetické změny způsobují konstitutivní aktivaci receptoru v blastových buňkách. FLT3 je mutován u přibližně 1/3 pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), zároveň se jedná o diagnózu s velmi špatnou prognózou. Mutace receptoru FLT3 se mohou vyskytnout také u pacientů s akutní lymfocytární leukémií, chronickou myeloidní leukémií a myelodysplastickým syndromem (Tse *et al.*, 2001).

Jedná se buď o interní tandemovou duplikaci (ITD) aminokyselin juxtamembránové domény, která vede ke konstitutivní dimerizaci receptoru a vysoké konstitutivní tyrosin-kinasové aktivitě, nezávislé na interleukinu-3, nebo bodové mutace v aktivační smyčce, které zahrnují kinasovou doménu. Mutace FLT3 indukují konstitutivní aktivaci signální dráhy nezávislé na ligandu, což podporuje onkogenezi deregulací proliferace. Proto lze zařadit FLT3 mezi protoonkogeny (Parcells *et al.*, 2006). Konstitutivní aktivace receptoru ovlivňuje fosforylaci signálních molekul STAT5 a MAP kinas (ERK1/2). Obecně se mutace ITD v juxtamembránové doméně považuje za diagnózu s horší prognózou než bodové mutace (Tse *et al.*, 2001). I přes množství deregulovaných mechanismů si FLT3/ITD buňky dokáží udržet schopnost reagovat na FL ligand (Takahashi *et al.*, 2011).

2.3.2.1 Zvýšená exprese FLT3 receptoru

Zvýšená exprese nemutovaného FLT3 je běžná v buňkách AML i akutní lymfoblastické leukémie (Kottaridis *et al.*, 2003). K nadměrné expresi receptoru a ligandu dochází u leukemických buněk na úrovni mRNA i proteinu, což vede k vysoké aktivitě a silné deregulaci buněčné proliferace (Tse *et al.*, 2000).

2.3.2.2 Bodové mutace v aktivní smyčce FLT3

Bodové mutace, konkrétně substituce v tyrosin-kinasové doméně, umožní odkrytí vazebného místa pro ATP a cytoplasmatické substráty a současně zvýší pravděpodobnost aktivace receptoru. Aktivující bodové mutace FLT3 se vyskytují přibližně v 7 % diagnostikovaných AML, dále v některých případech akutní lymfoblastické leukémie a myelodysplastického syndromu (Gilliland a Griffin, 2002).

K mutacím dochází uvnitř exonu 20, v kodonech pro kyselinu asparagovou (D835) a isoleucin (I836). V místě 836 dochází k mutacím kodonu na methionin (I836M) nebo asparagin (I836N). V místě 835 bylo prozatím identifikováno pět různých typů mutací: nejhojnější substituce kyseliny asparagové za tyrosin (D835Y), která je dána mutací GAT → TAT. Dalším typem je substituce Asp za His (D835H), dána mutací GAT → CAT, substituce Asp za Val (D835V), dána mutací GAT → GTT, substituce Asp za Glu (D835E) a za Asn (D835N) (Yamamoto *et al.*, 2001).

U 0,5 % *de novo* případů se vyskytuje mutace, která má za následek inzerci glycinu nebo serinu mezi aminokyselinami 840 a 841. Další typ mutace byl objeven u pacientů po relapsu. Dochází k substituci Tyr na Cys v místě 842 (Y842C) a Asn na Ile (N841I) (Jiang *et al.*, 2004; Choudhary *et al.*, 2005).

2.3.2.3 FLT3/ITD a signalizace

Mutace FLT3/ITD je považována za významnou událost přispívající k vývoji AML. Jedná se o mutaci genu *Flt3* s nejčastějším výskytem u AML. Podle statistik je FLT3/ITD diagnostikováno u 17-26 % případů *de novo* AML. Současně může mutace vznikat u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a myelodysplastickým syndromem (Gilliland a Griffin, 2002). Poprvé byla mutace identifikována při screeningu primárních vzorků leukémie pro expresi FLT3 použitím reverzní transkriptasy. Po ukončení PCR vykazovaly produkty amplifikace polymorfni délku v juxtamembránové doméně, než byla očekávaná. Následná sekvenace odhalila, že se jedná o inzerční mutaci, která je

s největší pravděpodobností způsobena poruchami opravných mechanismů DNA během replikace (Parcells *et al.*, 2006).

Tato mutace se většinou vyskytuje v heterozygotní formě. Heterozygotní forma mutace se však během vývoje nemoci a léčby může změnit na homozygotní a vznikají tak bialelické mutace, navíc jsou FLT3/ITD receptory schopné heterodimerizovat s nemutovaným FLT3 (Gale *et al.*, 2008).

Během mutace ITD dochází k duplikaci variabilního množství bází. Duplikace, které jsou vždy v násobcích 3, zasahují do čtecího rámce v exonech 14 a 15. Tyto exony kódují právě juxtamembránovou doménu (Sritana a Auewarakul, 2008). Délka duplikace může být 3-400 bp. Následkem duplikace je inserce opakujících se aminokyselinových sekvencí ve variabilní pozici na juxtamembránové doméně (Brown a Small, 2004). Aby došlo k funkční vnitřní tandemové duplikaci, fragment nesoucí kódující oblast juxtamembránové domény musí být vložen do exonu v přímém směru tak, aby byl zachován čtecí rámeček transkriptu. V nedávné době byla objevena nová třída aktivních bodových mutací v juxtamembránové doméně, které vedou k poruchám autoinhibiční schopnosti a pravděpodobně vznikají jako rezistence na léky (Stirewalt a Radich, 2003; Breitenbuecher *et al.*, 2009).

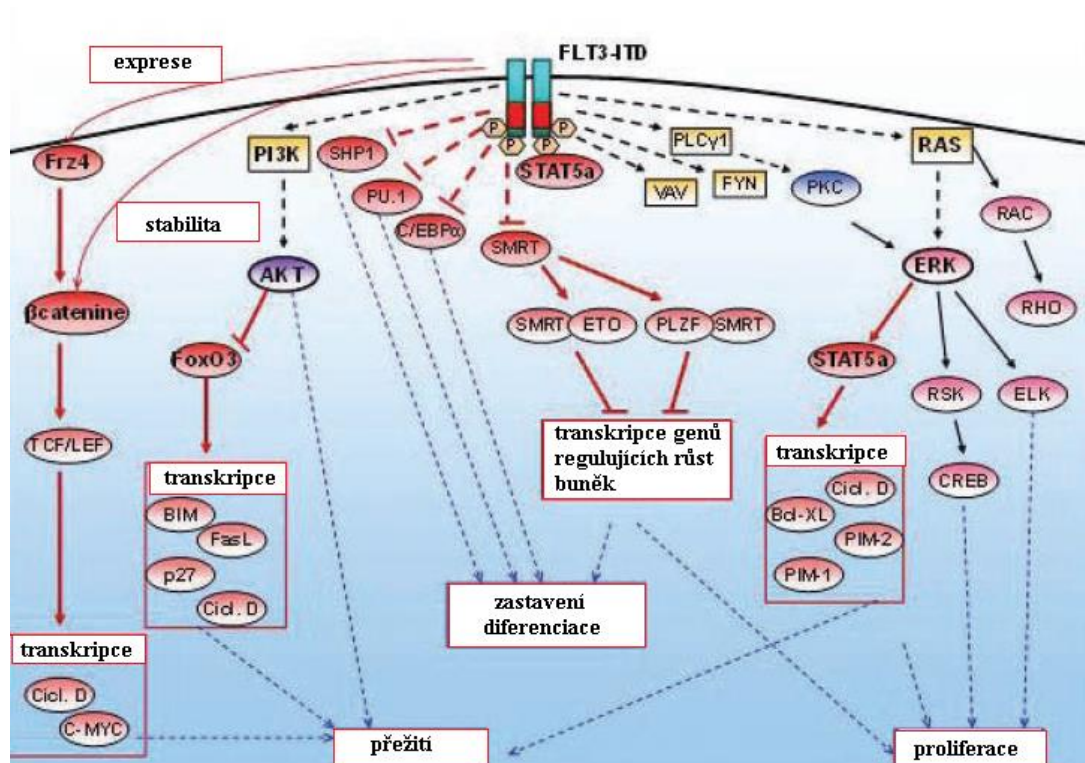
Samotná mutace ve FLT3 není odpovědná za leukemogenezi, během vývoje leukémie dochází k mnoha dalším mutacím, které podporují buněčnou proliferaci a inhibici apoptózy. Mutace FLT3/ITD například často koexistuje s mutacemi nukleofosminu (NPM1) a DNA methyltransferasy 3A (Patel *et al.*, 2012). Mutace FLT3/ITD aktivuje p22phox a NOX4, které jsou odpovědné za tvorbu ROS (Stanicka *et al.*, 2015). ROS napomáhají vzniku chyb v opravných mechanismech replikace, což může vést ke genomové nestabilitě a tvorbě dvouvláknových zlomů DNA (Sallmyr *et al.*, 2008).

V buňkách s FLT3/ITD mutací jsou aktivovány RAS a PI3K, stejně jako ve zdravých buňkách (Mitin a Rosman, 2005). Narozdíl od zdravých buněk dochází v buňkách s FLT3/ITD k nadměrné fosforylaci STAT5, který se poté váže na DNA (Stirewalt a Radich, 2003). Fosforylace STAT5 se společně s aktivací MAPK stává kritickým bodem pro růst. Dochází k aktivaci cyklinu D, BCL-XL, PIM kinas a c-MYC, které v buňkách podporují proliferaci, nebo zastávají antiapoptickou funkci (Obr. 3) (Mizuki *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2004).

FLT3/ITD je schopný inhibovat SMRT (silencing mediator of retinoic acid tyroide hormone receptors), a korepresor, který interaguje s PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) a ETO (eight twenty one). PLZF a ETO se podílejí na brždění proliferace, umlčují

cílové geny a tím regulují buněčný růst (Takahashi, 2011). Dochází k aktivaci AKT a fosforylaci FOX3a v Thr32 (Obr. 3) a následkem toho je FOX3a translokován z jádra do cytoplasmy. Inhibicí, nebo potlačením funkce jsou buňky FLT3/ITD schopné zabránit apoptóze (Takahashi, 2011). Další rozdíl v signalizaci zdravých buněk a buněk s FLT3/ITD je rozdílná exprese několika transkripčních faktorů. V buňkách FLT3/ITD dochází k potlačení exprese PU.1 a CEBP (Obr. 3). Během normálního myeloidního vývoje i v buňkách s bodovou mutací ve FLT3 jsou oba transkripční faktory exprimovány (Zheng *et al.*, 2004).

K zesílení antiapoptického efektu přispívá inhibice fosfatasy SHP-1 (Chen *et al.*, 2005). Mutovaný receptor indukce expresi receptoru FRZ-4 (Frizzled-4) (Obr. 3). Aktivace FRZ-4 reguluje stabilitu transkripčního koaktivátoru B-kateninu. Po vazbě ligandu se nefosforylovaný B-katenin akumuluje v cytoplasmě a dochází k jeho transportu do jádra, kde koaktivuje transkripční faktor TCF/LEF (Obr. 3). Jeho cílové proteiny jsou c-MYC a cyklin D1, které podporují buněčnou proliferaci (Tickenbrock *et al.*, 2005).



Obr. 3 Signální dráhy aktivované receptorem FLT3 s mutací ITD (upraveno a převzato z Grafone *et al.*, 2012).

2.4 Léčba AML

2.4.1 Kurativní cytotoxická chemoterapie

Během kurativní léčby se používají chemoterapeutické látky k likvidaci nebo kontrole růstu nádorových buněk. Léčba AML je rozdělena do tří fází:

- Fáze indukční = velmi krátká a intenzivní léčba antracyklinem a cytarabinem, probíhá asi týden (program 7+3), hlavním cílem je vyčistit krev a kostní dřeň od většiny leukemických blastů.
- Konsolidační fáze = účelem je zabít zbylé leukemické buňky, které se stále nachází v těle pacienta.
- Fáze udržovací = trvá v řádu měsíců až let, během ní jsou podávány snížené dávky léku a trvá do navození remise.

Mezi každou léčebnou fází je dodržována doba odpočinku, která slouží k regeneraci těla pacienta. K léčbě AML se používají nejčastěji chemoterapeutika: kladribin, fludarabin, mitoxantron, etoposid, 6-thioguanin, hydroxymočovina, kortikosteroidy (prednison, dexamethason), 6-merkaptopurin, azacitidin, cytarabin, antracykliny (daunorubicin) a dicitabin. Zejména během první fáze léčby jsou podávány vysoké dávky chemoterapeutik, které intenzivně působí na maligní i zdravé buňky a mohou tak způsobit vážné vedlejší komplikace, proto se látky podávají vždy v nemocnicích. Vliv negativních vedlejších účinků zaleží na typu, dávce a délce užívání.

Nejčastější vedlejší účinky jsou ztráta vlasů, ztráta chuti k jídlu, nevolnost, zvracení, průjem, snížení počtu krevních buněk, krvácení, podlitiny, záněty žil, únava, dušnost a problémy s koordinací. Mezi závažnější vedlejší účinky patří snížení populace bílých krvinek, vlivem čehož se stává pacient velmi náchylným na infekce a bakteriální onemocnění. Tento problém je řešen podáváním antibiotik současně s cytotoxickými léky. Dále se během nedostatku bílých krvinek podávají léky filgastim, pegfilgastim a sargramastin. Navíc se projevuje u pacientů trombocytopenie, erytrocytopenie, které jsou kompenzovány podáváním léků nebo transfúzí. Během chemoterapie může dojít k poškození orgánů, nejčastěji srdce, ledvin, jater, CNS a pohlavních orgánů. Vedlejším účinkem první fáze léčby je syndrom nádorové lýze. Během intenzivní léčby dochází k rozbití velkého množství blastů, jejichž obsah je uvolněn do krve. Ledviny pod tlakem nestíhají čistit krev a následně hrozí poškození CNS a srdce. Jako prevence

se podávají hydrogenuhličitan, allopurinol a rasburikáza (The American Cancer Society kolektiv autorů, 2018).

Ačkoliv je klasická chemoterapie ve většině případů používaná jako hlavní léčba, není doporučována pacientům, jejichž zdravotní stav nedovoluje podstoupení kurativní léčby. Pro tyto případy se používá cytoredukční léčba hydroxymočovinou a komplexní podpůrná paliativní léčba. Další doplňková léčba je radioterapie, která bývá prováděna v případech, kdy expandující leukemické buňky ohrožují funkci CNS. Radioterapie je také běžným úkonem prováděným před provedením transplantace kmenových buněk. Jiný léčebný postup se využívá také pro léčbu relapsu, kdy je třeba pacientům podávat vysoké dávky chemoterapeutik a její součástí bývá autologní nebo allogenní transplantace buněk. U pacientů po relapsu je zároveň důležité vyhodnocení rizik a zdravotního stavu pacienta, zda je vůbec schopen tuto léčbu podstoupit. Proto se léčebný postup vyhodnocuje individuálně (Češka *et al.*, 2015; The American Cancer Society kolektiv autorů, 2018).

2.4.2 Cílená léčba

Cílená terapie je léčba zaměřená na specifické genetické abnormality a specifické deregulované molekulární dráhy, vyskytující se v určitém typu nádorových buněk, které jsou klíčové pro udržení maligního fenotypu (Perl, 2019).

Z důvodu podílu receptoru FLT3 na mechanismu leukemogeneze je v současné době FLT3 považován za významný terapeutický cíl léčby a v současnosti jsou klinicky testovány inhibitory FLT3, které by mohly být vhodné pro léčbu AML s příslušnou mutací. Z důvodu strukturní podobnosti aktivního místa ostatních RTK III. třídy s FLT3, nejsou inhibitory vůči receptoru vždy úplně specifické a inhibují aktivitu i ostatních RTK. Proto často dochází ke vzniku vedlejších účinků v reakci na inhibitor. Inhibitory se dělí na dvě kategorie dle selektivity a podle toho na jakou konformaci aktivační smyčky se vážou (Watson *et al.*, 2014).

- Inhibitory I. generace se vážou ke konformaci DFG-in aktivační smyčky. Účinek látek je založen na kompetitivní inhibici vzhledem k ATP. Látky z této skupiny jsou méně specifické a většinou inhibují i jiné RTK III. třídy (Lancet, 2015). Mezi inhibitory I. generace patří: sorafenib, sunitinib, lestaurinib (CEP701), midostaurin (PKC412) a tantudininib (MLN518).
- Inhibitory II. generace se vážou na konformaci DFG-out aktivační smyčky. Látky účinkují na principu vazby do ATP vazebného místa, také se vážou do oblasti zadního

laloku, které je uvolněno pohybem fenylalaninového rezidua. Mezi receptory II. generace patří: linifanib, ponatinib, pacritinib (SB1518), quizartinib (AC220), dále vývojově mladší více selektivní inhibitory: crenolanib (CP868-596), AC22014 a gilteritinib (ASP2215) a další (Angiolini, 2011).

Přepokládaným účinkem látek je zastavení buněčného cyklu, inhibice proliferace a navození apoptózy. Účinnost inhibitorů je variabilní a současně je závislá na farmakokinetických vlastnostech léku. Mezi ně patří například gastrointestinální absorpce, metabolismus léčiva, interakce s jinými léky. Mikroprostředí kostní dřene navíc poskytuje buňkám ochranu před inhibitory, čímž je činí méně citlivé (Grunwald a Levis 2013). Pro zvýšení účinnosti léčby se inhibitory využívají v kombinaci s chemoterapeutiky, hypomethylačními činidly a transplantací kmenových buněk.

Přestože by v kombinaci s chemoterapeutiky mělo dojít ke zlepšení stavu pacienta, stále existuje řada problémů. Například inhibitory I. generace mohou vykazovat nedostatečný inhibiční účinek, který může vést až ke ztrátě účinnosti. Navíc jsou inhibitory I. generace nadměrně toxické z důvodu nízké specifity, a proto se nejčastěji využívají během indukční fáze léčby. Následně, během udržovací fáze, se využívají selektivní inhibitory II. generace, které mimo to mohou být použity i samostatně (Levis, 2017). Během monoterapie mají inhibitory II. generace celkovou míru odezvy 40-50 %, zatímco inhibitory I. generace jen 0-3 %. V kombinaci inhibitorů I. generace s chemoterapeutikem celková míra odezvy narůstá k hodnotám 20-40 % (Perl *et al.*, 2017).

2.4.3 I. generace inhibitorů

2.4.3.1 Sorafenib

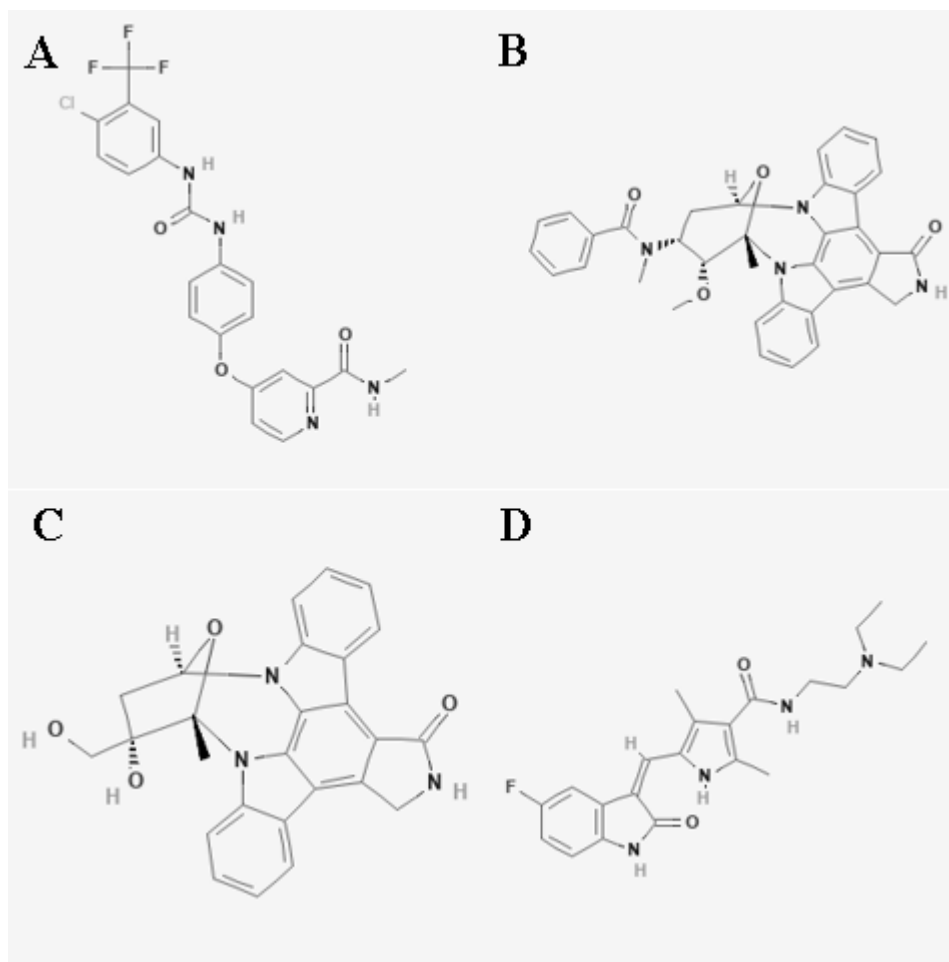
Sorafenib (Obr. 4A) je multikinasový inhibitor. Inhibiční aktivitu vykazuje proti RAF, VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, FLT3, RET a KIT. Sorafenib má dávkovací režim 2x denně, používá se v léčbě společně s chemoterapeutiky cytarabinem a idarubicinem (Daver *et al.*, 2019). Během léčby starších pacientů nebylo pozorováno zlepšení, naopak se statisticky zvýšila mortalita. Během léčby pacientů mladších generací, s dříve neléčenou AML, však došlo ke statisticky významnému zlepšení. Sorafenib se stále nachází ve fázi klinického testování, které je zdlouhavé vzhledem ke zvýšené toxicitě léku, kvůli inhibici velkého množství proteinů. Vedlejšími účinky sorafenibu jsou vyrážky, průjem, krvácení a horečka. V současné době je pro léčbu dostupný mimo označení (Perl, 2019).

2.4.3.2 Midostaurin

Midostaurin (Obr. 4B) byl původně vytvořen pro inhibici proteinkinasy C a vykazuje multikinasovou inhibiční aktivitu. Inhibuje mutace FLT3/ITD i varianty s mutacemi v TKD, dále pak AKT, SRC, PDGFR, VEGFR a KIT. Dosavadní studie ukazují velmi slibné účinky midostaurinu v kombinaci s chemoterapeutiky během indukční a konsolidační fáze léčby. Podle statistik dochází k významnému zlepšení celkového přežití pacientů oproti léčbě samotným chemoterapeutikem. Navíc je midostaurin pacienty velmi dobře snášen. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří pocit nevolnosti, průjem, krvácení, podlitiny a kožní vyrážka. U pacientů může být současně diagnostikována anémie (Stone *et al.*, 2017). V roce 2017 byl midostaurin schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro indukční a konsolidační léčbu AML pozitivní na FLT3/ITD a FLT3/TKD s daunarubicinem a cytarabinem (Perl, 2019).

2.4.3.3 Lestaurtinib

Lestaurtinib (Obr. 4C) je širokospektrální inhibitor. Svou aktivitu vykazuje proti JAK2, JAK3, FLT3 a dalším proteinům. Studie prováděné během klinických testů ukázaly, že přínos pro celkové přežití pacientů má lestaurtinib v případech, že již došlo alespoň k 85 % inhibici FLT3. Vykazuje tedy potenciál pro použití během udržovací fáze léčby, nebo intenzivní léčby AML u pacientů s vyšší věkovou hranicí společně se sníženou



Obr. 4 Strukturální vzorce inhibitorů I. generace: 4A = sorafenib, 4B = midostaurin, 4C = lestaurtinib, 4D = sunitinib.

dávkou chemoterapeutik. Vedlejšími účinky inhibitoru je pocit nevolnosti, průjem a zvýšený bilirubin. Během léčby existuje riziko vzniku sepse, infekce a infarktu myokardu (Daver *et al.*, 2019).

2.4.3.4 Sunitinib

Sunitinib (Obr. 4D) vykazuje inhibiční aktivitu proti FLT3 mutacím v TKD a KIT, RET, PDGFR2 a VEGFR. Doporučuje se použití pro indukční a konsolidační léčbu s cytarabinem nebo daunarubicinem nově diagnostikované AML u pacientů s vyšší věkovou hranicí. Momentálně se nachází ve 2. fázi klinického testování. Vedlejší účinky jsou nechuť k jídlu, bolest hlavy. Může způsobit neutropenii a myelosupresi (Daver *et al.*, 2019).

2.4.3.5 Ponatinib

Jedná se multikinasový inhibitor. Látka vykazuje inhibiční aktivitu proti ABL, PDGFR, VEGFR2, KIT, RET a dalším RTK. Zaznamenané vedlejší účinky jsou pocit nevolnosti a pankreatitida (Daver *et al.*, 2019).

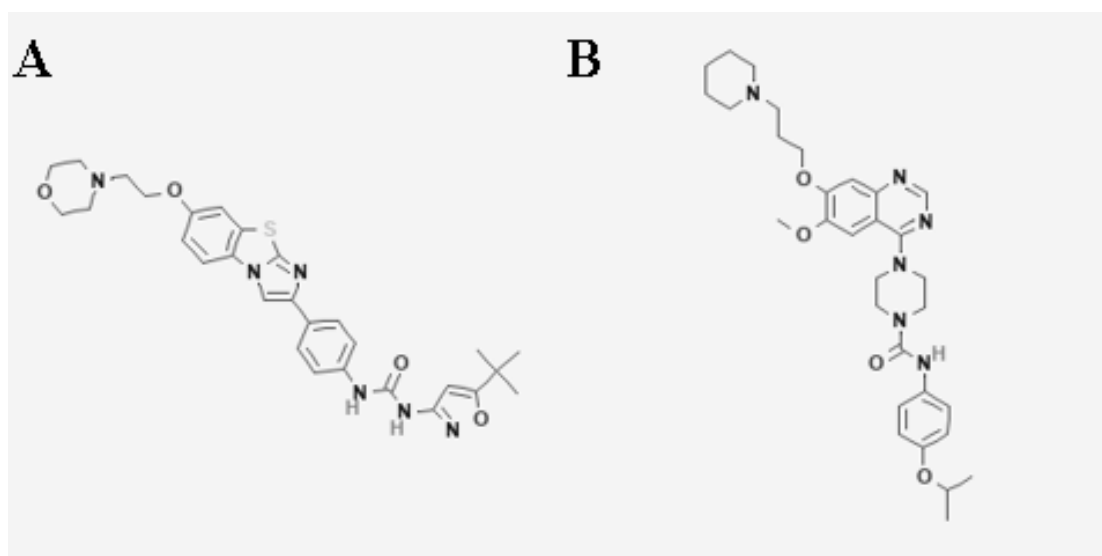
2.4.4 II. generace selektivních inhibitorů

2.4.4.1 Quizartinib

Quizartinib (Obr. 5A) je silný selektivní inhibitor podávaný při léčbě FLT3/ITD, neinhibuje však FLT3 s mutací v TKD. Specifickým cílem quizartinibu je neaktivní konformace receptoru. Dále inhibuje KIT a PDGFR. Vykazuje účinky u pacientů s *de novo* diagnostikovanou AML. V současné době se nachází ve 3. fázi klinických testů pro léčbu v kombinaci s daunarubicinem a cytarabinem, léčbu pacientů po relapsu nebo transplantaci kmenových buněk (Daver *et al.*, 2019). Vedlejší účinky jsou hypoglykémie, hypotenze, trombocytopenie, neutropenie (Smith *et al.*, 2017).

2.4.4.2 Tandutinib

Inhibitor tandutinib (Obr. 5B) vykazuje aktivitu proti FLT3/ITD, KIT a PDGFR. Během testů došlo k zastavení růstu FLT3/ITD pozitivních buněčných linií. Nežádoucím vedlejším účinkem je svalová slabost (Daver *et al.*, 2019).



Obr. 5 Strukturní vzorce inhibitorů II. generace: 5A = quizartinib, 5B = tandutinib.

2.4.4.3 Gilteritinib

Gilteritinib (Obr. 6A) je selektivní inhibitor FLT3 a AXL, který je nadměrně exprimován v AML buňkách. Gilteritinib vykazuje specifitu pro aktivní i neaktivní konformace FLT3 (Daver *et al.*, 2019). Gilteritinib byl v roce 2017 schválen americkým FDA jako lék pro léčbu pacientů po relapsu s neustupující FLT3 mutací, kteří mají vybudovanou rezistenci na quizartinib a sorafenib. Léčba gilteritinibem má vysokou míru odezvy a navození remise. Navíc byl gilteritinib první inhibitor, u něhož bylo schváleno použití jako monoterapeutikum. Vedlejšími účinky je únava, průjem, anémie, zvýšená koncentrace aminotransferázy (Perl, 2019).

2.4.4.4 Pacritinib

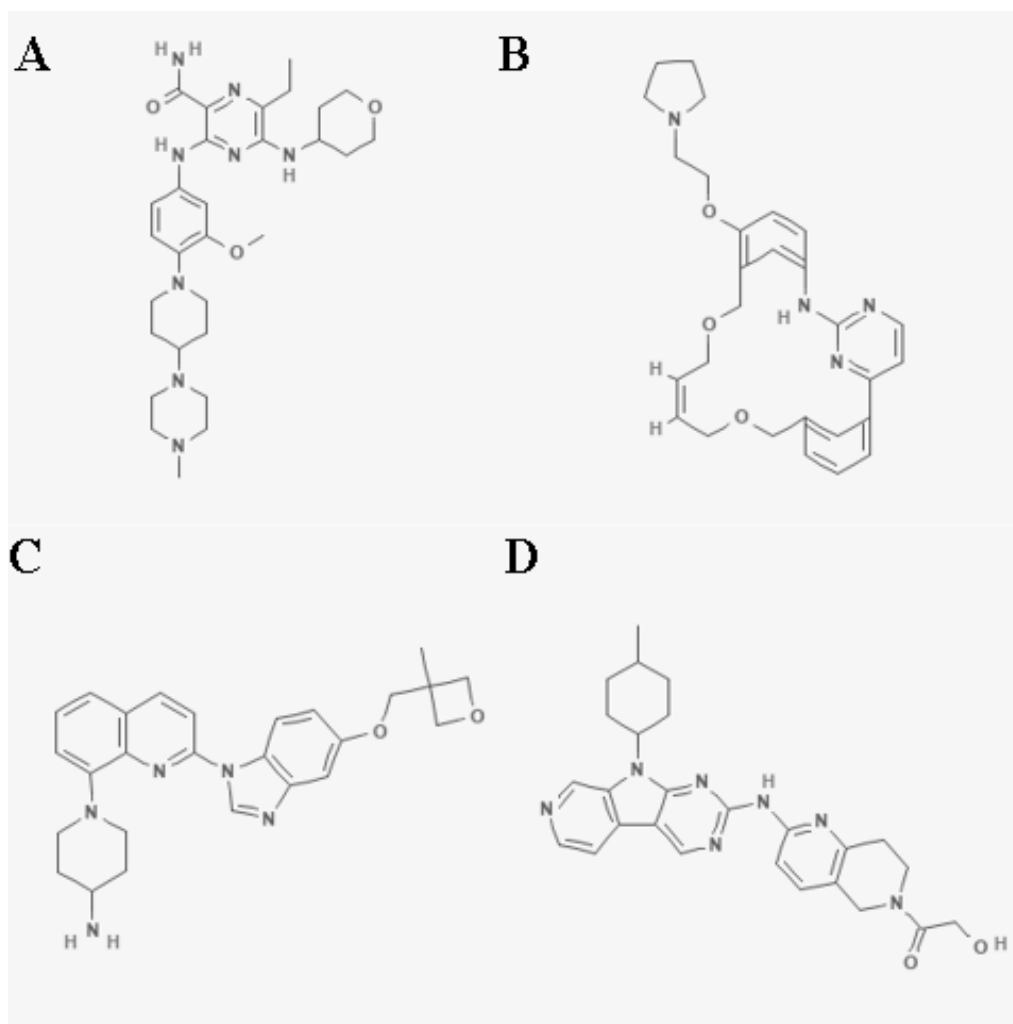
Látka pacritinib (Obr. 6B) selektivně inhibuje JAK2 a FLT3. JAK je rodina cytoplasmatických proteinů, které řídí v buňce proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt. Největší účinnost má inhibitor proti mutaci FLT3/ITD, u které je často také deregulovaná dráha JAK. Inhibicí dochází k zablokování drah PI3K, MAPK a STAT. Během testů látka prokázala antileukemickou aktivitu u buněčných linií MV4-11 a MOLM-13, zároveň indukovala zastavení proliferace myších xenograftů již po 7 dnech léčby. Látka je ve 2. fázi vývoje a její použití se předpokládá pro léčbu pokročilých myeloidních malignit (Yuan *et al.*, 2019).

2.4.4.5 Crenolanib

Inhibitor crenolanib (Obr. 6C) vykazuje aktivitu proti FLT3 mutacím ITD i TKD s cílením na aktivní i neaktivní konformaci. Dalším buněčným cílem je PDGFR. Na liniích MV4-11 vykazoval inhibiční aktivitu na mutace FLT3 ITD, TKD D835H, D835Y, F691L a mírnou inhibici ITD/ D835Y (Yuan *et al.*, 2019). Crenolanib má vysokou účinnost v *de novo* diagnostikované AML a podle studií je celková míra odezvy na lék 96 %. Jedním z hlavních nedostatků je krátký poločas v těle pacientů (6-8 hodin) bez akumulace po dlouhodobém užívání. Dávkovací režim je proto vyžadován 3x denně. V současné době se nachází ve 3. fázi klinického testování (Daver *et al.*, 2019). Vedlejšími účinky jsou pocit nevolnosti, zvracení, zadržování vody a vyrážka (Smith *et al.*, 2014; Ohanian *et al.*, 2016).

2.4.4.6 AMG925 (FLX925)

Kromě FLT3, látka AMG925 (FLX925) (Obr. 6D) selektivně inhibuje CDK4, která je závislá na cyklinu D a podporuje přechod buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu. Deregulace dráhy FLT3 receptoru vede mimo jiné k expresi cyklinu D, vlivem toho dochází k potlačení funkce p15 a následně k proliferaci. Selektivní inhibice těchto dvou kinas má potenciál k překonání problému vznikající rezistence na léky. Duální inhibice FLT3 a CDK4 v testech indukovala zastavení buněčného cyklu, apoptózu a silné potlačení proliferace u linií buněk AML MV4-11. Látka má dobré farmakokinetické vlastnosti. V současné době byla dokončena 1. fáze preklinického výzkumu s předpokladem použití pro léčbu pacientů po relapsu a neustupující AML (Baker a Reddy, 2012; Yuan *et al.*, 2019).



Obr. 6 Strukturální vzorce inhibitorů II. generace: 6A = gilteritinib, 6B = pacritinib, 6C = crenolanib, 6D = AMG925 (FLX925).

2.4.5 Rezistence ke specifické léčbě a vývoj dalších sloučenin

Hlavní výzvou v současnosti je překonání primární a sekundární rezistence na cílenou léčbu. Obecně k rezistenci přispívá deregulovaná aktivita STAT5 a MAPK způsobená konstitutivní aktivitou FLT3. Primární rezistence vůči TKI není dosud přesně objasněna. U inhibitorů první generace může být zřejmě rezistence způsobená užíváním nízkých dávek, které jsou rychle metabolizovány v játrech cytochromem P450, nebo nízkou účinností (Daver *et al.*, 2019). Léčivo bývá často podáváno v nízkých koncentracích z důvodu vysoké toxicity látek. Nejčastěji bývá rezistence pozorována po dlouhodobém užívání léku v důsledku vznikajících mutací v kinasové doméně.

První rezistentní mutace byla detekována u pacienta po relapsu s FLT3/ITD, který byl léčen midostaurinem. Došlo ke vzniku mutace N676K, která brání vazbě inhibitoru (Heidel, 2006). Další mutace (F621L, A627P, F691L) udělují rezistenci na midostaurin, sunitinib, sorafenib a lestaurtinib *in vitro*. Rezistenci na quizartinib uděluje mutace F691L (Albers *et al.*, 2013). Různé mutace v D835 TKD vedou ke zvýšení kinasové aktivity a indukci antiapoptických signálů pomocí exprese proteinů BCL-XL a RAD1 (Smith *et al.*, 2012). Vznik obou mutací FLT3-ITD-TKD v jedné alele je poměrně vzácný a vyskytuje se u 1-2 % případů AML (Bagrintseva *et al.*, 2005). Druhá mutace může vzniknout až v průběhu onemocnění nebo vlivem dlouhodobé expozice tyrosin-kinasovým inhibitorům. Jedna z možností do budoucna je strategie kombinování léčebných režimů (Daver *et al.*, 2019) nebo vývoj nových dalších inhibitorů s odlišnými farmakologickými vlastnostmi a inhibiční aktivitou zaměřenou na dva a více buněčných cílů, které jsou uvedeny níže (Albers *et al.*, 2013).

Z důvodu vznikajících rezistencí na již existující léčiva je stále věnována pozornost vývoji dalších sloučenin, které vykazují selektivní inhibiční efekt na FLT3 a dalších RTK. Například inhibitor E6201 zastavuje fosforylaci proteinů deregulovaných drah RAS/RAF/MEK/ERK/MAP a FLT3. U pacientů s FLT3/ITD, ačkoliv dojde k inhibici FLT3, dráha ERK zůstává ve většině případů stále aktivována. Proto má současná inhibice MEK vysoký potenciál pro účinnou léčbu AML. Během testů látka prokázala inhibici buněčného růstu a indukci apoptózy u AML buněčných linií a *in vivo* v myších xenograftech. Zároveň neprojevila žádný proapoptický účinek na normální myeloidní buňky (Yuan *et al.*, 2019).

Další testovanou látkou je TAK-659. Jedná se o inhibitor selektivně inhibující SYK a FLT3/ITD. SYK se účastní transformace ITD a jeho konstitutivní aktivita má vliv

na vznik rezistence buněk k selektivním inhibitorům. Jeho inhibiční aktivita byla testována na buněčných liniích MV4-11, MOLM-13 a OCI-LY10. Dále jsou testovány účinky N-fenylpyrimidin-2-aminových derivátů, které vykazují aktivitu proti FLT3 a MNK2. Inhibice může potlačit rezistenci zprostředkovanou aktivací m-TOR a MAPK (Yuan *et al.*, 2019).

Látky SGI-1776, SEL24-B489 a EC70124 jsou duálními inhibitory FLT3 a PIM kinas u AML. Aktivace PIM kinas je způsobena nadměrnou fosforylací STAT5 a vede k inhibici apoptózy. Preklinické testy ukázaly slibnou inhibiční aktivitu látek. SGI-1776 však selhala během klinického testování kvůli zvýšené toxicitě na srdce způsobené afinitou k hERG. Další dvě látky, které již mají upravenou strukturu, mají tuto afinitu sniženou, a navíc jsou více metabolicky stabilní (Yuan *et al.*, 2019).

Deriváty acylureidoinolin-2-onu vykazují inhibiční aktivitu proti aurora B a FLT3. Aurora kinasy se podílejí na regulaci buněčného cyklu a bývají často nadměrně exprimovány v buňkách AML. Inhibice byla prokázána v testech na liniích MV4-11 a MOLM-13, kdy došlo u buněk k zastavení cyklu v G2M kontrolním bodě. Aktivitu inhibitor vykazoval i u buněk rezistentních na sunitinib a buněk s FLT3/D835Y mutací rezistentní na quizartinib. Na druhou stranu látky vykazují toxicitu zvýšenou afinitou k hERG, proto se vývoj zaměřuje především na optimalizaci jejich vlastností (Yuan *et al.*, 2019).

Další inhibitor, který je ve fázi testování, je látka UNC2025. Inhibuje FLT3 a MER exprimovaný v buňkách AML, ale jen zřídka ve zdravých prekurzorech v kostní dřeni. Aktivuje signalizaci ERK1/2, AKT a STAT6, které napomáhají maligním buňkám v přežití. Vzhledem k cílení pouze na maligní buňky má inhibitor potenciál pro léčbu pacientů, kteří nejsou schopní zvládnout klasickou chemoterapii (Yuan *et al.*, 2019).

Dále látky TAE-684, WZ4-49-1 a HG79201 vykazují selektivní inhibiční aktivitu k FLT3 v buňkách s konstitutivně aktivní FLT3 ITD i TKD v D835Y. Testování bylo prováděno na liniích MV4-11 a MOLM-13 u kterých došlo k inhibici růstu a navození apoptózy (Yuan *et al.*, 2019).

V Laboratoři růstových regulátorů (Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.) byly vyvinuty 2,6,9-trisubstituované puriny, které vykazovaly silnou a specifickou aktivitu proti buněčným liniím MV4-11 a MOLM-13 odvozeným od AML s aktivační mutací FLT3/ITD (Gucký *et al.*, 2018).

Analýzou vztahů mezi strukturou a aktivitou bylo zjištěno, jak se jednotlivé substituenty projevují na biologické aktivitě. Řadou dalších buněčných a biochemických experimentů bylo prokázáno, že tyto látky silně inhibují deregulovaný receptor FLT3 a jeho podřízené signální dráhy. V předběžných pokusech *in vivo* byla prokázána schopnost jedné z látek silně potlačovat aktivaci FLT3. Provedením dalších modifikací v pozicích 6 a 9 byly připraveny nové sloučeniny s nižším cytotoxickým efektem na netransformované buňky a současně zachovanou účinností proti leukemickým liniím. Dále bylo zjištěno, že látky jsou schopné inhibovat kromě FLT3 také příbuzný receptor PDGFR. Účinnost sloučenin byla prokázána také na buněčné linii EOL-1, která je odvozená od eosinofilní leukémie s onkogenní aktivací PDGFR (Řezníčková *et al.*, 2019).

Paralelně byly v rámci spolupráce Laboratoře růstových regulátorů a Katedry organické chemie (Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci) identifikovány další strukturně zcela odlišné sloučeniny, které byly předmětem zkoumání v rámci této bakalářské práce. Tyto sloučeniny současně inhibují receptor FLT3 a kinasy CDK4, CDK2 (Kryštof, nepublikované výsledky). Pro celou sérii látek byl stanoven také vliv na proliferaci tří typů buněčných linií včetně MV4-11 (Kryštof, nepublikované výsledky). Na základě předběžných výsledků byly pro tuto práci vybrány sloučeniny **6942** a **7225**, které vykazovaly významnou selektivitu vůči MV4-11, zatímco u linií MCF-7 a K-562 účinek tak vysoký nebyl. Tato předběžná data jsou shrnuta v tabulce 3. Z důvodu ochrany duševního vlastnictví souvisejícího s těmito sloučeninami nejsou v této bakalářské práci struktury látek záměrně uvedeny.

Tab. 3 Účinnost studovaných látek na buněčných liniích MV4-11, K-562, MCF-7, enzymech CDK4/cyklin D1, CDK2/cyklin E a receptoru FLT3/ITD (Kryštof, nepublikované výsledky).

Označení inhibitoru	Buněčné linie GI50 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			Enzymy IC50 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		
	MV4-11	K-562	MCF-7	CDK2/E	CDK4/D1	FLT3/ITD
6942	0,18	2,02	8,07	2,832	0,125	0,22
7225	0,19	4,53	6,55	0,255	0,047	0,03

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 2-merkaptoethanol 97% (Serva, Německo)
- akrylamid (VWR, USA)
- aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin: BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Coomassie-brilliant blue (Sigma–Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid: DMSO (PanReach AppliChem, Německo)
- dithiothreitol: DTT (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný: SDS (Lach-Ner, ČR)
- ECL substrát (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ethanol 96% (Lach-Ner, ČR)
- fenylmethylsulfonylfluorid: PMSF (Sigma–Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum: FS (Biowest, Francie)
- fluorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- glycin (Sigma–Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný (Penta, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, ČR)
- chlorid draselný (Lachema, ČR)
- chlorid sodný (Penta, ČR)
- kultivační médium RPMI 1640 (Biowest, Francie)
- kultivační médium DMEM (Sigma–Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma–Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA (Sigma–Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta, ČR)

- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- L-glutamin (Sigma–Aldrich, USA)
- leupeptin (Sigma–Aldrich, USA)
- n-butanol (Lach-Ner, ČR)
- N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin: TEMED (BioRad, USA)
- N',N'-metylenbisakrylamid (Sigma–Aldrich, Čína)
- nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma–Aldrich, USA)
- penicilin (Sigma–Aldrich, USA)
- peroxidisíran amonný (BioRad, USA)
- propidium jodid (Sigma–Aldrich, USA)
- proteinový detekční marker: Spectra Multicolor Broad PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- streptomycin (Sigma–Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS (Serva, Německo)
- tween-20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma–Aldrich, USA)

3.1.2 Roztoky

- blokovací pufr: 5% BSA, 0,1% Tween 20 v TBS
- blotovací pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin v dH₂O
- Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie-Brilliant blue, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v dH₂O
- ECL roztok: 1:1 luminol a H₂O₂
- elektroforetický roztok: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS v dH₂O
- lyzační pufr W: 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 7,4), 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 5 mmol·l⁻¹ EDTA, 2 mmol·l⁻¹ EGTA, 2 mmol·l⁻¹ NaF, 0,2% nonidet P 40 (pH 7,4) 1 mmol·l⁻¹ PMSF, 1 mmol·l⁻¹ DTT, 10 µg·ml⁻¹ leupeptin, 10 µg·ml⁻¹ aprotinin, 1 mmol·l⁻¹ vanadičnan sodný v dH₂O
- promývací roztok PBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol·l⁻¹ KCl, 10 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄, 2 mmol·l⁻¹ KHPO₄ (pH 7,4) v dH₂O
- Ponceau S: 0,2% Ponceau S, 1% kyselina octová v dH₂O

- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-merkaptoethanol, 0,05% bromfenolová modř v dH₂O
- TBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8) v dH₂O
- TBS-T 20: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS, 0,1% Tween 20 v dH₂O

3.1.3 Kultivační média a seznam použitých protilátek

- DMEM s 10% FS: DMEM, 10% fetální bovinní sérum, 0,1 mg·ml⁻¹ penicilin, 0,1 mg·ml⁻¹ streptomycin, 0,3 mg·ml⁻¹ L- glutamin, 3,7 g·l⁻¹ NaHCO₃, součást kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.
- RPMI 1640 s 10% FS: RPMI 1640, 10% fetální bovinní sérum, 0,1 mg·ml⁻¹ penicilin, 0,1 mg·ml⁻¹ streptomycin, 0,3 mg·ml⁻¹ L-glutamin, součást kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.

Tab. 4 Přehled použitých primárních protilátek (R = králíčí, M = myší, p = phosphorylated).

Protein	Molekulová hmotnost (kDa)	Protilátka	Typ	Výrobce a původ
FLT3	130, 160	anti-FLT3	R	Cell signaling technology, USA
pFLT3 Tyr589/591	130, 160	anti-pFLT3 Tyr589/591	R	Cell signaling technology, USA
pFLT3 Tyr842	130, 160	anti-pFLT3 Tyr842	R	Cell signaling technology, USA
pPDGFR Tyr849/857	190(110)	anti-pPDGFR Tyr849/857	R	Cell signaling technology, USA
pPDGFR Tyr1018	190(110)	anti-pPDGFR Tyr1018	R	Cell signaling technology, USA
PDGFRA	190(110)	anti-PDGFRA	R	Cell signaling technology, USA
p44/42 MAPK (Erk 1/2)	42, 44	anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	R	Cell signaling technology, USA
fosfo-p44/42 MAPK (Erk 1/2) Thr202/Tyr204	42, 44	anti-fosfo p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr202/Tyr204	R	Cell signaling technology, USA
pSTAT1 Tyr701	79,86	anti-pSTAT1 Tyr701	R	Cell signaling technology, USA
STAT1	79,86	anti-STAT1	R	Cell signaling technology, USA
pSTAT3 Tyr705	79,86	anti-pSTAT3 Tyr705	R	Cell signaling technology, USA
STAT3	79,86	anti-STAT3	R	Cell signaling technology, USA
STAT5	90	anti-STAT5	R	Cell signaling technology, USA
pSTAT5 Tyr694	90	anti-pSTAT5 Tyr694	R	Cell signaling technology, USA
RB	110	anti-RB	M	Cell signaling technology, USA
pRB Ser807/811	110	anti-pRB Ser807/811	R	Cell signaling technology, USA
α -tubulin	50	anti-tubulin	M	Sigma–Aldrich, Německo

Tab. 5 Přehled použitých sekundárních protilátek.

Protilátka	Typ	Výrobce a původ	Ředící poměr
anti-rabbit SWAR	swine anti-rabbit Ig polyklonální	Cell signaling technology, USA	1:1000
anti-mouse RAM	rabbit anti-mouse Ig polyklonální	Cell signaling technology, USA	1:1000

3.1.4 Testované inhibitory

- **6942, 7225:** látky byly syntetizovány doc. RNDr. Petrem Cankařem, Ph.D. (katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci). Před použitím byly látky uchovávány v lednici při 4 °C a rozpuštěny v DMSO, zásobní koncentrace 50 mmol·l⁻¹.
- Palbociclib: inhibitor CDK4 byl použit jako standard (zásobní roztok v DMSO 10 mmol·l⁻¹) (Axon MedChem, USA).
- Quizartinib: selektivní inhibitor FLT3/ITD, použitý jako standard (zásobní roztok v DMSO 25 mmol·l⁻¹) (Hycultec, Německo).
- NU6140: inhibitor CDK2 a aurora kinasy, použitý jako standard (zásobní roztok v DMSO 30 mmol·l⁻¹) (Santa Cruz, USA).

Zásobní roztoky testovaných látek byly uskladněny v lednici. Před použitím byly naředěny v kultivačním médiu tak, aby koncentrace v DMSO byla nižší než 0,1 %.

3.1.5 Buněčné kultury

Pro experimenty byly použity tyto nádorové buněčné linie:

- EOL-1 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Německo) nádorová linie odvozená od lidské chronické eosinofilní leukémie pozitivní na genovou fúzi FIP1L1-PDGFR α (Cools *et al.*, 2004). Linie byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% FS.
- K-562 (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nádorová linie odvozená od lidské chronické myeloidní leukémie pozitivní na genovou fúzi BCR-ABL1 (Naumann *et al.*, 2001). Linie byla kultivována v médiu DMEM s 10% FS.
- MV4-11 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Německo) nádorová suspenzní linie odvozená od lidské akutní monocytární leukémie s mutací

FLT3/ITD bez bodových mutací v TKD (Quentmeier *et al.*, 2003). Linie byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% FS.

- U-2932 (Roswell Park Cancer Institute, USA) nádorová linie odvozená od lidského difúzního velkého B-lymfomu. Linie je pozitivní na hypermutovaný gen *Vh4-39* a bodovou mutaci v tumor-supresorovém genu p53 (Amini *et al.*, 2002). Linie byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% FS.

3.1.6 Přístrojové vybavení

- CCD chemiluminiscenční kamera LAS-4000 (FujiFilm, Japonsko)
- centrifuga BR4i (Jouan, USA)
- centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Alpina, Polsko)
- magnetická míchačka s ohřevem Arex 6 (Velp Scientifics, Itálie)
- minicentrifuga 5702R (Eppendorf, Německo)
- odsávací pumpa FTA2i (Biosan, Lotyšsko)
- optický mikroskop TMS (Nikon, Japonsko)
- pipetor (BrandTech Scientific, USA)
- pH metr se skleněnou elektrodou (XS instruments, Itálie)
- průtokový cytometr BD FACS VERSE™ (Becton-Dickinson Company, USA)
- předvážky laboratorní (Kern, Německo)
- souprava pro vertikální elektroforézu: Mini Protean Tetra Cell (BioRad, USA)
- souprava pro western blotting: Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termostat blokový (Kleinfeld labortechnik, Německo)
- třepačka vířivá Vortex mixer (Velp Scientifics, Itálie)
- třepačka s kývavým pohybem MiniRocker MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- ultrazvuková vana (VWR, USA)
- vodní lázeň (GFL, Německo)
- zdroj pro elektroforézu a western blotting (E-C Apparatus Corporation, USA)

3.1.7 Programy

- BD FACSuite™ Software (Becton-Dickinson Company, USA)
- ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA)
- Multi 2.2 (Image reader Las-4000) (FujiFilm, Japonsko)

3.2 Metody

3.2.1 Práce s buněčnými kulturami

Buněčné kultury byly rozmrazeny a resuspendovány do příslušného kultivačního média. Následně byly vysazeny do většího objemu na Petriho misky (TPP, Švýcarsko) a kultivovány ve sterilním kultivačním médiu. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C s atmosférou 5% CO₂. Relativní vlhkost uvnitř inkubátoru byla udržována v hodnotách okolo 90%. Dále byly kultury pasážovány dle rychlosti růstu a potřeby 2-3x týdně. Pasážování buněk předcházela centrifugace 5 min za laboratorní teploty při 200 g. Po odstranění supernatantu byl buněčný pelet resuspendován v čerstvém médiu předem ohřátém na 37 °C. Kultivace a veškerá práce s buněčnými kulturami byla prováděna za sterilních podmínek a pasážování bylo prováděno v laminárním boxu. Zároveň vždy před pasážováním a nasazením na experiment byly buňky hodnoceny pod mikroskopem (morfologie, hustota kultury, viabilita, případná kontaminace).

3.2.2 Ovlivnění a sklizení buněk

Buněčná kultura byla před experimentem zředěna tak, aby se pro western blotting na Petriho misce (Ø 10 cm) nacházelo 5 milionů buněk v 8 ml média a pro analýzu průtokovou cytometrií se nacházelo na Petriho misce (Ø 6 cm) 0,5-1 milion buněk v 5 ml média. Naředěná kultura byla hodinu před ovlivněním ponechána k adaptaci v inkubátoru.

Ze zásobního roztoku studované látky nebo standardu byla připravena koncentrační řada. Naředěné látky byly přímo napipetovány k suspenzi buněčné kultury a ovlivněné buňky byly inkubovány v CO₂ inkubátoru požadovanou dobu. Dle použité metody detekce (western blotting, průtoková cytometrie) se lišil postup sklizení buněk pro analýzu.

Po ukončení inkubační doby byly ovlivněné buňky i s médiem pro analýzu průtokovou cytometrií sklizeny do předem vychlazených zkumavek na ledu. Následně byly zkumavky se vzorky stočeny v centrifuze 8 min, 1000 g, při 4 °C. Po stočení byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl rozsuspendován v 1 ml PBS. Vzorek byl opět stočen v centrifuze 8 min, 1000 g, při 4 °C, supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl rozsuspendován ve 100 µl PBS. Dalším krokem bylo zafixování buněk ve vychlazeném 70% ethanolu, který byl po kapkách přidáván do zkumavky na vířivé třepače. Vzorky byly uskladněny v mrazáku (-20 °C).

Pro western blotting byl obsah Petriho misek s buňkami sklizen do předem vychlazených zkumavek na ledu. Zkumavky se vzorky byly centrifugovány 8 min, 1000 g, při 4 °C, po stočení byl odstraněn supernatant, pelet rozsuspendován ve 2 ml PBS a opět centrifugován (první oplach). Pelet byl rozsuspendován v 1,5 ml PBS a opět centrifugován (druhý oplach). Poté byl buněčný pelet zbavený supernatantu uložen do hluboko mrazícího boxu (-80 °C).

3.2.3 SDS-PAGE a western blotting s imunodetekcí

Zamrazené buněčné pelety byly nechány volně rozmrznout na ledové tříšti. Podle množství peletu byl do mikrozkušavek přidán lyzační pufr s inhibitory proteas (leupeptin, aprotinin, PMSF), DTT a inhibitory fosfatas vanadičnan trisodný a NaF. Buněčný pelet byl následně po dobu 30 minut inkubován s lyzačním puffrem na ledu 3-4x resuspendován. Po ukončení inkubace byly následně vzorky stočeny v centrifuze 30 min, 14 000 g, při 4 °C. Po stočení byl vzniklý supernatant (lyzát) přenesen do nové mikrozkušavky a současně byl změřen jeho objem. Následně bylo provedeno stanovení celkových proteinů v lyzátu pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Do 1 ml Bradfordova činidla byl napipetován 1 µl lyzátu, vzorek byl promíchán na vortexové třepače. Po 10 minutách inkubace s činidlem byla měřena absorbance při 595 nm. Měření bylo provedeno v duplikátech. Dle naměřených hodnot byly lyzáty naředěny na stejnou koncentraci přidáním lyzačního puffru. Dále byl k lyzátům přidán vzorkový roztok SDS. Nakonec byly vzorky 5 minut zahřívány v termobloku při 95 °C, stočeny v minicentrifuze a vloženy do mrazáku (-20 °C).

Separace proteinů byla provedena diskontinuální SDS-PAGE elektroforézou. Elektroforéza byla prováděna v polyakrylamidovém gelu složeného z 5% zaostřovací a 10% dělicí části o tloušťce 1 mm. Vzorky byly roztaveny (2 minuty při 95 °C v termobloku), promíchány na vortexové třepače a následně byly nanášeny

do zaostřovacího gelu (v množství 30-50 µg proteinů na jamku). Do krajní jamky byl nanesen proteinový marker molekulových hmotností. Separace probíhala zpočátku při napětí 80 V, po vstupu vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po ukončení elektroforézy byly separované proteiny přeneseny metodou western blottingu z gelu na nitrocelulosovou membránu s velikostí pórů 0,45 µm. Přenos probíhal 3 hodiny za stálého chlazení a konstantního proudu 270 mA. Proteiny na membráně byly následně obarveny v roztoku Ponceau S. Po promytí v dH₂O byla membrána vysušena za laboratorní teploty.

Po vysušení byly membrány nařezány na vhodnou velikost podle markeru molekulových hmotností proteinů. Nařezané proužky byly odbarveny v TBS a jednu hodinu blokovány v 5% roztoku BSA v TBS-T na třepačce. Po hodině byly membrány vloženy do vlhké komůrky, kde na ně byly nanесeny primární protilátky (přehled Tab.4) naředěné v poměru 1:500 v roztoku BSA v TBS-T. Membrány byly s protilátkami inkubovány přes noc v lednici při 4 °C. Následující den se před nanášením sekundární protilátky membrány promývaly v TBS a TBS-T. Následovalo nanesení sekundární protilátky (přehled Tab.5) konjugované s křenovou peroxidasou, naředěné v roztoku BSA v TBS-T. Po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě byly membrány opět promývány v roztocích TBS a TBS-T.

Na promyté a usušené membrány byl nanесen chemiluminiscenční roztok ECL assay pro detekci proteinů. Po inkubaci, která trvala 5 minut, byl chemiluminiscenční signál detekován pomocí CCD kamery LAS4000 a zpracován v programu Multi 2.2.

3.2.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Zkumavky se zafixovanými buňkami byly rozmrazeny a jejich obsah byl promíchán na vortexu. Buňky byly převedeny do PBS (centrifugace 10 min, 1000 g, při 4 °C, odstranění supernatantu) a buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml PBS. Po dalším oplachu v PBS (centrifugace 10 min, 1000 g, při 4 °C) byly buňky resuspendovány ve filtrovaném PBS (PBS filtrováno přes nylonový filtr s póry 0,45 µm, BioRad, USA) a přeneseny do cytometrických zkumavek a na vířivé třepačce byl do každé zkumavky napipetován propidium jodid (PI) tak, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku činila 10 µg·ml⁻¹. Vzorky byly s PI inkubovány 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Po uplynutí inkubační doby byla provedena analýza buněčného cyklu na průtokovém cytometru BDFacs Verse. V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 10 tisíc buněk (excitace laserem o vlnové délce excitačního maxima PI = 535 nm, emise fluorescence

byla měřena při 617 nm). Výstupem analýzy průtokovou cytometrií byl histogram zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Detektory cytometru byly schopné rozlišit a kvantifikovat počet apoptických buněk na základě zvýšených hodnot bočního rozptylu. Kvantifikace cytometrických dat (procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu) byla provedena v programu Mod Fit LT 5.0.

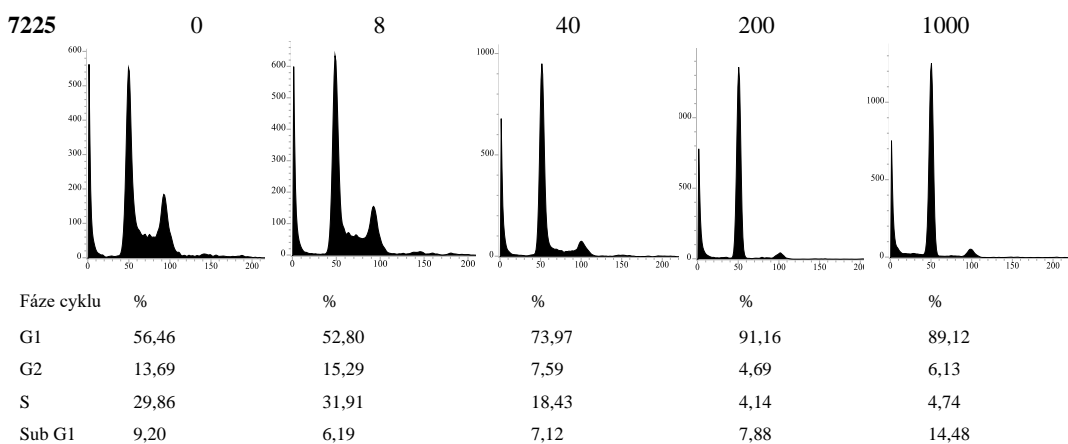
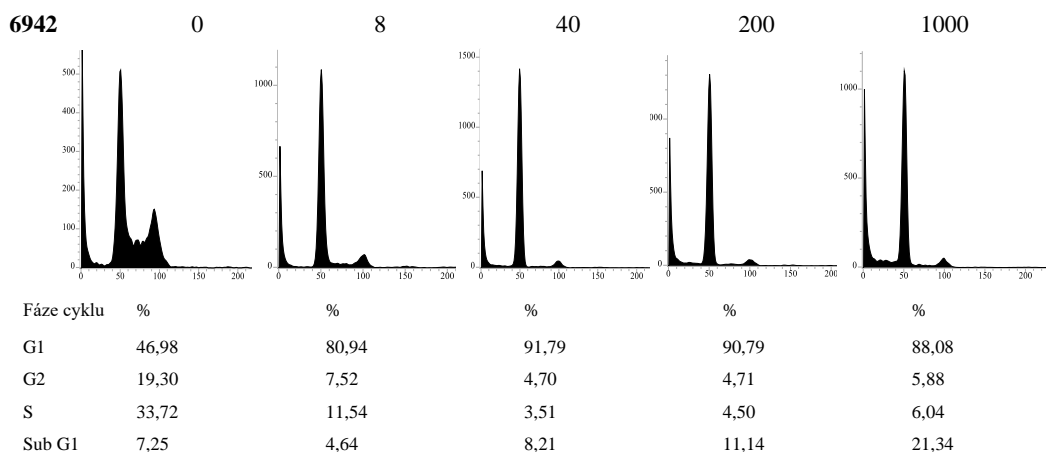
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza buněčného cyklu

Pro zjištění mechanismu buněčného účinku sloučenin **6942** a **7225** byla provedena analýza buněčného cyklu buněk MV4-11. Jedná se o linii odvozenou od AML s typickou onkogenní mutací FLT3/ITD. Buňky jsou závislé na aktivitě FLT3/ITD a velmi citlivé k inhibici tohoto receptoru (Gilliland a Griffin, 2002). Buňky MV4-11 byly ovlivněny sloučeninami **6942** a **7225** v koncentracích 8, 40, 200 a 1000 nmol·l⁻¹, po 24 hodinách byly sklizeny a analyzovány průtokovou cytometrií. Obě látky vykazovaly obdobný koncentračně závislý efekt (Obr. 7), přičemž k významnému nárůstu populace buněk v G1 fázi došlo po působení látky **6942** již při koncentraci 8 nmol·l⁻¹, po ovlivnění látkou **7225** byl výrazný G1 blok detekován až při koncentraci 40 nmol·l⁻¹. Při použití vyšších koncentrací látek byl účinek srovnatelný. Kromě nárůstu populace G1 a poklesu populací ve fázích S a G2M byl také patrný nárůst subdiploidní populace, která odpovídá buňkám apoptickým.

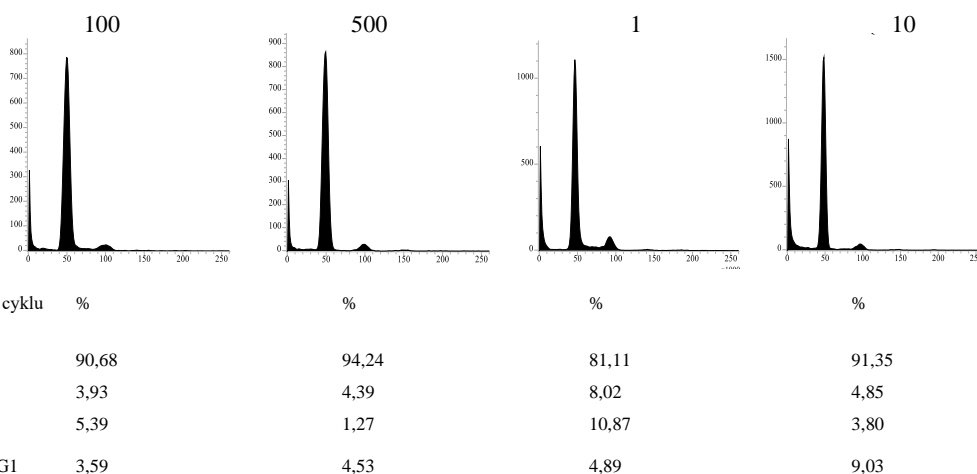
Jako standardy pro srovnání účinku látek byl použit quizartinib (inhibitor FLT3/ITD) a palbociclib (inhibitor CDK4 a 6) (Fry *et al.*, 2004; Kampa-Schnittenhelm *et al.*, 2013). Quizartinib byl použit v koncentracích 1 a 10 nmol·l⁻¹, palbociclib byl použit v koncentracích 100 a 500 nmol·l⁻¹. Oba standardy způsobily taktéž zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Podobný efekt standardů byl pozorován již dříve u palbociclibu, který způsobil zastavení cyklu buněčné linie MV4-11 v G1 při 400 nmol·l⁻¹ a quizartinibu, u kterého došlo v buňkách MV4-11 k silnému G1 bloku při použité koncentraci 1 a 10 nmol·l⁻¹ (Peschel *et al.*, 2017; Tadesse *et al.*, 2017).

Ačkoliv dle výsledků vykazoval quizartinib vyšší míru inhibice při nižších koncentracích než sloučeniny **6942** a **7225**, nedávno bylo v literatuře popsáno, že současná duální inhibice CDK4 a FLT3 je více efektivní a má potenciál pro redukci vzniku rezistentních mutací, které mohou vzniknout právě během léčby quizartinibem. Tato tvrzení byla dokázána na základě experimentů duální inhibice proliferace buněk MV4-11 a MOLM-13 za současného použití quizartinibu a palbociclibu (Li *et al.*, 2014). Dále byl proveden experiment, během něhož byly selektovány buňky s rezistentní mutací kultivované samostatně s quizartinibem a s quizartinibem společně s palbociclibem. Přítomnost určité koncentrace palbociclibu způsobila redukci vzniku rezistentních mutací (Li *et al.*, 2014).

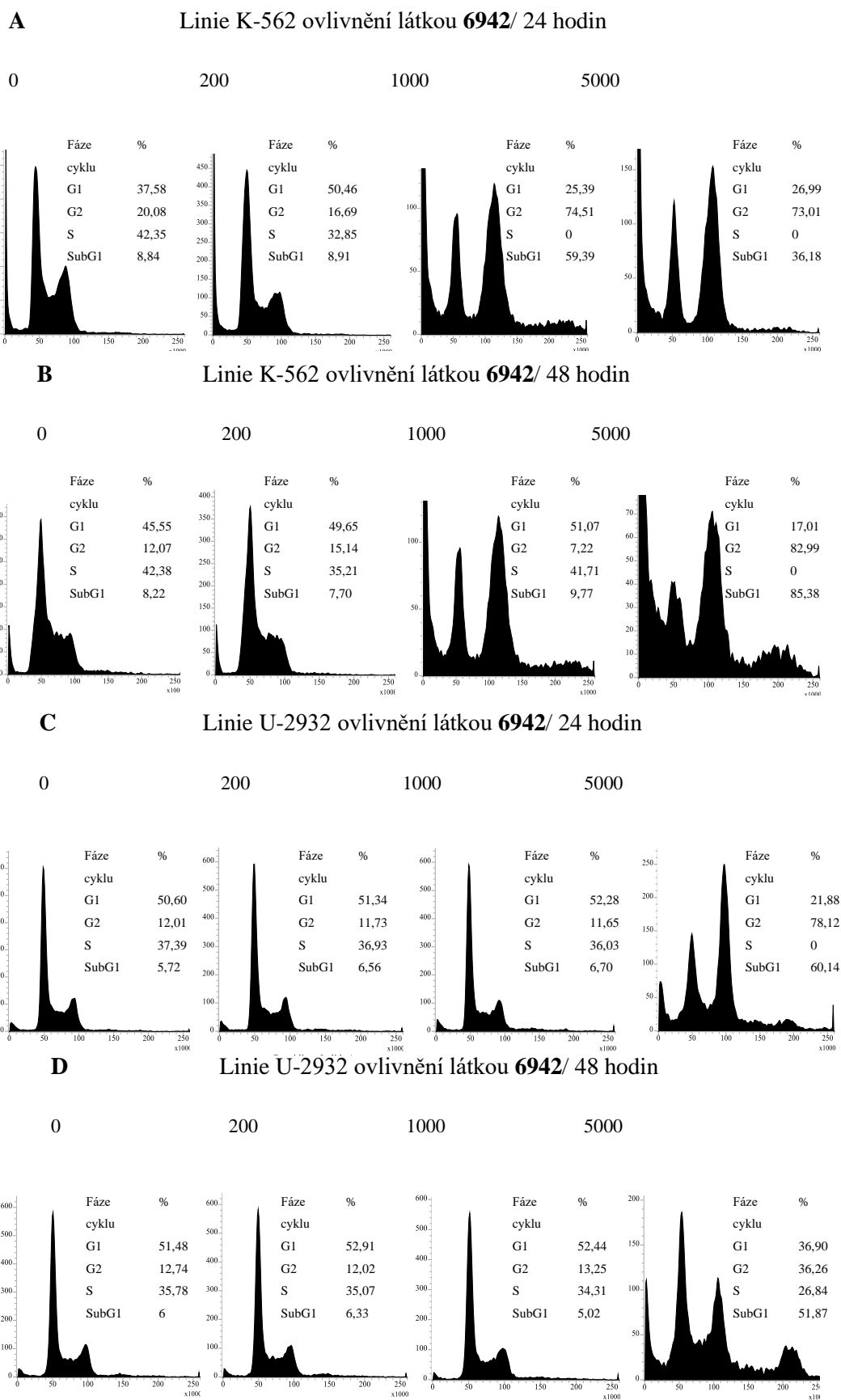


palbociclib

quizartinib



Obr. 7 Analýza buněčného cyklu linie MV4-11 ovlivněné látkami **6942**, **7225** po dobu 24 hodin. Palbociclib a quizartinib byly použity jako standardy. Použité koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 0 = kontrola s 0,1% DMSO, vodorovná osa x znázorňuje rozdělení buněk do fází buněčného cyklu podle naměřené hodnoty PI (<50 = subG1, 50 = G1, 50-100 = S, 100 = G2, násobky 100 = polyploidie), vertikální osa y udává četnost distribuce buněk mezi jednotlivé populace).



Obr. 8 Analýza buněčného cyklu linií K-562 (8A, B) a U-2932 (8C, D) ovlivněné látkou **6942** po dobu 24 hodin (8A,C) a 48 hodin (8B,D). Použité koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 0 = kontrola s 0,1% DMSO.

Vzhledem ke skutečnosti, že sloučeniny **6942** a **7225** inhibují kromě FLT3/ITD také CDK4, nebylo možné z provedeného experimentu určit, který z molekulárních mechanismů v buňkách převažuje. Pro následující experimenty s dalšími nádorovými liniemi byla vybrána látka **6942**, která měla v linii MV4-11 vyšší účinnost.

Analýza vlivu látky **6942** v koncentracích 200, 1000 a 5000 nmol·l⁻¹ byla provedena také na nádorových liniích K-562 a U-2932 (Obr. 8A-D). Jedná se o linie nezávislé na signalizaci FLT3. Dle očekávání nebyl v těchto liniích nárůst populace G1 buněk pozorován. Použité koncentrace 1000 a 5000 nmol·l⁻¹ způsobily významný pokles buněk v S fázi a současně s rostoucí koncentrací narůstal počet apoptických buněk. Nicméně překvapivým zjištěním byl fakt, že na rostoucí koncentraci látky **6942** buňky reagovaly zastavením buněčného cyklu v G2/M fázi. To naznačuje možnost inhibice jiné proteinkinasy nebo zcela jiného molekulárního cíle. Nelze ani vyloučit zasažení kontrolních a opravných mechanismů při replikaci DNA a během mitózy, a to z důvodu výskytu tetraploidní populace, která narůstala v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru.

Pozorovaný nárůst G2/M populace může být následkem inhibice CDK2 a CDK1. Na buňkách K-562 byl podobný efekt pozorován po 48 hodinách ovlivnění methylprodioscinem (Liu *et al.*, 2005). Methyl prodioscin způsobil zastavení buněk v G2/M a současně byla detekována polyploidní populace. Po provedení dalších analýz na buňkách K-562 bylo zjištěno, že dochází ke snížení úrovně cyklinu B1, zatímco úroveň CDK1 zůstala konstantní (Liu *et al.*, 2005). CDK1 aktivovaná cyklinem B1 fosforyluje proteiny, které se účastní napojování chromozomu na vřetenko. V případě její inaktivace či absence tedy může docházet k chybám během mitózy, které mohou dát vznik polyploidní populaci buněk (Berthet *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že pokles exprese CDK1 může být způsoben represí transkripčního faktoru E2F vlivem současné inhibice kinas CDK1 a CDK2 (Liu *et al.*, 2005).

Po 48 hodinách působení látka **6942** měnila ještě významněji jednotlivé fáze buněčného cyklu, a to u buněčné linie K-562 (Obr. 8B). U koncentrací 1000 a 5000 nmol·l⁻¹ byl detekován nárůst tetraploidní populace v závislosti na zvyšující se koncentraci látky. Buňky ovlivněné koncentrací 5000 nmol·l⁻¹ vykazovaly vysokou míru apoptózy a zároveň nebyla ve vzorku detekována žádná populace buněk v S fázi.

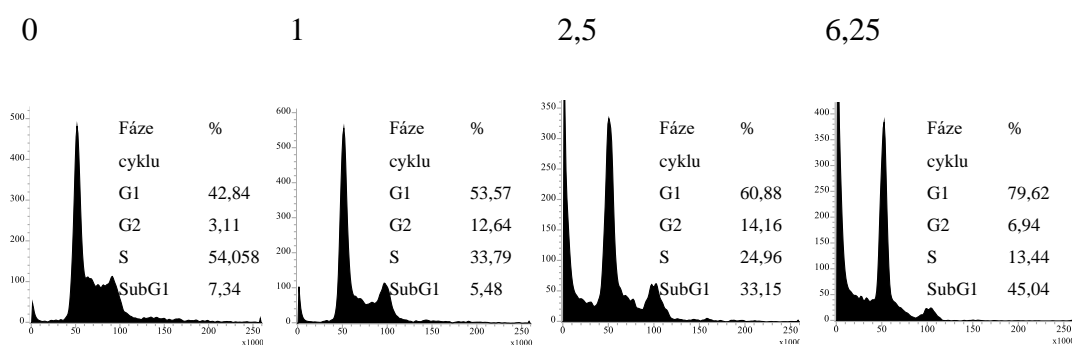
Vliv látky **6942** po 24 hodinách inkubace na buněčnou linii U-2932 je demonstrován na obrázku 8C. Při použití nižších koncentrací nebyl detekován žádný efekt na buňkách. Teprve koncentrace 5000 nmol·l⁻¹ způsobila zastavení buněčného cyklu v G2/M,

stejně jako u linie K-562 (Obr. 8A, 8B). Ačkoliv byl na buněčné linii K-562 detekován G2/M blok již při $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci, reakce buněk U-2932 byla v porovnání s K-562 více intenzivní. Již po 24 hodinách bylo detekováno mnohem vyšší procento buněk přecházejících do apoptózy a zároveň byl prokázán u této linie větší výskyt tetraploidní populace buněk.

Inkubace buněk U-2932 s látkou **6942** po dobu 48 hodin nezpůsobila žádný efekt na buňkách až do koncentrace $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 8D). Nástup účinku látky se projevil až při koncentraci $5000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, obdobně jako u 24 hodin ovlivnění. Při této koncentraci došlo ke zvýšené apoptóze a razantnímu nárůstu tetraploidní populace buněk.

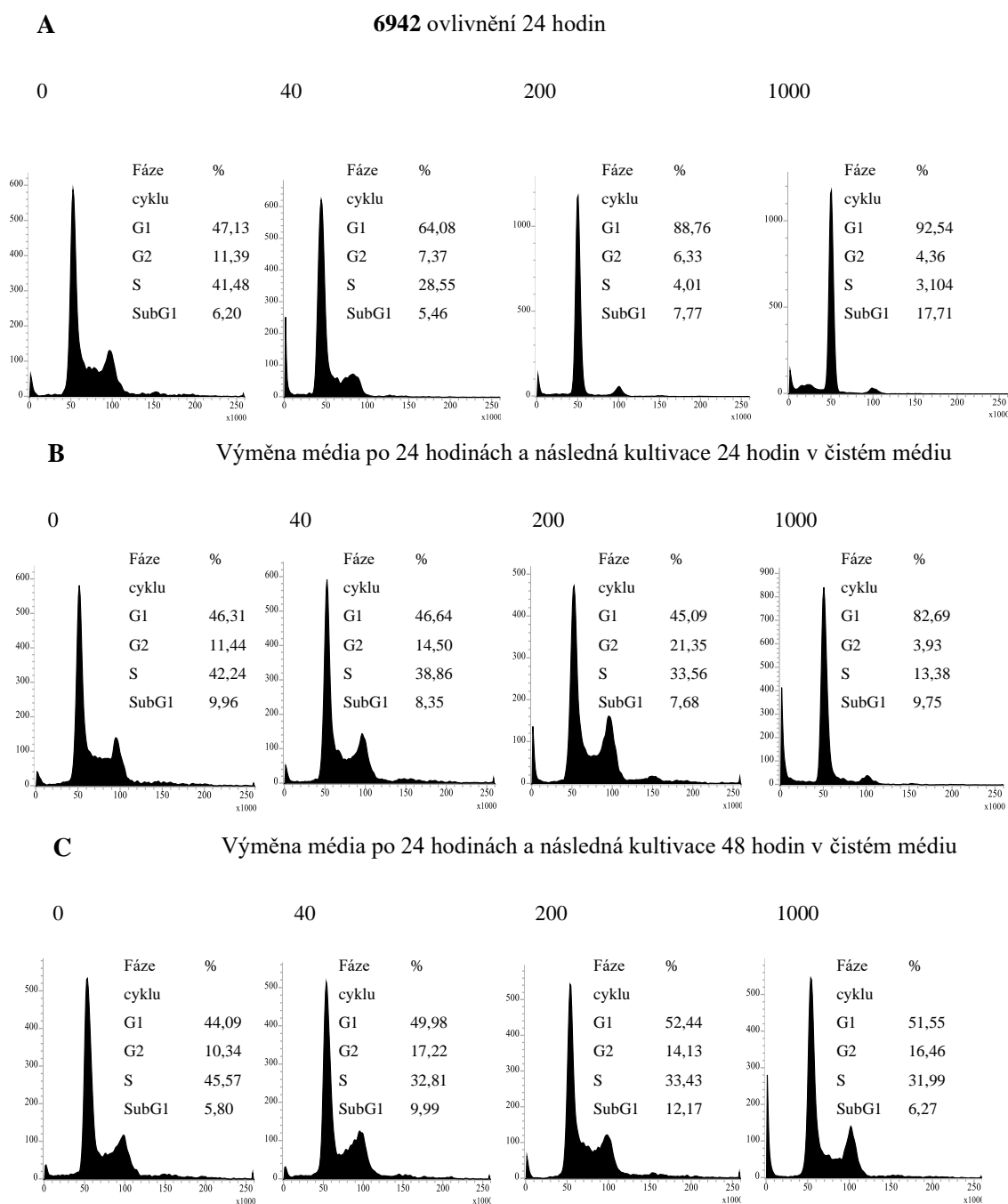
Vzhledem k pozorovanému nárůstu G2/M a tetraploidní populace v kulturách ovlivněných látkou **6942** byly provedeny další kontrolní experimenty. Jako další srovnávací standardní sloučenina byl zvolen NU6140, u něhož byla zjištěna inhibiční aktivita CDK2 a aurory B (Jorda *et al.*, 2018). CDK2 aktivovaná cyklinem E aktivuje transkripční faktor E2F, čímž iniciuje replikaci DNA a tím zahájení S fáze (Neganova *et al.*, 2011). Důležitou funkcí aktivované CDK2 je reakce na poškození DNA. V případě poškození kinasa brání vstupu buňky do mitosy a iniciuje aktivaci opravných mechanismů (Neganova *et al.*, 2011). V případě inaktivace kinasy dochází k poruchám opravných mechanismů a inhibicí aurory B, která reguluje připojení chromozomů na dělicí vřeténko, může dojít ke vzniku tetraploidních populací (Terret *et al.*, 2003).

Dle teoretických poznatků se tedy předpokládalo, že pokud by měla látka **6942** zvýšenou afinitu k CDK2, výskyt tetraploidní populace by byl detekován i u linie MV4-11. Na Obr. 9 je demonstrována kontrolní analýza buněčného cyklu po ovlivnění látkou NU6140, u níž bylo již dříve potvrzeno, že způsobuje vznik tetraploidních populací (Jorda *et al.*, 2018). Pozorováno bylo ale pouze navození G1 bloku a zvýšená apoptóza buněk při koncentraci $6,25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento výsledek naznačuje, že G2/M blok



Obr. 9 Analýza buněčného cyklu linie MV4-11 ovlivněné látkou NU6140 po dobu 48 hodin. Použité koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. 0 = kontrola s 0,1% DMSO.

Významným faktorem, který určuje terapeutickou účinnost inhibitorů, je také doba trvání jeho účinku po podání. Vzhledem k metabolizaci a vylučování není koncentrace inhibitoru v těle pacienta konstantní, ale postupně klesá. Tento proces lze jednoduše modelovat například krátkodobým ovlivněním buněčné kultury, jejím převedením do kultivačního média bez inhibitoru a sledováním kinetiky odezvy. Podobný model byl využit například u jiného inhibitoru FLT3/ITD, jehož účinek přetrvával v buňkách



Obr. 11 Analýza buněčného cyklu linie MV4-11 ovlivněné látkou **6942** po 24hodinové inkubaci (A) bylo odstraněno kultivační médium s inhibitorem a bylo nahrazeno čistým kultivačním médiem, buňky byly dále kultivovány po dobu 24 (B) a 48 (C) hodin. Použité koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 0 = kontrola s 0,1% DMSO.

MV4- 11 i v myším xenograftu až 48 hodin (Gucký *et al.*, 2018). U linie MV4-11 byl proto také sledován časový efekt látky **6942** po výměně média (*wash-out*) (Obr. 11).

Buněčná linie byla nejprve inkubována s látkou **6942** po dobu 24 hodin s použitím koncentrací 40, 200 a 1000 nmol·l⁻¹ (Obr. 11A). Zastavení buněčného cyklu v G1 bylo detekováno při 200 nmol·l⁻¹, což odpovídá předchozímu pozorování (viz Obr. 7). Po inkubaci buněk s látkou **6942** bylo po 24 hodinách odstraněno médium a dále byly ovlivněné buňky kultivovány následujících 24 a 48 hodin v čistém médiu. Po 24 hodinách po výměně média se inhibiční efekt udržel na buňkách pouze u koncentrace 1000 nmol·l⁻¹ (Obr. 11B). Po 48 hodinách po výměně došlo k úplnému potlačení efektu inhibitoru a rozložení fází buněčného cyklu odpovídalo kontrolní neovlivněné populaci (Obr. 11C). Výsledek značí, že látka podléhá relativně rychlé metabolizaci v prostředí buněk, proto přetrvávají účinky látek pouze při nejvyšší použité koncentraci.

S podobným problémem se však lze setkat i u některých komerčně dostupných inhibitorů. Například inhibitor I. generace sorafenib také nemá dlouhou dobu účinnosti, a proto musí být během léčby dávkován 2x denně (Daver *et al.*, 2019). Dalším příkladem je FLT3 selektivní inhibitor crenolanib, který je na jednu stranu vysoce účinný a je schopen inhibovat více různých mutantních forem FLT3 (včetně FLT3/ITD a bodových mutací udílejících rezistenci), na druhou stranu je jeho poločas v těle pacienta stanoven na 6-8 hodin, a proto musí být dávkován dokonce 3x denně během léčby (Daver *et al.*, 2019).

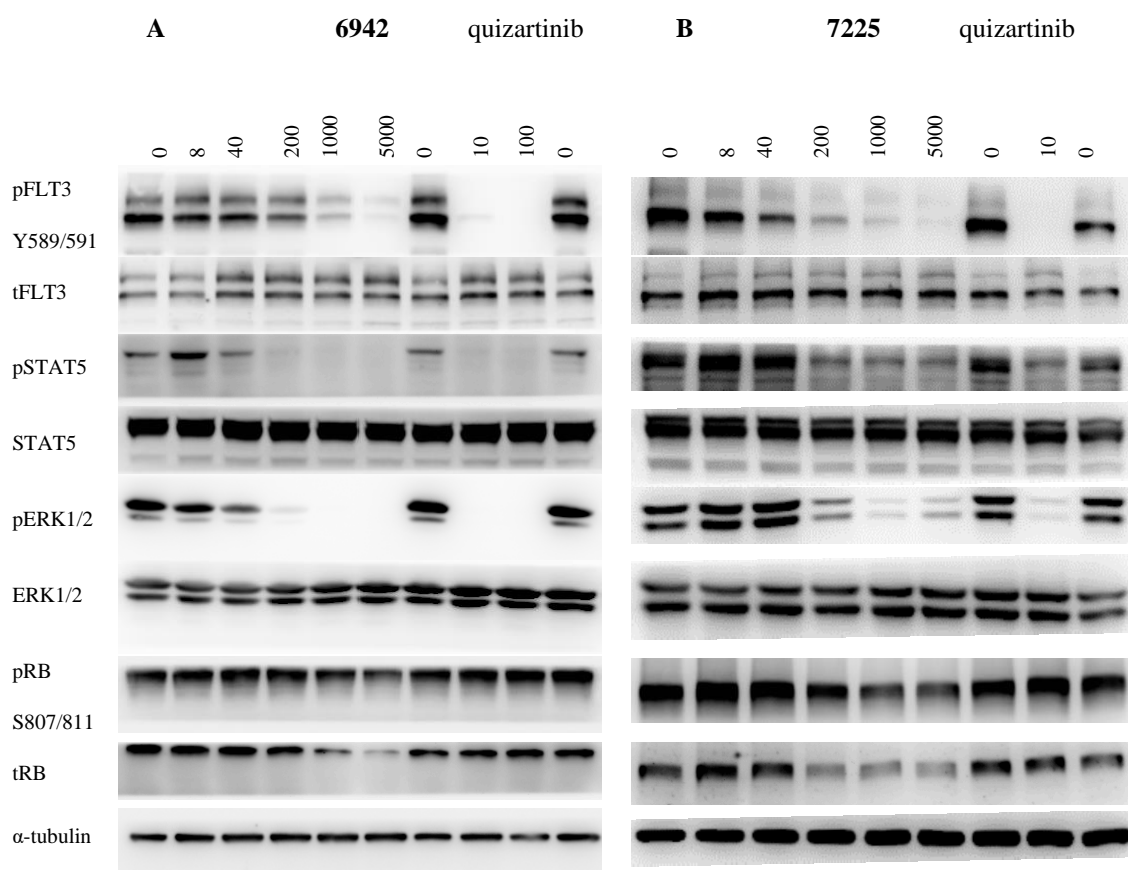
4.2 Proteinová analýza

Pro určení molekulárního mechanismu účinku látek na linii MV4-11 a ověření selektivity látek **6942** a **7225** k receptoru FLT3 byla provedena analýza proteinů metodou western blotting. Buňky byly ovlivněny různými koncentracemi látek po dobu 1 hodiny a poté v nich byla analyzována fosforylace proteinů signálních drah FLT3 a CDK4. Látka **6942** způsobila významný pokles fosforylace proteinu FLT3 v pozicích Y589/591 při 1000 nmol·l⁻¹, STAT5 při koncentraci 40 nmol·l⁻¹, ERK při 200 nmol·l⁻¹ a RB při 5000 nmol·l⁻¹. Dále byl detekován pokles celkového proteinu RB při koncentraci 1000 nmol·l⁻¹ (Obr. 12A). Látka **7225** způsobila pokles fosforylace proteinu FLT3 v pozicích Y589/591 při 200 nmol·l⁻¹, STAT5 při koncentraci 200 nmol·l⁻¹, ERK při 200 nmol·l⁻¹ a RB při 1000 nmol·l⁻¹. Dále byl detekován pokles proteinu RB při koncentraci 200 nmol·l⁻¹ (Obr. 12B). Výsledky naznačují, že látky vykazují podobný efekt na signalizaci buněk, ale v navození inhibice fosforylace se odlišují účinnou koncentrací. Zároveň z výsledků analýzy vyplývá, že látka **7225** vykazuje vyšší afinitu k CDK4, protože k inhibici proteinu RB jeho fosforylované a celkové formy došlo při nižších koncentracích (Obr. 12B) v porovnání s účinkem látky **6942** (Obr. 12A).

Současně byl efekt inhibice FLT3 obou látek srovnatelný s efektem quizartinibu, který taktéž způsobil pokles fosforylace FLT3, STAT5 a ERK s rozdílem potřeby nižší koncentrace quizartinibu (10 a 100 nmol·l⁻¹) pro navození inhibičního efektu. Podobný účinek quizartinibu v buněčných liniích AML MV4-11 a MOLM-13 byl popsán také dříve v publikované práci, v níž byly buňky s mutací v genu *Flt3* podrobeny 2 hodinám ovlivnění quizartinibem a následné proteinové analýze (Gunawardane *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že k poklesu fosforylace proteinů FLT3, STAT5 a ERK došlo již při 1 nmol·l⁻¹ koncentraci (Gunawardane *et al.*, 2013).

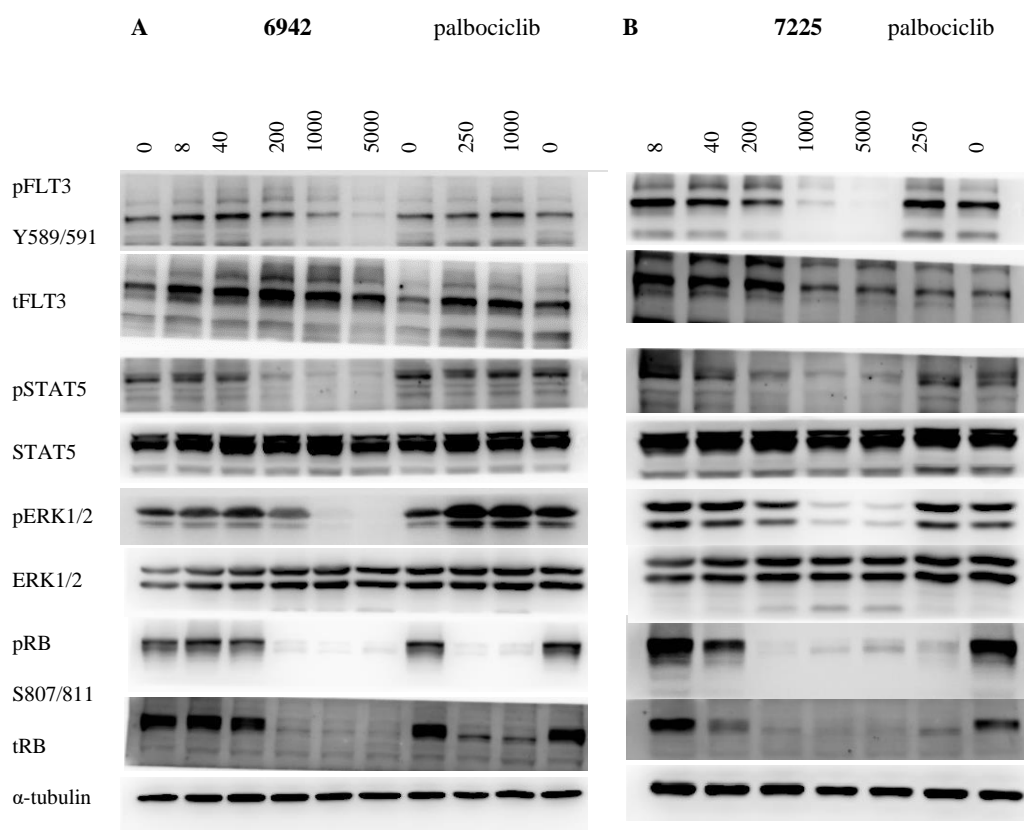
Podobné účinky jako látky **6942** a **7225** má také duální inhibitor FLT3/ITD a CDK4 AMG925 (FLX925), který navíc inhibuje některé rezistentní mutanty (Li *et al.*, 2014). AMG925 (FLX925) způsobil v buňkách MOLM-13 po 1 hodině ovlivnění při koncentraci 10 nmol·l⁻¹ pokles fosforylace proteinů FLT3 a STAT5 (Keegan *et al.*, 2014). Taktéž docházelo k poklesu fosforylace RB, ale v porovnání s látkami **6942** a **7225** nedošlo k poklesu celkového RB (Li *et al.*, 2014). Ačkoliv je látka AMG925 (FLX925) tedy efektivnější a na buňky působí při nižších koncentracích, je nutné dodat, že pravděpodobně látky **6942** a **7225** atakují i jiné molekulární cíle a mechanismus účinku se tak může lišit.

Další konkurenční látky jsou nově syntetizované deriváty pteridin-7(8H)-onu, u nichž byl prokázán inhibiční efekt na FLT3/ITD a omezeným efektem na FLT3 mutace udílející rezistenci, jako například ITD/D835V a EGFR (Sun *et al.*, 2019). Analýza vlivu látek na buněčný cyklus linie MV4-11 ukázala úplné zastavení v G1 fázi při použité koncentraci $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a proteinová analýza ukazovala po dvou hodinách ovlivnění buněk MV4-11 pokles fosforylace FLT3, STAT5 a ERK při $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Sun *et al.*, 2019). V roce 2019 byl publikován článek o novém inhibitoru kinas FLT3, CDK4 a PIM-3, který vykazuje inhibiční aktivitu proti buňkám s FLT3/ITD a ITD/D835Y mutacemi. IC50 inhibitoru ETH-155008 na buněčných liniích MV4-11 a MOLM-13 dosahuje hodnot $4,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $12 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Liu *et al.*, 2019), což je nižší koncentrace v porovnání s inhibitory **6942** a **7225** (viz Tab. 3).



Obr. 12 Vliv látek **6942** (A) a **7225** (B) na aktivitu proteinů souvisejících s FLT3 a CDK4 po 1 hodině ovlivnění v buněčné linii MV4-11. Látky byly použity v koncentracích 8, 40, 200, 1000, 5000 $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, jako standard byl použit quizartinib v koncentracích 10 a 100 $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 0 = kontrola s 0,1% DMSO, detekce tubulinu sloužila jako kontrola nanášení vzorků.

Hladiny proteinů v linii MV4-11 byly sledovány také 24 hodin po ovlivnění látkami **6942** a **7225**. Na obrázku 13A je zaznamenán pokles fosforylace FLT3 v pozicích Y589/591 při 1000 nmol·l⁻¹ látky **6942**, pokles fosforylace STAT5 nastal při koncentraci 200 nmol·l⁻¹, ERK při 200 nmol·l⁻¹ a RB při 200 nmol·l⁻¹. Dále byl detekován pokles celkového RB také při koncentraci 200 nmol·l⁻¹, zde tedy došlo k posunu inhibiční aktivity pro RB k nižším koncentracím (Obr. 13A) oproti ovlivnění 1 hodinu (Obr. 12A). Na obrázku 13B lze pozorovat změny fosforylace po ovlivnění látkou **7225**. U proteinu FLT3 došlo k poklesu v reziduu Y589/591 při 1000 nmol·l⁻¹. Pokles fosforylace STAT5 byl detekován při koncentraci 200 nmol·l⁻¹, ERK při 200 nmol·l⁻¹ a RB při 200 nmol·l⁻¹. Dle teoretických předpokladů palbociclib použitý jako standard způsobil pokles fosforylace pouze proteinu RB. Podobný efekt palbociclib vykazoval na buňkách MV4-11 ve starší studii při koncentraci 1 μmol·l⁻¹ (Tadesse *et al.*, 2017). Dále byl detekován pokles hladiny RB při 40 nmol·l⁻¹ (Obr. 13B). Jedná se o překvapivý a prozatím nevysvětlený účinek látek na buněčnou linii MV4-11, který se projevil po 1 i 24 hodinách ovlivnění.

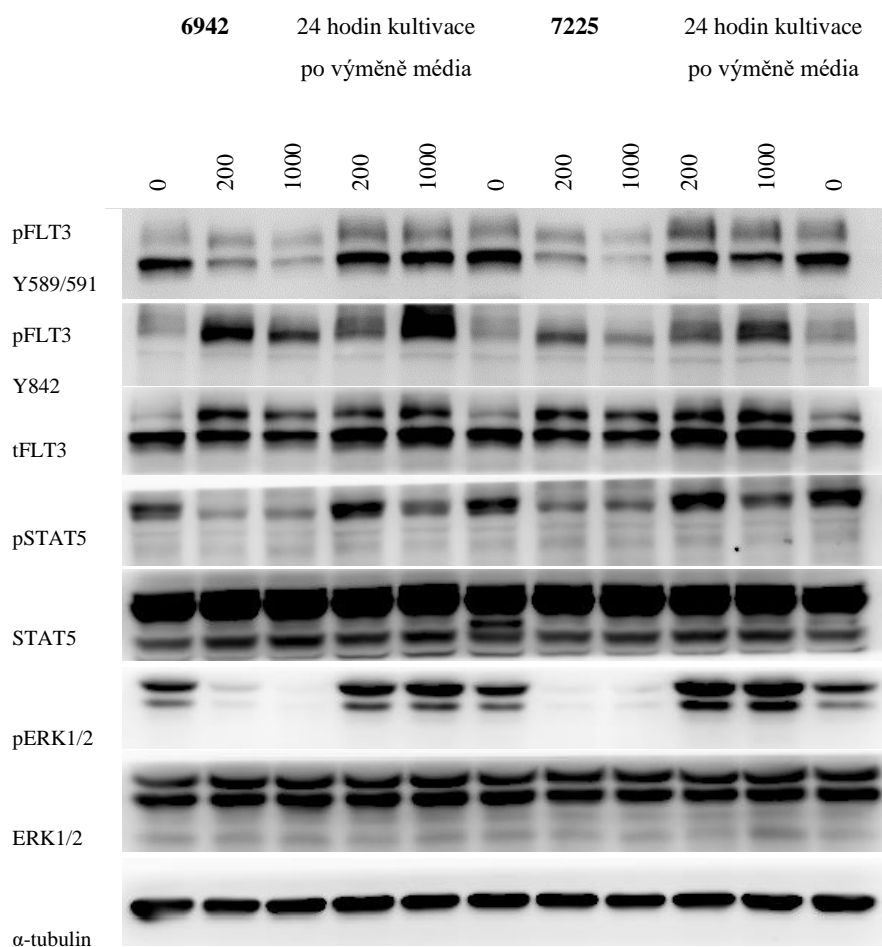


Obr. 13 Vliv látek **6942** (A) a **7225** (B) na aktivitu proteinů signálních drah FLT3 a CDK4 po 24 hodinách ovlivnění v buněčné linii MV4-11. Látky byly použity v koncentracích 8, 40, 200, 1000, 5000 nmol·l⁻¹, jako standard byl použit palbociclib v koncentracích 250 a 1000 nmol·l⁻¹, 0 = kontrola s 0,1% DMSO, detekce tubulinu sloužila jako kontrola nanášení vzorků.

Na základě výsledků lze pozorovat určitou závislost poklesu hladiny proteinu RB na rostoucí koncentraci látek **6942** a **7225** (viz Obr. 12 a 13). Vysvětlení může souviset s fragmentací proteinu RB, která byla popsána v buňkách HL-60 po působení etoposidu a cytosin arabinosidu (Chen *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 2014). V buňkách bylo detekováno odštěpení fragmentu o velikosti 5 kDa z C-terminálního konce proteinu RB (Chen *et al.*, 1997). Štěpení bylo popsáno jako pravděpodobně spojené s aktivací cysteinových proteas v buňce na začátku apoptózy. Odštěpení fragmentu vedlo ke změně struktury a vzniku zkrácené formy proteinu RB se zvýšenou afinitou k transkripčnímu faktoru E2F (Chen *et al.*, 1997). Pokles celkové hladiny RB s narůstající koncentrací inhibitorů **6942** a **7225** by tedy mohl souviset u vyšších koncentrací se zvýšenou apoptózou buněk po ovlivnění oběma látkami, která byla detekována analýzou průtokové cytometrie (viz Obr. 7). Pokles proteinu RB nebyl detekován po ovlivnění quizartinibem (viz Obr. 12), ale neméně zajímavý je fakt, že slabý pokles proteinu nastal po 24 hodinách ovlivnění palbociclbem (viz Obr. 13).

U látek **6942** a **7225** bylo následně pozorováno udržení efektu na inhibici fosforylace proteinů buněčné linie MV4-11 po odstranění média s inhibitorem (*wash out*). Po 1 hodině ovlivnění koncentracemi 200 a 1000 nmol·l⁻¹ bylo buňkám vyměněno médium s inhibitorem za čerstvé a následně byly v čistém médiu kultivovány po dobu 24 hodin. Po sklizení byla detekována úplná ztráta inhibičního efektu na fosforylaci FLT3 a ERK u obou testovaných látek při všech použitých koncentracích (Obr. 14). U proteinu STAT5 byla pozorována úplná ztráta inhibičního efektu při koncentraci 200 nmol·l⁻¹ a při koncentraci 1000 nmol·l⁻¹ došlo pouze k částečnému udržení inhibice fosforylace.

Analýza proteinů byla provedena na buněčné linii EOL-1 s mutací PDGFR po ovlivnění látkou **6942** (Obr. 15). Vzhledem k podobnosti receptorů PDGFR a FLT3 a výsledkům analýzy buněčného cyklu u linie EOL-1 (Obr. 10) byl předpokládán inhibiční účinek na PDGFR. Podobně tomu bylo při analýze FLT3/ITD inhibitoru jiného inhibitoru FLT3 (Gucký *et al.*, 2018), jehož účinek byl pozorován také v linii EOL-1 (Řezníčková *et al.*, 2019). EOL-1 je buněčná linie pozitivní na fúzní gen FIP1L1-PDGFR, který je nezbytný pro stimulaci proliferace buněk (Cools *et al.*, 2004). Onkogenní aktivace PDGFR zahrnuje fosforylaci proteinů rodiny STAT přes JAK2, ERK a PI3K. Zároveň dle dosud dostupných informací je STAT5 první asociovaný protein této skupiny s PDGFR a následkem aktivace STAT5 je fosforylován STAT3 (Ishihara *et al.*, 2008).



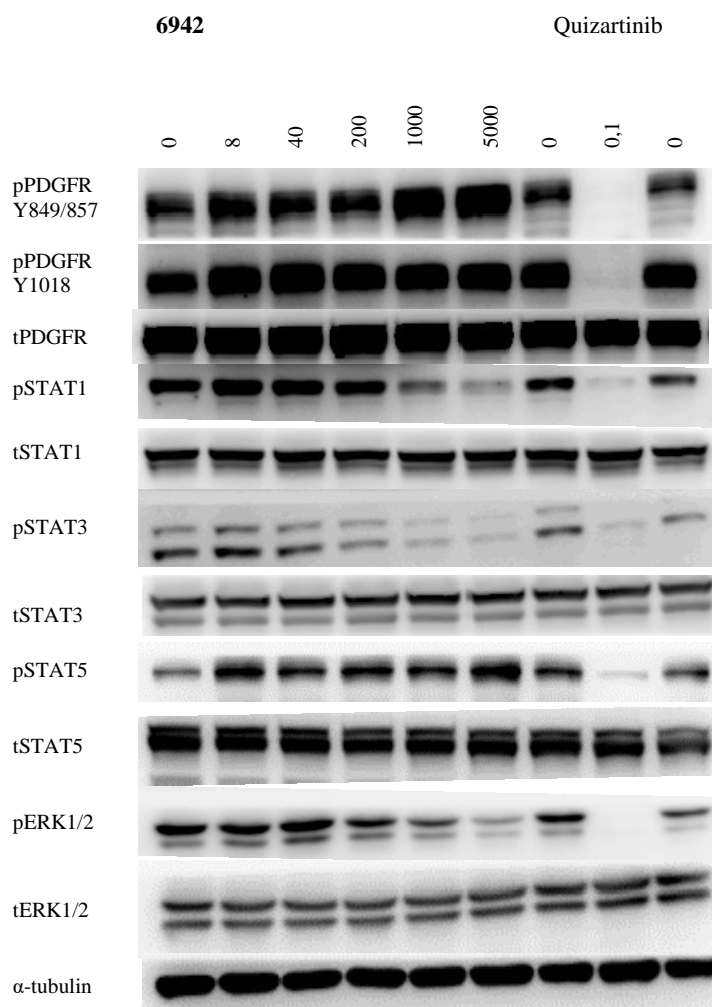
Obr. 14 Vliv látek **6942** a **7225** na aktivitu proteinů signální dráhy FLT3 po 1 hodině ovlivnění buněčné linie MV4-11. Pro sledování udržení efektu bylo po 1 hodině médium a inhibítor odstraněno a buňky byly před analýzou kultivovány v čistém médiu následujících 24 hodin. Látky byly použity v koncentracích 200, 1000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 0 = kontrola s 0,1% DMSO, detekce tubulinu sloužila jako kontrola nanášení vzorků.

Zatímco však selektivní inhibitor FLT3 quizartinib způsobil v 0,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci pokles fosforylace proteinů PDGFR, STAT1, STAT3, STAT5 a ERK, předpokládaný inhibiční účinek látky **6942** nebyl prokázán. Látka **6942** způsobila pouze pokles fosforylace proteinu STAT1 při vysoké koncentraci 1000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, STAT3 při koncentraci 200 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pokles ERK byl detekován při 1000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dle výsledků analýzy však nedošlo k inhibici aktivity PDGFR ani proteinu STAT5 (Obr. 15). Mechanismus účinku na buňkách EOL-1 spojený s G1 blokem a apoptózu buněk (viz Obr. 10) tedy prozatím zůstává neznámý.

Podobný účinek na této buněčné linii byl dříve popsán po působení látkou AG490, která byla vyvinuta jako inhibitor JAK2 (Li *et al.*, 2012). Po provedení proteinové analýzy bylo zjištěno, že silná inhibice JAK2 vysokou dávkou inhibitoru o koncentraci

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ indukovala pouze pokles fosforylace STAT3 a PI3K/AKT, ne však proteinu STAT5 (Li *et al.*, 2012).

Tento výsledek naznačuje, že STAT5 je v tomto případě primárně aktivován prostřednictvím jiné, dosud neidentifikované, kinasy nezávisle na JAK2 (Li *et al.*, 2012), což koresponduje s výsledkem analýzy buněčného cyklu (viz Obr. 10) a proteinové analýzy (viz Obr. 15) linie EOL-1 této práce.



Obr. 15 Vliv látky **6942** na aktivitu proteinů signální dráhy PDGFR po 1 hodině ovlivnění buněčné linie EOL-1. Látka byla použita v koncentracích 8, 40, 200, 1000, 5000 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jako standard byl použit quizartinib v koncentraci 0,1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 0 = kontrola s 0,1% DMSO. Detekce tubulinu sloužila jako kontrola nanášení vzorků.

5 ZÁVĚR

Pomocí metod western blottingu a průtokové cytometrie byly charakterizovány některé biologické účinky látek **6942** a **7225** vyvinutých jako inhibitory onkogenních kinas FLT3/ITD a CDK4. Na základě výsledků proteinové analýzy bylo možné potvrdit, že obě látky skutečně v buňkách vyvolávají výraznou odezvu odpovídající inhibici FLT3/ITD a CDK4. Zároveň bylo potvrzeno, že látka **7225** má v buňkách vyšší inhibiční aktivitu vůči CDK4 než látka **6942**. Ve srovnání s quizartinibem se látky **6942** a **7225** jeví jako méně účinné. Oproti quizartinibu ale může být výhodou látek **6942** a **7225** schopnost duální inhibice CDK4 a FLT3, která má potenciál omezovat vznik rezistentních mutací (Li *et al.*, 2014). Stejnou výhodu mají konkurenční inhibitory AMG925 (FLX925) a ETH-155008 (Keegan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Vliv na buňky nesoucí rezistentní mutace však doposud u studovaných látek nebyl zjišťován.

Experimenty ukázaly také pozoruhodný vliv látky **6942** na buněčnou linii EOL-1. Přestože cytometrická analýza prokázala vysokou míru apoptózy a silný G1 blok, nebyla pozorována defosforylace receptoru PDGFR a STAT5, přestože jiné podřízené signální molekuly (STAT1, STAT3 a ERK) defosforylovány byly. Nelze proto vyloučit existenci dalšího molekulárního cíle látek **6942** a **7225**, který by mohl být objasněn provedením série dalších experimentů zaměřených na zkoumání dalších mechanismů účinku obou látek.

Překvapivý účinek měla látka **6942** také na buněčný cyklus jiných nádorových linií. Látka prozatím neznámým způsobem indukovala G2/M blok v liniích K-562 a U-2932. Současně byl po ovlivnění 24 a 48 hodin u těchto linií detekován výskyt polyploidních buněčných populací. Také toto pozorování může svědčit o interakci studovaných látek s prozatím nezjištěnými proteiny a buněčnými procesy, které je třeba v následujících experimentech detailněji studovat.

6 LITERATURA

- Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A., Care R.S., Reilly J.T. (2001): Identification of novel FLT3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* **113**, 983-988.
- Albers C., Verbeek M., Leischner H., Yu C., Illert A.L., Peschel C, von Bubnoff N., Duyster J. (2013): The secondary FLT3-ITD F691L mutation induces resistance to AC220 in FLT3-ITD⁺ AML but retains in vitro sensitivity to PKC412 and Sunitinib. *Leukemia* **27**, 1416–1418.
- Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U., Patel N.K. (2013): GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* **138** (2), 155-175.
- Altmann J.K., Sassano A., Platanius L.C. (2011): Targeting mTor for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget* **2**, 510-517.
- American cancer society, treating acute myeloid leukemia (AML), <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/recurrence.html> [cited 17. Feb. 2020].
- Angiolini M. (2011): Targeting the DFG-in kinase conformation: a new trend emerging from a patent analysis. *Future Med Chem.* **3**, 309–337.
- Amini R.-M., Berglund M., Rosenquist R., von Heideman A., Lagercrantz S., Thunberg U., Bergh J., Sundström CH., Glimelius B., Enblad G. (2002): A Novel B-cell Line (U-2932) Established from a Patient with Diffuse Large B-cell Lymphoma Following Hodgkin Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* **43**(11), 2179-2189.
- Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., Bloomfield C.D., Cazzola M., Vardiman J.W. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405.
- Bagrintseva K., Geisenhof S., Kern R., Eichenlaub S., Reindl C., Ellwart J.W., Hiddemann W., Spiekermann K.(2005): FLT3-ITD-TKD dual mutants associated AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* **105**, 3679-3685.
- Baker S., Reddy E.P. (2012): CDK4: a key player in the cell cycle, development, and cancer. *Genes Cancer* **3**, 658-669.
- Berthet C., Klarman K.D., Hilton M.B., Suh H.C., Keller J.R., Kiyokawa H., Kaldis P. (2006): Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev Cell* **10**, 563–573.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R., Markova B., Carius B., Brecht A., Duyster J., Haferlach T., Huber C., Fischer T. (2009): Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* **113**, 4074-4077.
- Brown P., Small D. (2004): FLT3 inhibitors: a paradigm of the development of targeted therapeutics for pediatric cancer. *Eur J Cancer* **40**, 707-721.
- Bruserud O., Hovland R., Wergeland L., Huang T.S., Gjertsen B.T. (2003): Flt3-mediated signaling in human acute myelogenous leukemia (AML) blasts: a functional characterization of Flt3-ligand the effects in AML cell populations with and without genetic Flt3 abnormalities. *Haematologica* **88**, 416-428.
- Carow C.E., Levenstein M., Kaufmann S.H., Chen J., Amis S., Rockwell P., Witte L., Borowitz M.J., Civin C.L., Small D. (1996): Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1, Flk2) in human leukemias. *Blood* **87**(3), 1089-1096.
- Chen P., Levis M., Brown P., Kim K.T., Allebach J., Small D. (2005): FLT3/ITD Mutation signaling includes suppression of SHP-1. *J Biol Chem* **280**, 5361-5369.
- Chen W., Otterson G., Lipkowitz S., Otterson G, Khleif S., Coxon A., Kaye F. (1997): Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene* **14**, 1243–1248.

- Chonabayashi K., Hishizawa M., Kawamata S., Nagai Y., Ohno T., Ishikawa T., Uchiyama T., Takaori-Kondo A. (2013): Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia* **27**, 1433-1436.
- Choudhary C., Schwable J., Brandts C., Tickenbrock L., Sargin B., Kindler T., Fischer T., Berdel W.E., Muller-Tidow C., Serve H. (2005): AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with ITD mutations. *Blood* **106**, 265-273.
- Chougule R.A., Kazi J.U., Rönstrand L. (2016): FYN expression potentiates FLT3-ITD induced STAT5 signaling in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **7**, 9964-9974.
- Cools J., Quentmeier H., Huntly B.J., Marynen P., Griffin J.D., Drexler H.G., Gilliland D.G. (2004): The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* **103**(7), 2802–2805.
- Česká leukemická skupina – pro život (The Czech Leukemia Study Group – for Life), <http://www.leukemia-cell.org/index.php>, [cited 17. Feb. 2020].
- Česká leukemická skupina pro život, kolektiv autorů (2013): *Akutní myeloidní leukémie informace pro pacienty a jejich blízké*. 1. vydání, Česká leukemická skupina- pro život (Cell), Jihlavská 20 Brno, 76 s.
- Češka, R., Štulc, T., et al. (2015): *Interna*. 2. vydání, Triton, Praha 10, 909 s.
- Daver N., Schlenk R. F., Russell N. H., Levis M. J. (2019): Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* **33**, 299-312.
- Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G.(2011): Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *Cell Metab.* **13**(6), 679-689.
- Dohner K., Du J., Corbacioglu A., Scholl C., Schlenk R.F., Dohner H. (2006): JAK2V617F mutations as cooperative genetic lesions in t(8;21)-positive acute myeloid leukemia. *Haematologica* **91**, 1569-1570.
- Escobar S., Brasel K., Anderberg R., Lyman S.D. (1995): Structure function studies of human flt3 ligand. *Blood* **86**, 21.
- Frohling S., Scholl C., Gilliland D.G., Levine R.L. (2005): Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* **23**, 6285-6295.
- Fry D.W., Harvey P.J., Keller P.R., Elliott W.L., Meade M., Trachet E., Albassam M., Zheng X., Leopold W.R., Pryer N.K., Toogood P.L. (2004): Specific inhibition of cyclindependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther.* **3**,1427-1438.
- Gale R.E., Green C., Allen C., Mead A.J., Burnett A.K., Hills R.K., Linch D.C. (2008): The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **5**, 2776-2784.
- Gilliland D. G., Griffin J.D. (2002): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**(5), 1532–1542.
- Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti S. (2012): An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev.* **6**, 8.
- Griffith J., Black J., Faerman L., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J., Saxena K.(2004): The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* **13**,169-178.
- Grunwald M.R., Levis M.J. (2013): FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol* **97**, 683–694.
- Gucký T., Reznickova E., Radosova Muchova T., Jorda R., Klejova Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepsík M., Divoký V., Krystof V. (2018): Discovery of N2-(4-Aminocyclohexyl)-9-cyclopentyl- N6-(4-morpholin-4- ylmethyl-phenyl)- 9H-purine-2,6-diamine as a potent FLT3 kinase inhibitor for acute myeloid leukemia with FLT3 mutations. *J. Med. Chem.* **61**, 3855-3869.
- Gunawardane R. N., Nepomuceno R. R., Rooks A. M., Hunt J. P., Ricono J. M., Belli B., Armstrong R. C. (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.
- Heidel F., Solem F.K., Breitenbuecher F., Lipka D.B., Kasper S., Thiede M.H., Brandts C., Serve H., Roesel J., Giles F., Feldman E., Ehninger G., Schiller G.J., Nimer S., Stone R.M., Wang Y., Kindler T., Cohen P.S., Huber C., Fischer T. (2006): Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* **107**, 293–300.
- Heiss E., Masson K., Sundberg C., Pedersen M., Sun J., Bengtsson S., Rönstrand L. (2006): Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Blood* **108**, 1542-1550.
- Ishihara K., Kitamura H., Hiraizumi K., Kaneko M., Takahashi A., Zee O., Seyama T., Hong J., Ohuchi K., Hirasawa N. (2008): Mechanisms for the proliferation of eosinophilic leukemia cells by FIP1L1-PDGFRalpha. *Biochem Biophys Res Commun.* **366**, 1007–1011.
- Jiang J., Paez J.G., Lee J.C., Bo R., Stone R.M., DeAngelo D.J., Galinsky I., Wolpin B.M., Jonasova A., Herman P., Fox E.A., Boggon T.J., Eck M.J., Weisberg E., Griffin J.D., Gilliland D.G., Meyerson M., Sellers W.R. (2004): Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* **104**, 1855-1858.
- Jorda R., Hendrychová D., Voller J., Řezníčková E., Gucký T., Kryštof V. (2018): How selective are pharmacological inhibitors of cell cycle-regulating cyclin-dependent kinases. *Journal of Medicinal Chemistry* **61**(20), 9105-9120.
- Kampa-Schittenhelm K.M., Heinrich M.C., Akmut F., Döhner H., Döhner K., Schittenhelm M.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), 13.
- Ke Y.Y., Singh V.K., Coumar M.S., Hsu Y.C., Wang W.-C., Song J.-S., Chen CH., Lin W.H., Wu S.H., Hsu J., Shih CH., Hsieh.H.P. (2015): Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. *Sci Reports* **5**, 11702.
- Keegan K., Li C., Li Z., Ma J., Ragains M., Coberly S., Hollenback D., Eksterowicz J., Liang L., Weidner M., Huard J., Wang X., Alba G., Orf J., Lo M.C., Zhao S., Ngo R., Chen A., Liu L., Carlson T., Quéva C., McGee L.R., Medina J., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai, K. (2014): Preclinical Evaluation of AMG 925, a FLT3/CDK4 Dual Kinase Inhibitor for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutic* **13**(4), 880–889.
- Kottaridis P.D., Gale R.E., Linch D.C. (2003): FLT3 mutations and leukaemia. *Br. J. Hematol.* **122**, 523-538.
- Lagunas-Rangel F.A., Chavez-Valencia V., Gómez M.A., Cortés-Penagos C. (2017): Acute Myeloid Leukemia-Genetic alternations and their clinical prognosis. *J. Hematol Oncol stem cells res.* **11**(4), 328-339.
- Lancet J.E. (2015): FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol.* **13**(9), 573–575.
- Lennartsson J., Jelacic T., Linnekin D., Shivakrupa R. (2005): Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**,16-43.
- Lavagna-Sévenier C., Marchetto S., Birnbaum D., Rosnet O. (1998): FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. *Leukemia* **12**(3), 301–310.
- Leemson M. A., Schlessinger J. (2010): Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**(7), 1117–1134.
- Levis M. (2017): How and when to use FLT3 inhibitors. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* **17**, 18–21.
- Li B., Zhang G., Li C., He D., Li X., Zhang C., Tang F., Deng X., Lu J., Tang Y., Li R., Chen Z., Duan C. (2012): Identification of JAK2 as a Mediator of FIP1L1-PDGFRα-Induced Eosinophil Growth and Function in CELL. *PLoS ONE* **7**(4), 34912.
- Li C., Liu L., Liang L., Xia Z., Li Z., Wang X., McGee L.R., Newhall K., Sinclair A., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai K. (2015): AMG 925 Is a Dual FLT3/CDK4 Inhibitor with the

- Potential to Overcome FLT3 Inhibitor Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics* **14**(2), 375–383.
- Li Z., Wang X., Eksterowicz J., Gribble M. W., Alba G. Q., Ayres M., Cho R. et al. (2014): Discovery of AMG 925, a FLT3 and CDK4 Dual Kinase Inhibitor with Preferential Affinity for the Activated State of FLT3. *Journal of Medicinal Chemistry* **57**(8), 3430–3449.
- Liu M.-J., Yue P. Y.-K., Wang Z., Wong R. N.-S. (2005): Methyl protodioscin induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Letters* **224**(2), 229–241.
- Liu CH., Liu B., Xu B., Zhang CH., Li P., Ji B., Zhang B., Zhang Q., Yu J., Yu CH. (2019): ETH-155008, a Novel Selective Dual Inhibitor of FLT3 and CDK4/6 in Preclinical Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **134**, 5141-5141.
- Lyman S.D., James L., Johnson L., Brasel K., de Vries P., Escobar S.S., Downey H., Splett R.R., Beckmann M.P., McKenna H.J. (1994): Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* **83**, 2795-2801.
- Masson K., Liu T., Khan R., Sun J., Rönstrand L. (2009): A role of Gab2 association in Flt3 ITD mediated Stat5 phosphorylation and cell survival. *Br. J. Haematol.* **146**, 193-202.
- McClanahan T., Culpepper J., Campbell D., Wagner J., FranzBacon K., Mattson J., Tsai S., Luh J., Guimaraes M.J., Mattei M.-G., Rosnet O., Birnbaum D., Hannum CH. (1996): Biochemical and genetic characterization of multiple splice variants of the Flt3 ligand. *Blood* **88**, 3371-3382.
- Minichiello L. (2009): TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* **10**(12), 850-860.
- Mitin N., Rossman K.L., Der C.J. (2005): Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.* **15**, 563-574.
- Mizuki M., Fenski R., Halfter H., Matsumura I., Schmidt R., Müller C., Grüning W., Kratz-Albers K., Serve S., Steur C., Büchner T., Kienast J., Kanakura Y., Berdel W., Serve H. (2000): FLT3 Mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**, 3907-3914.
- Nabinger S.C., Li X.J., Ramdas B., He Y., Zhang X., Zeng L., Richine B., Bowling J.D., Fukuda S., Goenka S., Liu Z., Feng G.S., Yu M., Sandusky G.E., Boswell H.S., Zhang Z.Y., Kapur R., Chan R. (2013): The protein tyrosine phosphatase, Shp2, positively contributes to FLT3-ITD-induced hematopoietic progenitor hyperproliferation and malignant disease in vivo. *Leukemia* **27**, 398-408.
- Naumann S., Reutzel D., Speicher M., Decker H.-J. (2001): Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leukemia Research* **25**(4), 313–322.
- Neganova I., Vilella F., Atkinson S. P., Lloret M., Passos J. F., von Zglinicki T., Lako M. (2011): An Important Role for CDK2 in G1 to S Checkpoint Activation and DNA Damage Response in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **29**(4), 651–659.
- Ohanian M., Kantarjian H.M., Borthakur G., Kadia T., Konopleva M., Garcia-Manero G., Estrov Z., Ferrajoli A., Takahashi K., Jabbour E., Daver N., Kornblau S., Wierda W., Burger J., Naqvi K., Benton Ch., Bose P., Eckardt J., Ravandi F., Cortes J. (2016): Efficacy of a Type I FLT3 Inhibitor, Crenolanib, with Idarubicin and High-Dose Ara-C in Multiply Relapsed/Refractory FLT3+AML. *Blood* **128**, 2744.
- Parcells B. W., Ikeda A. K., Simms-Waldrup T., Moore T. B., Sakamoto K. M. (2006): FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells* **24**(5), 1174–1184.
- Patel J.P., Gonen M., Figueroa M.E., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J. (2012): Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **366**, 1079–1089.
- Perl A.E., Altman J.K., Cortes J., Smith C., Litzow M., Baer M., Claxton D., Erba H., Gill S., Goldberg S., Jurcic J.G., Larson R.A., Liu C., Ritchie E., Schiller G., Spira A.I., Strickland S.A., Tibes R., Ustun C., Wang E., Stuart R., Röhlig C., Neubauer A., Martinelli G., Bahceci E., Levis M. (2017): Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute

- myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1–2 study. *Lancet Oncol.* **18**, 1061–1075.
- Perl A. (2019): Availability of FLT3 inhibitors: how do we use them?, *Blood* **134**(9), 741–745.
- Peschel I., Podmirseg S. R., Taschler M., Duyster J., Götze K. S., Sill H., Nachbaur D., Jäkel H., Hengst L. (2017): FLT3 and FLT3-ITD phosphorylate and inactivate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**(8), 1378–1389.
- Quentmeier H., Reinhardt J., Zaborski M., Drexler H.G. (2003): FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* **17**(1), 120–124.
- Ramachandran R. P., Madhivanan S., Sundararajan R., Lin W., Sankaranarayanan K. (2014): An in vitro study of electroporation of leukemia and cervical cancer cells. *Electroporation-Based Therapies for Cancer* **1**, 161–183.
- Rocnik J.L. Okabe R., Yu J.C., Lee B.H., Giese N., Schenkein D.P., Gilliland D.G. (2006): Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3–ITD. *Blood* **108**, 1339–1345.
- Roskoski R. Jr. (2010): RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 313–317.
- Roskoski R. Jr. (2012): ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* **66**, 105–143.
- Řezníčková E., Gucký T., Kováčová V., Ajani H., Jorda R., Kryštof V. (2019): Activity of 2,6,9-trisubstituted purines as potent PDGFR α kinase inhibitors with antileukemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **182**, 111663.
- Sallmyr A., Fan J., Datta K., Kim K.-T., Grosu D., Shapiro P., Small D., Rassool F. (2008): Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* **111**, 3173–3182.
- Schmidt-Arras D.E., Bohmer A., Markova B., Choudhary C., Serve H., Bohmer F.D. (2005): Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **25**, 3690–3703.
- Scholl C., Gilliland D.G., Frohling S. (2008): Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* **35**, 336–345.
- Smith C.C., Wang Q., Chin C.-S., Salerno S., Damon L.E., Levis M.J., Perl A.E., Travers K.J., Wang S., Hunt J., Zarrinkar P., Schadt E.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**, 260–263.
- Smith C.C., Lasater E.A., Lin K.C., Wang Q., McCreery M.Q., Stewart W.K., Damon L.E., Perl A.E., Jeschke G.R., Sugita M., Carroll M., Kogan S.C., Kuriyan J., Shah N.P. (2014): Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(14), 5319–5324.
- Smith C.C., Paguirigan A., Jeschke G.R., Lin K.C., Massi E., Tarver T., Chin C., Asthana S., Olshen A., Travers K.J., Wang S., Levis M.J., Perl A.E., Radich J.P., Shah N. (2017): Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood* **130**(1), 48–58.
- Sritana N., Auewarakul C.U. (2008): KIT and FLT3 receptor tyrosine kinase mutations in acute myeloid leukaemia with favorable cytogenetics: two novel mutations and selective occurrence in leukaemia subtypes and age groups. *Exp Mol Pathol.* **85**, 227–231.
- Stanicka J., Russell E.G., Woolley J.F., Cotter T.G. (2015): NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide induces DNA damage in mutant FLT3-expressing Leukemia Cells. *J Biol Chem.* **290**, 9348–9361.
- Stewart D., Lyman, Jacobsen S. (1998): c-kit Ligand and Flt3 ligand: Stem/ Progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* (91) **4**, 1101–1134.
- Stirewalt D.L., Radich J.P. (2003): The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* **3**, 650–665.
- Stone R.M., Mandrekar S.J., Sanford B.L., Laumann K. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med.* **377**(5), 454–464.

- Sun D., Yang Y., Lyu J., Zhou W., Song W., Zhao Z., Chen Z., Xu Y., Li H. (2016): Discovery and Rational Design of Pteridin-7(8H)-one-Based Inhibitors Targeting FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) and Its Mutants. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**(13), 6187–6200.
- Šálek C. (2012): Diagnostika a léčba akutních leukémií, *Interní medicína v praxi* **14**(10), 366–372.
- Takahashi S, Harigae H, Kaku M, Sasaki T., Licht J.D. (2004): FLT3 mutation activates p21WAF1/CIP1 gene expression through the action of STAT5. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 85-92.
- Takahashi S. (2011): Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol* **4**, 13.
- Tadesse S., Yu M., Mekkonen L., Lam F., Islam S., Tomusange K., Rahaman M., Noll B., Wang S. et al. (2017): Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable 4-Thiazol-N-(pyridin-2-yl)pyrimidin-2-amine Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Inhibitors as Anticancer Drug Candidates: Design, Synthesis, and Evaluation. *J. Med. Chem* **60**, 1892–1915.
- Terret M.E., Lefebvre C., Djiane A., Rassnier P., Moreau J., Maro B., Verlhac M.H. (2003): DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* **130**(21), 5169–5177.
- Tickenbrock L., Schwäble J., Wiedehage M., Steffen B., Sargin B., Choudhary C., Brandts C., Berdel W.E., Müller-Tidow C., Serve H. (2005): Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood* **105**, 3699-706.
- Tse K.F., Mukherjee G., Small D. (2000): Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* **10**, 1766-1776.
- Tse K.-F., Novelli E., Civin C., Bohmer F., Small D. (2001): Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* **15**(7), 1001–1010.
- U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [cited 17. Feb. 2020].
- Watson J., Arey B. J., Alt A. (2014): Biasing Receptor Tyrosine Kinase Signaling Pathways. *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics* **5**, 137–172.
- Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R., Naoe T. (2001): Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**, 2434-2439.
- Yuan T., Qi B., Jiang Z., Dong W., Zhong L., Bai L., Shi J. (2019): Dual FLT3 inhibitors: Against the drug resistance of acute myeloid leukemia in recent decade. *European Journal of Medicinal Chemistry* **178**, 468-483.
- Zhang S., Broxmeyer H.E. (2000): Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 195-199.
- Zheng R., Friedman A.D., Levis M., Weir E.G., Small D. (2004): Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBP expression. *Blood* **103**, 1883-1890.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABL	Abelson tyrosine-protein kinase 1
AKT	AKR thymoma protein kinase, Protein kinase B
AML	Acute myeloid leukemia
ASXL1	Additional sex combs-like protein 1
AXL	Tyrosine-protein kinase receptor UFO
BCL-XL	B-cell lymphoma XL
BCR-ABL	B-cell receptor-Abelson tyrosine-protein kinase 1
BSA	Bovine serum albumin
CBL	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependent kinase
CEBP	CCAAT/enhancer-binding protein
C-MYC	Celular myelocytomatosis protein
CNS	Central nervous system
CREB	Cyclic AMP-responsive element-binding protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminiscence
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N', N'- tetraoctová
ELK	ETS Like-1 protein
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ETO	Eight twenty one
FAB	Francouzsko-americko-britská klasifikace AML
FDA	The Food and Drug Administration
FIP1L1	Pre-mRNA polyadenylation factor-like 1 protein
FL	FLT3 ligand
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FMS = CSF1R	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor
FOX3	RNA binding protein FOX-1 homolog 3

FRZ-4	Frizzled-4
FS	Fetální sérum
FYN	Proto-oncogene c-Fyn
GAB2	GRB2-associated protein
GI50	The half maximal inhibitory concentration of cell growth
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
hERG	human ether-à-go-go-related gene
IC50	The half maximal inhibitory concentration
ITD	Internal tandem duplication
JAK	Janus kinase
JM	Juxtamembránová doména
KI	Interkinasová doména
KIT = SCFR	Mast/stem cell growth factor receptor Kit
MAP	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP/ERK kinase
MER	Proto-oncogene c-Mer
MNK2	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NOX4	NADPH oxidase 4
NPM1	Nukleofosmin 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinase
PIM	Proviral integration site kinase
PLZF	Promyelotic leukemia zinc finger
PMSF	Fenylmethansulfonylfluorid
PTB/PH	Phospho tyrosin binding/plecktrin homology
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
PU.1	Purine-rich DNA sequence binding factor 1
RAD1	RAD1 checkpoint DNA exonuclease
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma protein

RAM	Rat anti mouse
RAS	Rat sarcoma GTPase
RB	Retinoblastoma protein
RET	Rearranged during transfection (protein kinase)
ROS	Reactive oxygen species
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	Receptorová tyrosin-kinasa
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SDS	Dodecylsírán sodný
SH2	SRC homology 2
SHC	SRC homology 2 domain-containing-transforming protein C1
SHIP	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase
SHP2	Protein-tyrosine phosphatase 2
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid tyroide hormone receptors
SOS1	Son of sevenless homolog 1
SRC	Sarcoma protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SWAR	Swine anti rabbit
SYK	Spleen tyrosine kinase
TBS	Tris-buffered saline
TCF-LEF	Transcription factor- Lymphoid enhancer-binding factor 1
TEMED	N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin
TKD	Tyrosin-kinasová doména
TM	Transmembránová doména
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World health organization
WW	Motif repeating sequence WWP