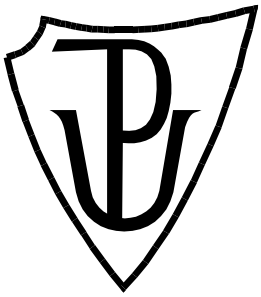
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Inhibice FLT3 a dalších kináz v léčbě akutní myeloidní leukémie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Lukáš MADA**
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Radek JORDA, Ph.D.**
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lukáš Mada
Název práce	Inhibice FLT3 a dalších kináz v léčbě akutní myeloidní leukémie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Fms like tyrosine kinase 3 (FLT3) je membránová receptorová kináza vyskytující se převážně u hematopoetických buněk. Hraje klíčovou roli v proliferaci a diferenciaci skrze signální dráhy, na jejichž koncích jsou transkripční faktory, jako například STAT5, a intracelulární signální molekuly, jako například ERK.

U akutní myeloidní leukemie byla u více jak 30 % pacientů pozorována mutace v genu *Flt3*. V současnosti má velkou pozornost studium inhibitorů této kinázy, které by mohly přinést významný posun v léčbě akutní myeloidní leukemie.

Praktická část této práce se věnuje čtyřem látkám, které mají potenciál být inhibitory FLT3. Pomocí imunodetekce FLT3, ERK, STAT5 a jejich fosforylovaných forem byla prokázána, nebo vyvrácena inhibiční aktivita. Buněčné linie MV-4-11 akutní myeloidní leukemie, ošetřené vybranou látkou, byly také analyzovány průtokovým cytometrem pro zjištění podílu buněk v různých fázích buněčného cyklu.

Klíčová slova	akutní myeloidní leukemie, FLT3, inhibitory, imunodetekce, průtoková cytometrie
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lukáš Mada
Title of thesis	Inhibition of FLT3 and other kinases in the therapy of acute myeloid leukemia
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Fms like tyrosine kinase 3 (FLT3) is a membrane receptor kinase found predominantly in hematopoietic cells. It plays a key role in proliferation and differentiation through signaling pathways ending with transcription factors such as STAT5 and intracellular signalling molecules such as ERK.

In acute myeloid leukemia, a mutation in the *Flt3* gene was observed in more than 30% of patients. The study of inhibitors of this kinase, which could bring significant progress in the treatment of acute myeloid leukemia, is currently receiving considerable attention.

The practical part of this work deals with four substances that have the potential to be inhibitors of FLT3. Inhibitory activity was demonstrated or refuted by immunodetection of FLT3, ERK, STAT5 and their phosphorylated forms. MV-4-11 acute myeloid leukemia cell lines treated with the selected substance were also analysed with a flow cytometer to determine the proportion of cells at different stages of the cell cycle.

Keywords	acute myeloid leukemia, FLT3, inhibitors, immunodetection, flow cytometry
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen 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 24. 5. 2021 Lukáš Mada

„Rád bych na tomto místě poděkoval svému vedoucímu Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení a vstřícný přístup. Poděkování patří také všem členům Laboratoře růstových regulátorů za pomoc a cenné rady, především pak Janě Hudcové a Mgr. Miroslavu Peřinovi za ochotu vždy poradit.“

OBSAH

Seznam použitých zkratek 8

Cíle práce 10

1 Úvod 11

2 Současný stav řešené problematiky 13

2.1 Akutní myeloidní leukemie 13

2.2 Receptorové tyrozinové kinázy 15

2.3 Fms like tyrosine kinase 3 (FLT3) 15

2.3.1 Exprese a posttranslační modifikace FLT3 16

2.3.2 Ligand FLT3 17

2.3.3 Aktivace a regulace FLT3 18

2.3.4 Ubikvitinace a degradace FLT3 20

2.3.5 Fyziologický význam FLT3 a FL 20

2.3.6 Mutace FLT3 22

2.4 Vybrané signální dráhy spojené s FLT3 24

2.4.1 MAPK/ERK signální dráha 25

2.4.2 JAK/STAT signální dráha 26

2.5 Inhibitory FLT3 28

2.5.1 Inhibitory první generace 28

2.5.2 Inhibitory druhé generace 32

2.5.3 Mechanismy účinků inhibitorů FLT3 34

2.5.4 Mechanismy rezistence vůči inhibitorům FLT3 34

2.5.5 Duální inhibitory FLT3 36

3 Experimentální část 41

3.1 Materiál 41

3.1.1 Chemikálie 41

3.1.2 Roztoky 42

3.1.3 Biologický materiál ... 43
3.1.4 Protilátky ... 44
3.1.5 Inhibitory ... 44
3.1.6 Přístrojové vybavení ... 45
3.2 Metody ... 46
3.2.1 Kultivace buněk ... 46
3.2.2 Příprava a ovlivnění buněk pro imunodetekci ... 46
3.2.3 Sklízení a lýze buněk ... 47
3.2.4 Polyakrylamidová elektroforéza a Western blot ... 48
3.2.5 Imunodetekce proteinů ... 49
3.2.6 Analýza buněčného cyklus průtokovým cytometrem ... 50
4 Výsledky a diskuze ... 52
4.1 Imunodetekce vybraných proteinů po ošetření buněčné linie látkou 7052 . 52
4.2 Imunodetekce vybraných proteinů po ošetření buněčné linie látkami 6888, 7378, 7385 ... 55
4.3 Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem po ošetření buněčné linie látkou 7052 ... 57
5 Závěr ... 60
Literatura ... 62

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AML	akutní myeloidní leukemie
AP-1	activator protein 1
APS	peroxodisíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
CDK	cyklin-dependentní kináza
CSF1	colony stimulating factor 1
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
DMSO	dimethylsulfoxid
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová
ERK	extracellular singnal-regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FL	fms like tyrosine kinase 3 ligand
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	interní tandemová duplikace fms like tyrozin kinázy 3
FLT3-WT	fms like tyrosine kinase 3 wild type
FS	bovinní fetální sérum
GAB	GRB2-associated-bindng protein
GAP	GTPase-activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
ITD	interní tandemová duplikace
JAK	Janus kinase
JM	juxtamembránová doména
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MLL	myeloid/lymphoid leukemia
NPM1	nucleophosmin 1
PARP	poly-(ADP-ribose)-polymerase
PCM1	pericentriolar material 1
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PDGFRα	platelet derived growth factor receptor-α
PDGFRβ	platelet derived growth factor receptor-β
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	receptorová tyrozinová kináza
SCF	stem cell growth factor
SCFR	stem cell growth factor receptor
SDS	dodecylsíran sodný
SH2	Src-homology 2 domain
SHP2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
SOS	son of sevenless
STAT	signal transducer and aktivátor of transcription
SYK	spleen tyrosine kinase
TBS	tris-buffered saline, tris-pufr
TBS-T	tris-buffered saline (tris-pufr) s TWEEN 20
TEMED	N,N,N′,N′-tetramethylethan-1,2-diamin
TOPK	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Cílem teoretické části této práce bylo seznámit se s problematikou akutní myeloidní leukemie v souvislosti s mutacemi receptorových kináz a využití jejich inhibitorů v léčbě.

Dále sjednotit dosavadní poznatky o problematice léčby akutní myeloidní leukemie promocí inhibitorů receptorových kináz nádorových buněk. Zvláštní důraz byl kladen na FLT3 kinázu, její inhibitory a mutace, které souvisí s akutní myeloidní leukemií.

Experimentální část

Cílem praktické části bakalářské práce bylo naučit se pracovat s buněčnými kulturami ve sterilním prostředí. Dále stanovit koncentraci proteinů, pracovat s elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a metodou Western blotting, provést imunodetekci proteinů s chemiluminiscenční detekcí a analyzovat obsah DNA pomocí průtokové cytometrie.

Dalším cílem bylo testovat vybrané inhibitory FLT3, které by mohly přispět k léčbě akutní myeloidní leukemie. Práce se zaměřuje také na studium vlivu inhibice FLT3 na expresi vybraných proteinů ovlivňujících buněčný cyklus a vliv inhibice FLT3 na stádium buněčného cyklu buněk.

1 ÚVOD

Akutní myeloidní leukemie (AML) patří mezi nejvážnější onemocnění krve a dlouhodobě patří mezi nádorová onemocnění s vysokým počtem úmrtí. Ročně je v České republice diagnostikováno v průměru od 3 do 15 nových případů AML na 100 000 obyvatel a incidence prudce stoupá s věkem. S věkem stoupá také počet osob, které podlehnou AML. V současné době se, vedle klasické chemoterapie, zapojují do léčby AML také inhibitory receptorových kináz, převážně pak FLT3.

Fms like tyrosine kinase 3 (FLT3) je membránová receptorová kináza vyskytující se převážně u hematopoetických buněk a mající klíčovou roli v jejich proliferaci a diferenciaci. Je počátkem mnoha signálních drah, na jejichž konci se nacházejí důležité transkripční faktory (např. STAT5) nebo významné intracelulární signální molekuly (např. ERK). Bylo pozorováno nespočet mutací FLT3 u buněčných linií AML, kde nejvýznamnější mutací je interní tandemová duplikace v juxtamembránové doméně (FLT3-ITD), která vede ke kontinuální aktivaci této receptorové kinázy. Vedle této mutace hrají významnou roli i bodové mutace v kinázové doméně, zejména pak na kodónu 835, kde nejčastěji dochází k výměně původního aspartátu za tyrozin, odtud její označení D835Y. Prokazatelná spojitost mezi mutacemi FLT3 a AML vedla k intenzivním výzkumům inhibitorů této kinázy.

První pokusy o vývoj inhibitorů však nedopadly dle očekávání. První generace těchto inhibitorů, jako je midostaurin, tandutinib, sunitinib, lestaurtinib nebo například sorafenib, se potýkala s nízkou selektivitou, jelikož funguje na obecném principu inhibice receptorových kináz. Větší úspěch však zaznamenal již zmíněný inhibitor midostaurin, který je používán v kombinaci s klasickou chemoterapií. Druhá generace inhibitorů přinesla vyšší specifitu, ovšem celkový úspěch byl potlačen objevením rezistentních mechanismů nádorů. Skrze alternativní signálních dráhy tak většina nádorů dokázala obejít inhibiční aktivitu podaných léků. Mezi nejvýznamnější inhibitory druhé generace patří gilteritinib, quizartinib a crenolanib. První zmíněný se v roce 2018 stal prvním schváleným inhibitorem FLT3 pro léčbu akutní myeloidní leukemie v monoterapii.

V současnosti se nejvíce pozornosti upírá k duálním inhibitorům. Ty krom inhibice FLT3 inhibují také jiné proteiny, které souvisí s aktivitou FLT3. Tyto inhibitory jsou z velké části na začátku klinických studií, ale již teď poskytují pozitivní

výsledky. V případě úspěchu by mohly tyto duální inhibitory přinést zásadní zlom v léčbě AML.

Praktická část této práce se věnuje čtyřem vybraným látkám s potenciální inhibiční aktivitou vůči FLT3. Krom aktivity FLT3 byly pozorovány také aktivity transkripčního faktoru STAT5 a intracelulární signální molekuly ERK, jejichž aktivace je spojená s FLT3. Krom imunodetekce těchto proteinů byla buněčná linie, ošetřená jednou z vybraných látek, podrobena také analýze buněčného cyklu na průtokovém cytometru.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) patří do skupiny zhoubných nádorů krvetvorby založených na maligní transformaci kmenové hematopoetické buňky, jenž se nejčastěji diferencuje na myeloidní blasty, které následně nekontrolovatelně proliferují.

Obecně se leukemie nejjednodušeji rozděluje na akutní a chronickou. Akutní forma probíhá rychleji a buňky ztrácejí schopnost diferenciace. Chronická forma naopak probíhá pomaleji, buňky mohou diferenciovat, ale je u nich poškozen mechanismus apoptózy. Z hlediska typu zárodečné buňky dělíme leukemii na myeloidní, která zasahuje myeloidní progenitory, ze kterých vznikají například erytrocyty, a na lymfoblastickou, která zasahuje lymfoidní progenitory, ze kterých vznikají například lymfocyty. Samotná AML pak, například v USA, tvoři zhruba dvě třetiny všech akutních leukemií a celosvětově patří k nejčastějším formám zhoubných nádorů krve (Yamamoto, Goodman, 2007).

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) se pravidelně snaží aktualizovat detailnější dělení leukemie na základě identifikace unikátních biomarkerů, analýzy odchylek genetické exprese, morfologie buněk a dalších ukazatelů (Arber a kol., 2016). První skupinou jsou myeloproliferativní choroby. Vyznačují se transformací kmenové buňky, což vede k její nekontrolovatelné proliferaci, která potlačí produkci fyziologických krvetvorných buněk. Do této skupiny patří například chronická myeloidní leukemie, polycytémie vera, esenciální trombocytémie nebo primární myelofibróza. Další významnou skupinou jsou, dle WHO, myeloidní a lymfoidní neoplázie s eozinofilií spojené s poruchami receptorů PDGFR (platelet derived growth factor receptor) nebo FGFR (fibroblast growth factor receptor), nebo s fúzí genů pro JAK2 (Janus kinase 2) s geny pro PCM1 (pericentriolar material 1). Další skupinou jsou myelodysplastické syndromy, pro které je typická anémie, trombocytopenie a leukopenie. V pozdní fázi mohou přecházet v AML. Chronická myelomonocytární leukemie je poté typickým příklad kombinace myelodysplastické neoplazmy s myeloproliferativní neoplazmou. Světová zdravotnická organizace také stanovuje dvě skupiny leukemií, u kterých dochází k poruchám na bázi lymfocytů, konkrétně B-lymfoblastické leukemie a T-lymfoblastické leukemie. Samotné AML jsou pak klasifikovany v rámci vlastní

obsáhlé skupiny, kde se liší na základě hodnocení imunofenotypu, cytogenetických změn a molekulárně genetických profilů blastů. Často se AML dělí na základě vzniku, tedy buďto jako *de novo*, nebo jako následek chronického onemocnění kostní dřeně, nejčastěji s myelodysplastickým syndromem.

Akutní myeloidní leukemie je heterogenní onemocnění. Skupina Jay P. Patela analyzovala mutace 18 genů u 398 pacientů mladších 60 let (Patel a kol., 2012). U 97 % pacientů s AML se podařilo identifikovat alespoň jednu genetickou mutaci. Dále bylo zjištěno, že s vyšší úmrtností je, mimo jiné, spojená i interní tandemová duplikace fms like tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD). Mutace genů pro FLT3 byla dle této studie pozorována ve 37 % případů, z toho 30 % případů mělo FLT3-ITD a zbylých 7 % případů mělo bodové mutace. Podobně významně zastoupené mutace mají geny NPM1 (29 %) a DNMT3A (23 %). Studie Cancer Genome Atlas Research Network pak uvádí, že průměrný počet mutací u dospělých pacientů s AML je 13 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Jsou to zejména mutace FLT3 u 28 %, NPM1 u 27 % a DNMT3A u 26 % z 200 pacientů. Z obou studií tedy vyplývá, že AML má podprůměrný počet mutací u dospělých pacientů oproti jiným rakovinám a mutace genů pro FLT3, NPM1 a DNMT3A jsou nejčastější příčinou AML.

Klinické příznaky leukemie jsou nespecifické (Šálek, 2012). Často jsou odvozeny od cytopenie, tedy anémie, leukopenie a trombocytopenie. Jedná se o únavu a snížený fyzický výkon vlivem anémie. Samotná trombocytopenie může způsobovat snadnější tvorbu modřin či krvácení dásní. Leukopenie se můžu projevit vznikem infekce, konkrétně vlivem neutropenie. U AML, nebo také u chronické myeloidní leukemii, může dojít k syndromu leukostázy, tedy poruchy mikrocirkulace vznikající v důsledku hromadění leukocytů v periferní krvi. Může se projevit dušností, bolestmi hlavy či zmateností.

Incidence AML se různí s věkem, je však nejčastějším typem leukemie u dospělých pacientů (Šálek, 2012). U osob kolem 50. roku života se AML vyskytuje v průměru u 3,5 jedinců ze 100 000. Okolo 70. roku pak u 15 jedinců ze 100 000 a okolo 80. roku roste incidence dokonce na 22 případů ze 100 000 jedinců. Medián věku při diagnóze je 65 let, což se ukazuje jako přelomový věk pro úspěšnost léčby. Až 70 % pacientů nad 65 let zemře během prvního roku od diagnózy (Meyers, Yu, Kaye, Davis, 2013). Zhruba dvě třetiny rizikových pacientů nad 65 let je z důvodu vyššího věku méně tolerantní vůči agresivní léčbě. Léčba je většinou paliativní, což vede ke zvýšené mortalitě. Nové léčebné možnosti, které mají zvýšit kvalitu života

nejen této skupiny pacientů zahrnují, mimo jiné, také terapii na základě inhibice buněčných kináz (Šustková a kol., 2017).

2.2 Receptorové tyrozinové kinázy

V mnohobuněčných organismech je nezbytné, aby spolu jednotlivé buňky komunikovaly, a to i na větší vzdálenosti. Tato komunikace může vést k proliferaci, ale také k diferenciaci, nebo k zániku buněk. O osudu buňky rozhodují růstové faktory a další molekuly extracelulární matrix. Právě receptorové tyrozinové kinázy, které se vyskytují ve všech tkáních v těle, slouží k příjmu a přenosu signálu na základě kontaktu s různými růstovými faktory, cytokiny nebo některými hormony. Na základě této skutečnosti, mutace receptorových tyrozinových kináz mohou způsobit vážná nádorová onemocnění. U akutní myeloidní leukemie byla zhruba ve 30 % případů detekována mutace v genu pro fms like tyrozin kinázu 3. Jedná se o jednu z nejčastějších mutací u pacientů s AML, ne-li nejčastější (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Patel a kol., 2012).

Obecnou stavbu tyrozinových kináz lze rozdělit na extracelulární část, kde se váže ligand, transmembránovou část, tzv. šroubovici, která kotví celý komplex v cytoplazmatické membráně, a intracelulární část, která má funkci samotné kinázy. Juxtamembránový region je pak popisován mezi cytoplazmatickou membránou a kinázovou částí. Většina tyrozinových kináz jsou za nepřítomnosti ligandu, který je nejčastěji dimer, monomery. V případě navázání ligandu dojde k tvorbě oligomerů, typicky dimerů. N-konec je umístěn extracelulárně, intracelulárně pak C-konec, který tvoří tzv. ocásek.

U člověka (*Homo sapiens sapiens*) bylo na základě fylogenetické analýzy aminokyselinových sekvencí kinázových domén identifikováno 58 receptorových tyrozinových kináz, které byly rozděleny do 20 tříd/rodin (Robinson, Wu, Lin, 2000).

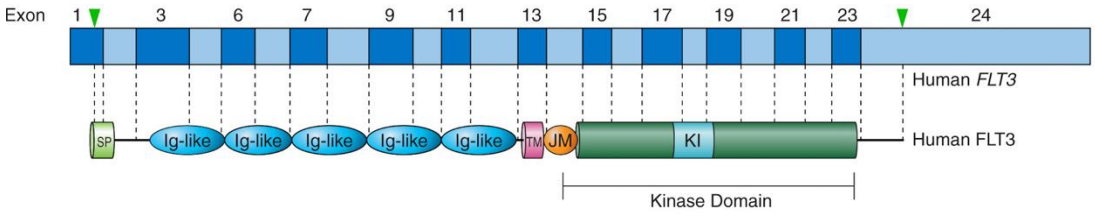
2.3 Fms like tyrosine kinase 3 (FLT3)

Fms like tyrosine kinase 3 (EC 2.7.10.1) je protein kódován na 13. chromozomu *Flt3* genem. Hraje klíčovou roli během proliferace a diferenciace a má klíčový vliv na celý život hematopoetických buněk. Jedná se o receptorovou kinázu typickou převážně pro hematopoetické buňky (jak myeloidní, tak lymfoidní linie) na počátku vývoje a ve zralých buňkách chybí (Matthews a kol. 1991).

Jedná se o cytokininovou receptorovou kinázu patřící do třídy PDGFR (III) receptorových tyrozinových kináz. Pro tuto skupinu jsou typické Ig-like (imunoglobulinům podobné) domény v extracelulární části (Obr. 1). Je jich konkrétně 5 (označovány D1-D5) a ligand, dimer, se váže ke třetí doméně D3 (Obr. 3). V kinázové doméně se poté nachází insert o délce 50 až 100 aminokyselin a tzv. aktivační smyčka. Do této rodiny patří krom FLT3 také další čtyři receptorové tyrozinové kinázy: CSF1R, SCFR (též označován jako c-Kit), PDGFRα a PDGFRβ.

2.3.1 Exprese a posttranslační modifikace FLT3

Gen *Flt3* je situován na delším raménku chromozomu 13. Skládá se z 24 exonů o celkové délce okolo 97 kb, kde 1. a 24. exon nejsou plně přepisovány (Kazi, Rönnstrand, 2019). Celkově gen kóduje 993 aminokyselin. Start kodón se nachází v druhé polovině prvního exonu, který společně s druhým exonem kóduje signální peptid. Zbylé části, které se nacházejí v extracelulárním prostoru, tedy Ig-like domény, jsou kódovány 3. až 12. exonem. Transmembránovou část poté kóduje 13. exon a juxtamembránový region 14. exon. Exony 15 až 23 kódují kinázovou doménu včetně cca 50-100 aminokyselin dlouhého insertu. C-terminální konec je kódován 24. exonem, který nese také stop kodón. Schéma genu *Flt3* a rozložení domén je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 – Schéma genu a rozložení domén FLT3. Zelené šipky ukazují umístění start kodónu (vlevo) a stop kodónu (vpravo). SP značí signální peptid na N-konci, následuje pět Ig-like domén, TM značí transmembránovou část, JM značí juxtamembránový region. KI pak značí insert o délce cca 50-100 aminokyselin v zeleně značené kinázové doméně (převzato a upraveno z Kazi, Rönnstrand, 2019).

U FLT3 dochází ke dvou významným posttranslačním modifikacím. Jedná o glykosylaci a fosforylaci. První glykosylace probíhá ihned po translaci v endoplazmatickém retikulu za vzniku dosud nekompletního proteinu. Druhým krokem je glykosylace v Golgiho aparátu, kde je výsledkem kompletní protein, který je translokován na povrch buňky. Glykosylace probíhá výhradně na extracelulární části (N-konec), tedy na Ig-like doménách a těsně za signálním peptidem. Celkově obsahuje FLT3 alespoň devět N-vázaných glykosylačních míst, podobně jako SCFR

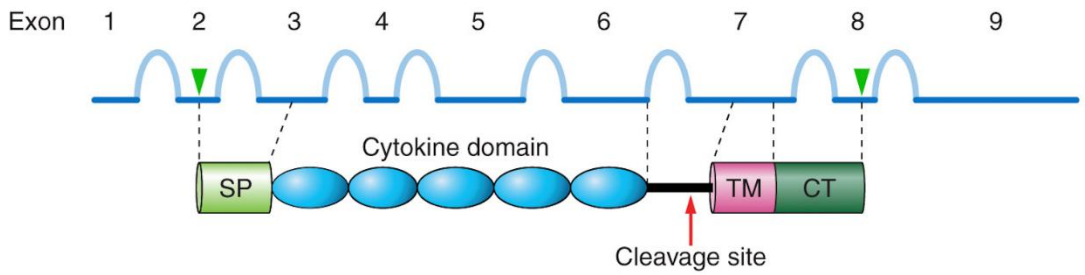
(Verstraete a kol., 2011). První místo je těsně za signálním peptidem. Dvě glykosylační místa jsou na všech Ig-like doménách s výjimkou druhé domény, která neobsahuje žádné takové místo.

K fosforylaci dochází na serinových, treoninových a tyrozinových zbytcích, a to po navázání ligandu na receptor. Více jak deset takto fosforylovaných tyrozinových zbytků je umístěno výhradně v intracelulární doméně, tedy buďto na juxtamembránové části, nebo na kinázové doméně, popřípadě C-konci (tzv. ocásek). Tyto fosforylační místa slouží pro aktivaci kinázy a transdukci signálu na signální proteiny, které síří informace dále do buňky. Serinové a treoninové fosforylace nebyly doposud důkladně prostudovány. Předpokládá se, že jsou poměrně hojné a mají svůj vliv na regulaci receptorové aktivity, jak bylo popsáno u jiných RTK (Kazi, Rönnstrand, 2019). Fosforylace je nezbytná pro aktivaci receptoru a bude ji věnována pozornost také v kapitole 2.3.3 o aktivaci a regulaci FLT3.

2.3.2 Ligand FLT3

Ligand FLT3 (FL) je cytokin, patřící do malé skupiny hematopoetických růstových faktorů, která zahrnuje také colony stimulating factor 1 (CSF-1) a stem cell factor (SCF), též známý jako ligand proteinu c-Kit.

V lidském genomu je gen pro FL umístěn na chromozomu 19. Skládá se z 9 exonů, kde první a poslední exon není přepisován. Start kodón je situován na 2. exonu, který s částí 3. exonu kóduje signální peptid. Zbylá část 3. exonu až 6. exon pak nese informaci pro cytokininové domény. 7. exon je pak přepisován do štěpného místa, transmembránové domény a okrajově také do intracelulární části, jejíž zbylou část kóduje 8. exon, který nese také stop kodón. Schéma genu pro FL a rozložení domén je znázorněné na Obr. 2.



Obr. 2 – Schéma genu a rozložení domén FL. Zelené šipky ukazují umístění start kodónu (vlevo) a stop kodónu (vpravo). SP značí signální peptid na N-konci, následuje pět cytokininových domén, poté štěpné místo (červená šipka), TM značí transmembránovou část a CT intracelulární část (převzato a upraveno z Kazi, Rönnstrand, 2019).

Nejhojněji se FL vyskytuje v transmembránové isoformě, kde může být proteolyticky štěpen (viz štěpné místo, Obr. 2) a vytvořit tak rozpustnou formu. Další formy mohou vznikat na základě alternativního splicingu (sestřihu) v místě 6. exonu, který může obsahovat stop kodón, což znemožní vytvořit štěpné místo, transmembránovou a intercelulární část (Lyman, Jacobsen, 1998). Takováto alternativní forma je velice podobná proteolyticky štěpené transmembránové isoformě, ale vyskytuje se poměrně vzácněji. Rozpustný FL tvoří nekovalentní dimer, který se následně váže na FTL3 v místě třetí Ig-like domény.

Za uvolnění cytokininových domén z transmembránové isoformy jsou zodpovědné metaloproteinázy patřící do rodiny ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) (Adrain, Freeman, 2014). Tato skupina proteináz je také zodpovědná za uvolnění mnoha ligandů z transmembránové formy u dalších receptorových tyrozinových kináz. Jedná se o transmembránové proteinázy s aktivními místy v extracelulárním prostoru. Skládají se z několika domén, kde samotná metaloproteinázová doména obsahuje vázané zinečnaté kationty. Za štěpení FL je pak hlavně zodpovědná metaloproteináza ADAM17. Skupina K. Horiuchiho prokázala, že inhibice ADAM17, nebo jeho nedostatečná exprese, vedla k ochraně transmembránové isoformy FL, a naopak zvýšená exprese vedla ke zvýšené koncentraci rozpustné (štěpené) formy FL (Horiuchi a kol., 2009).

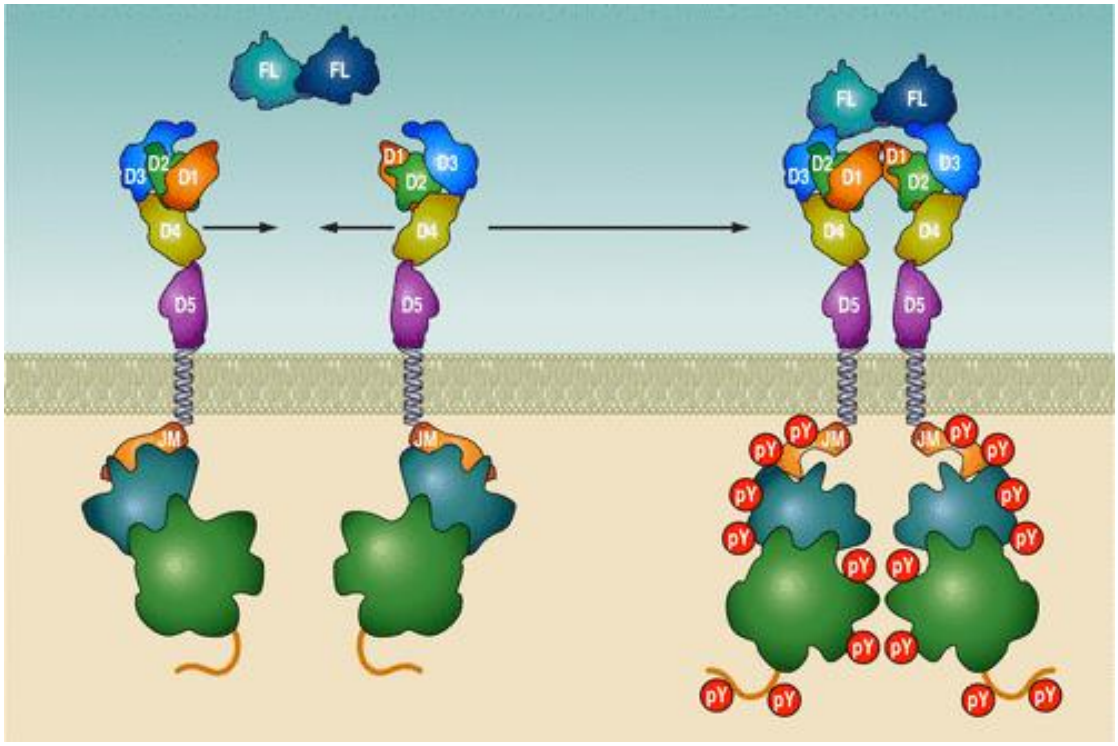
2.3.3 Aktivace a regulace FLT3

K aktivaci FLT3 dochází po navázání ligandu, konkrétně jeho dimeru, který vyvolá dimerizaci nebo oligomerizaci receptorové kinázy. Nejběžnější formou aktivace je homodimerizace. Na Obr. 3 je znázorněna jednak neaktivní forma FLT3 jako monomer, tak aktivovaná forma jako homodimer.

Neaktivní stav je udržován interakcí juxtamembránové a kinázové domény. Tato interakce blokuje vazebné místo pro ATP a zamezuje tak aktivaci kinázové domény. Mutace, které ovlivňují juxtamembránový region (interní tandemové duplikace), mají zásadní vliv na konstitutivní aktivaci receptorové kinázy (Kiyoi a kol., 2002). Po navázání ligandu na třetí Ig-like doménu dochází k narušení této interakce fosforylací, což vede ke konformačním změnám uvolňujících vazebné místo pro ATP. Dochází k dimerizaci celého proteinu a aktivaci kinázových domén. Tento postup aktivace je odlišný oproti jiným RTK, u niž hraje zásadní roli fosforylace tyrozinu v tzv. aktivační smyčce v kinázové doméně. U FLT3 však bylo prokázáno, že aktivace

kinázové domény nezávisí na fosforylaci aktivační smyčky. Její fosforylace však zásadně ovlivňuje podřadnou signalizaci a stabilitu receptorové kinázy (Kazi a kol., 2017).

Dalším rozdílem u FLT3 oproti jiným RTK, včetně některých ze stejné rodiny, je absence homotypické interakce receptorů. Při dimerizaci nedochází k interakci mezi Ig-like doménami D4 a D5 dvou monomerů. Pro ostatní receptory z třídy III RTK je tato interakce nezbytná pro aktivaci, pro FLT3 však nikoli. Ukazuje se, že hlavní mechanismus dimerizace je založen na navázání ligandu na D3, tzv. mechanismus zámku a klíče, nikoli na interakci samotných domén (Verstraete a kol., 2011).



Obr. 3 – Schéma aktivace FLT3. Vlevo dva monomery s nenavázaným FL. Vpravo pak homodimer FLT3 po navázání FL. Ig-like domény jsou zde označeny D1 až D5. Transmembránová část má formu šroubovice, JM značí juxtamembránovou část, na kterou jsou navázány zelené kinázové domény s C-terminální „ocáskem“. V aktivní formě, dimer napravo, jsou značeny fosforylace tyrozinu jako pY (převzato z Kazi, Rönnstrand, 2019).

Je tedy zřejmé, že vazba ligandu iniciuje dimerizaci a aktivaci receptorové kinázy, přičemž se na samotném procesu dimerizace nepodílí extracelulární část. Klíčovou roli hraje intracelulární část. Při navázání ligandu dojde ke strukturálním změnám, což vede k uvolnění juxtamembránové části a zpřístupnění vazebného místa pro ATP. To má za následek autofosforylaci tyrozinových zbytků, což je považováno za samotnou aktivaci. Kinetika fosforylace tyrozinu nebyla doposud podrobněji studována (Kazi, Rönnstrand, 2019). Nemáme dostatek indicií k rozhodnutí, zdali

dochází k fosforylaci náhodně, nebo jsou některá fosforylovaná místa klíčová pro fosforylaci ostatních míst. Zatím bylo zjištěno, že fosforylace aktivační smyčky není pro aktivaci FLT3 potřebná, ovšem je důležitá pro podřadnou signalizaci.

Většina fosforylačních míst tyrozinu na FLT3 je považovaná za tzv. autofosforylační místa, tedy že je fosforylace zprostředkovaná samotnou receptorovou kinázou. Nedávné studie naznačují, že do procesu fosforylace některých tyrozinových míst mohou být zapojeny i další intracelulární tyrozinové kinázy (např. spleen tyrosine kinase, SYK). Tato skutečnost je také zkoumaná pro spojitost s AML (Puissant a kol., 2014). Opačně mohou působit také různé fosfatázy, které jsou zodpovědné za regulaci aktivity FLT3 tím, že defosforylují tyroziny.

2.3.4 Ubikvitinace a degradace FLT3

Kromě mechanismu fosforylace a defosforylace je aktivita FLT3 řízena ubikvitinací. Jedná se o vícestupňový proces, který má zajistit degradaci označeného proteinu v proteazomu nebo lysozomu. Název pochází od malého globulárního proteinu, ubikvitinu, který slouží pro označení proteinu určeného k degradaci. Důležité jsou tři enzymy: aktivační E1, konjugační E2 a ligační E3. Enzym E3 se označuje jako ubikvitin-ligáza a napojuje se na cílený protein určený k degradaci. Aktivační E1 enzym aktivuje ubikvitin pomocí ATP a konjugační E2 enzym vytvoří komplex tvořený E3, ubikvitinem a cílovým proteinem. Následně dojde k navázání ubikvitinu na cílový protein a E2 a E3 se recyklují pro další použití. Z více jak 600 různých E3 ligáz kódovaných v lidském genomu je známo, že o ubikvitinaci RTK se stará rodina CBL (Thien, Langdon, 2001).

Před degradaci je potřeba receptory transportovat z membrány do buňky. Nejběžnější způsob je transport pomocí klathrinu, což je protein, který je schopen tvořit pláště na povrchu částí buněčných membrán, čímž napomáhá k tvorbě váčků pro endocytózu například právě membránových receptorů (Critchley a kol., 2018).

2.3.5 Fyziologický význam FLT3 a FL

Na rozdíl od samotného FLT3, jehož exprese je omezena pouze na kostní dřeň, exprese FL byla identifikována v různých tkáních včetně sleziny, brzlíku, vaječníku, tenkého střeva, prostaty, ledvin, kosterního svalstva, jater, plic, srdce, varlat, slinivky břišní a u leukocytů periferní krve (Lyman a kol. 1994). Významné množství FL se však nachází převážně ve stromálních buňkách kostní dřeně a v T-lymfocytech. Hladina

rozpustného FL v plazmě je za fyziologických hodnot poměrně nízká, zhruba 14 ± 31 pg/ml, ale během patologických stavů (např. aplastické anémie), nebo po chemoterapii nebo radioterapii kostní dřeně, může vzrůst až na 7 000 pg/ml (Wodnar-Filipowicz a kol., 1996). Je tedy pravděpodobné, že účinek FL je za fyziologických podmínek parakrinní, zatímco při stresu nebo patologickém stavu je jeho koncentrace na takové úrovni, že může působit endokrinně.

Při pokusech na myších (*Mus musculus*) bylo prokázáno, že vyřazení genu pro FL mělo za následek nedostatečnou hematopoézu (McKenna a kol., 2000). Nedostatek FL vede také ke snížení počtu leukocytů v kostní dřeni, slezině, lymfatických uzlinách a periferní krvi. Bylo pozorováno snížení myeloidních a B-lymfoidních progenitorů v kostní dření, počet NK buněk ve slezině a počet dendritických buněk v brzlíku, lymfatických uzlinách a slezině. S největší pravděpodobností má FL důležitý vliv na vývoj hematopoetických progenitorů, ale také na vývoj zralých periferních leukocytů.

Krom podpory proliferace bylo zjištěno, že FL je schopen inhibovat růst zhoubných nádorových buněk (Esche a kol., 1998). Tento účinek byl prokázán u myších melanomů a lymfomů. V závislosti na dávce může FL působit jako negativní regulátor růstu u akutní lymfoblastické leukemie s přeskupením genu *MML*, a to pravděpodobně indukcí silnější imunitní odpovědi (Furuichi a kol., 2007). Leukemické buňky mohou přilnout ke stromálním buňkám kostní dřeně, které expresí FL mohou chránit leukemické buňky před buněčnou smrtí vyvolanou chemoterapií. Použití protilátek anti-FL se může tato citlivost k chemoterapii obnovit.

Myši s vyřazeným genem *Flt3* se vyvinuly ve zdravé, plodné jedince s normální hladinou myeloidních a lymfoidních buněk ve slezině, a také s normální hladinou monocytů, granulocytů a erytrocytů v kostní dřeni (Mackarehtschian a kol., 1995). Zároveň byl však evidentní pokles u B-lymfoidních progenitorů. Ačkoli nebyl popsán žádný jiný receptor pro FL, alterace FL se u myší jeví jako závažnější než alterace FLT3.

Samotný FLT3 primárně ovlivňuje hematopoézu. Jeho exprese je nutná pro vývoj a proliferaci hematopoetických kmenových buněk. Ačkoli se exprese FLT3 ve většině zralých buněk ztrácí, tak spolu s FL působí jako významný regulátor homeostázy dendritických buněk a jejich vývoje (Liu a kol., 2009). Krom toho hraje komplex FLT3 a FL významnou roli v aktivaci NK buněk zprostředkovanou dendritickými buňkami (Eidenschenk a kol., 2010). Je pravděpodobné, že FLT3 má vliv na rozhraní vrozené a získané imunity.

Funkce komplexu FLT3 a FL při podřadné signalizaci je popsána v samostatné kapitole 2.4.

2.3.6 Mutace FLT3

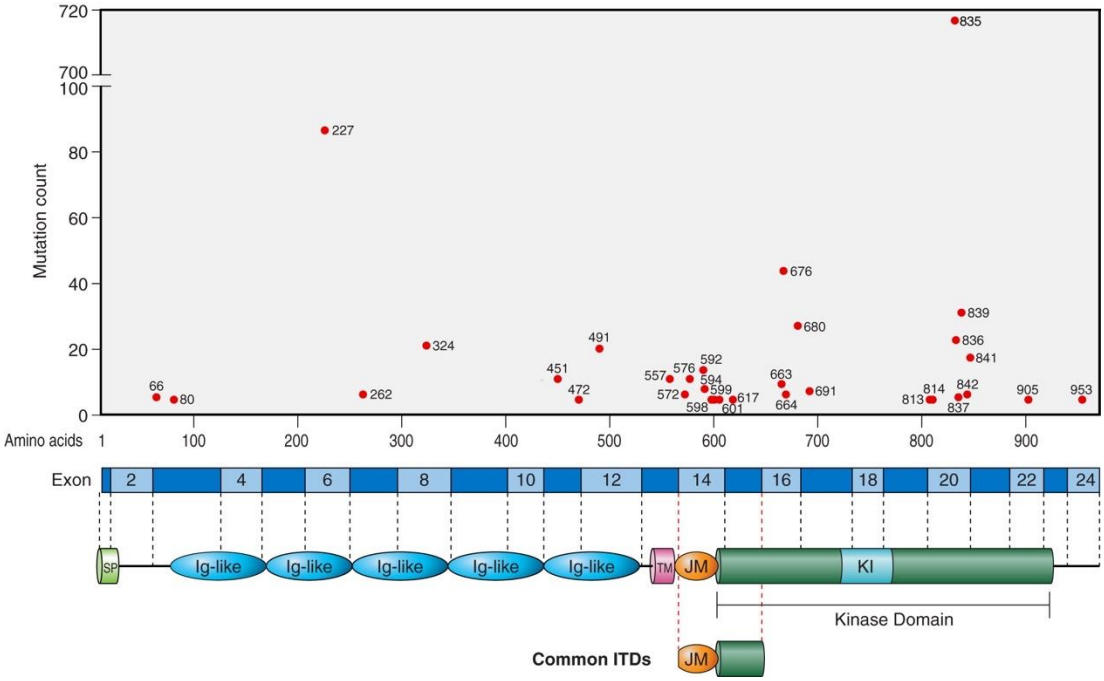
Od objevu FLT3 bylo zjištěno více než tisíc různých mutací, které jsou uvedeny v databázi COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer). Velká část těchto mutací (cca 25 %) je označována jako interní tandemové duplikace (ITD), což je inzerční mutace v oblasti, která kóduje juxtamembránovou oblast (JM). Část mutací (cca 7 %) má pak charakter bodových mutací. Celkové rozložení mutací a označení místa s nejběžnějším výskytem ITD znázorňuje Obr. 4

Interní tandemové duplikace byly identifikovány v širších oblastech intracelulární domény, tedy od samotné JM až po kinázovou doménu. Většina z nich se však vyskytuje v oblasti bohaté na tyrozin, tedy od kodonu 589 do kodonu 599, což odpovídá právě JM (Obr. 4). Výzkum skupiny kolem Franka Breitenbuechera prokázal, že výskyt ITD mimo JM se vyskytuje u cca 28 % případů, a to převážně v β1-listu kinázové domény (Breitenbuecher a kol., 2009). Dále tento výzkum prokázal, že i tyto ITD mimo JM způsobují konstitutivní aktivaci kinázy. Jsou tedy stejně závažné jako ITD přímo v JM.

Bodové mutace jsou mnohem vzácnější než ITD. Na základě databáze COSMIC se jich nejvíce nachází v oblasti 14. exonu a v jeho blízkosti, tedy v místě, kde je kódovaná JM. Frekvence těchto mutací je však poměrně nízká. Velká část bodových mutací, včetně těch s vyšší frekvencí, se nachází v části genu, která kóduje kinázovou doménu. Nejběžnější mutací je mutace na kodónu 835, který kóduje aspartát, respektive kyselinu asparagovou (označuje se tedy jako D835). Bodové mutace v části genu pro extracelulární část jsou vzácnější. Graficky je distribuce bodových mutací zobrazena na Obr. 4.

V současnosti je stále diskutováno, zdali délka ITD má zásadní vliv na úspěšnost léčby a celkovou prognózu (Kazi, Rönnstrand, 2019). Studie Kayser a kol. se věnovala 241 pacientům s ITD, kde medián délky ITD byl 48 nukleotidů (celkově se délka pohybovala od 15 do 180 nukleotidů) (Kayser a kol., 2009). Studie také prokázala, že ITD v kinázové doméně (β1-list) jsou obvykle delší než ty v JM, a zároveň jsou spojeny s horší prognózou a se zvýšenou rezistencí k chemoterapii. Tento poznatek dokládá i studie Schnittger a kol., která sice nedokázala najít přímou asociaci mezi přesnou lokalizací ITD a prognózou, ale potvrdila, že ITD lokalizované blíže

5’ konci (blíže JM) jsou spojeny s lepší prognózou než ty blíže 3’ konci (blíže ke kinázové doméně) (Schnittger a kol., 2012). Tato studie také detekovala délky ITD od 3 do 153 nukleotidů (medián: 63), zároveň však přímo nepotvrdila, že by délka mutace měla vliv na prognózu.



Obr. 4 – Přibližné rozložení bodových mutací genu *Flt3* včetně vyznačení části s nejčastějším výskytem ITD dle databáze COSMIC. Číslo jednotlivých bodových mutací (osa *x*) značí pozici na genu. Na ose *y* je znázorněno kolikrát byly přibližně dané mutace nahlášeny do databáze COSMIC. SP značí signální peptid, TM značí transmembránovou část, JM značí juxtamembránovou část, KI značí insert v zeleně zobrazené kinázové doméně (převzato z Kazi, Rönnstrand, 2019).

Úroveň ITD se dá použít jako velmi významný prognosticky faktor pro riziko relapsu u AML (Gale a kol., 2008). Samotná FLT3-ITD slouží jako spolehlivý a nezávislý biomarker AML a kombinace s bodovými mutacemi pak může mít vliv na prognózu (Mead a kol., 2007). Jak bylo řečeno dříve, nejčastější bodovou mutací je D835, lokalizovaná v aktivační smyčce kinázové domény. Nejběžněji dochází k substituci D835Y, tedy výměně původního aspartátu za tyrozin. Významné jsou taky substituce D835V (aspartát za valin), D835H (aspartát za histidin), D835E (aspartát za glutamát) a D835N (aspartát za asparagin), které všechny vedou ke konstitutivní aktivaci FLT3 (Yamamoto a kol., 2001). Dále jsou významné také N676K, Y842C, N841I, N841K, K663Q, S451F, Y572C, V592G, R834Q, V592A, V579A, F594L, F590G a Y591D, které také vedou ke konstitutivní aktivaci FLT3 (Kazi, Rönnstrand, 2019).

Je třeba také poznamenat, že u nemalé části pacientů byla pozorována nadměrná aktivita FLT3 za nepřítomnosti mutace pro gen *Flt3*. To lze vysvětlit nadměrnou expresí FL vedoucí k tzv. autokrinní smyčce (Zheng a kol., 2004). Existuje také několik případů, kdy je FLT3 nadměrně exprimována, opět bez přítomnosti mutace, což vede ke spontánní dimerizaci a aktivaci (Ozeki a kol., 2004).

2.4 Vybrané signální dráhy spojené s FLT3

Fms like tyrosine kinase 3 je transmembránová receptorová kináza. Vzhledem ke svému umístění nemůže přímo ovlivňovat expresi genů. Proto byly v buňkách vyvinuty mechanismy přenosu informace, která je přijata receptorovou kinázou a přenesena podřadnou signalizací až na konečný transkripční faktor, který přímo ovlivní expresi konkrétních genů. Možností přenosu informace je spousta.

Často dochází k využití tzv. G-proteinu, který je spojen přímo s kinázou, a při navázání ligandu na něm dochází k fosforylaci GDP na GTP, čímž dojde k jeho aktivaci, odtržení domény alfa nesoucí GTP a přenesení GTP na další složky signální dráhy. Typicky to může být adenylátcykláza, která na základě signálu z G-proteinu katalyzuje ATP na cyklický AMP (cAMP). Následně cAMP slouží jako tzv. druhý posel a aktivuje další prvky signální dráhy. G-proteiny patří mezi GTPázy, tedy hydrolázy schopné měnit GTP na GDP. U FLT3 se můžeme setkat s jiným typem GTPáz, konkrétně s Ras proteiny. Ty jsou schopny na sebe vázat GTP a využít jeden z jeho fosfátu na aktivaci dalších prvků signální dráhy. Konkrétněji je funkce Ras proteinu popsána dále v rámci MAPK/ERK signální dráhy.

Další typickou možností přenosu signálu je, vedle využití GTPáz, přímá fosforylace. Příslušná receptorová kináza, např. právě FLT3, fosforyluje široké spektrum cytoplazmatických efektorů, čímž je aktivuje. Spouští se tím kaskáda fosforylací, na jejímž konci je aktivovaný efektor přímo ovlivňující buněčný cyklus.

Pro FLT3 je typická aktivace efektorů jako SHC (důležitý regulátor apoptózy), SHP2, GAB1 a 2, GAP (aktivuje G-protein), STAT5 (významný transkripční faktor), ERK a dalších. Na základě buněčných funkcí těchto molekul můžeme říct, že hlavní signální dráhy vedoucí od FLT3 jsou MAPK/ERK a STAT5. Těmto dvou drahám, respektive detekci ERK a STAT5 (a jejich fosforylovaným formám), se věnuje také experimentální část této práce. Mimo tyto dráhy FLT3 ovlivňuje celou řadu dalších drah. Důležitá je i zvýšená exprese CDK6 u FLT3-ITD (Lopez a kol., 2016). Tato cyklin-dependentní kináza je klíčová pro přechod z G1 fáze do S fáze buněčného

cyklu, tedy k překročení G1 kontrolního bodu. Zároveň bylo zjištěno, že leukemické buňky jsou závislé na CDK6 (nikoli však na CDK4) a CDK6 zpětnovazebně přímo reguluje transkripci genů *Flt3* (Uras a kol., 2016).

2.4.1 MAPK/ERK signální dráha

V této signální dráze hraje klíčovou roli rodina proteinových kináz MAPK, pod kterou spadá i třída ERK. Mnohdy se tedy považuje označení MAPK a ERK za totožné, označující proteinovou kinázu, která je specifická pro aminokyseliny serin a treonin. Jejich funkce je rozmanitá. Podílejí se na přímé buněčné odpovědi na mitogeny, osmotický stres, tepelný šok apod. Regulují buněčnou proliferaci, apoptózu, přežití buňky a působí jako transkripční faktory (Kazi, Rönnstrand, 2019).

Po navázání ligandu na FLT3 dojde k aktivaci malé GTPázy Ras. Tato GTPáza je aktivovaná skrze proteiny z rodiny SOS nebo VAV. Jedná se o proteiny označované jako GEF (guanine nucleotide exchange factor), tedy proteiny zodpovědné za aktivaci GTPázy tím, že odpojí GDP z GPTázy a umožní tak připojení GTP, což aktivuje GTPázu. Oba tyto GEF jsou spojeny s adaptorovým proteinem GRB2, který se přímo váže na fosforylovaný tyrozin na FLT3 prostřednictvím své domény SH2, která je přítomna u celé řady signálních drah a její hlavní funkce je právě navázání na fosforylovaný tyrozin. Krom tohoto přímého navázání GRB2 na FLT3 existuje ještě nepřímý způsob skrze SH2 doménu jiného proteinu, například tyrozinovou fosfatázu SHP2 (Zhang, Mantel, Broxmeyer, 1999). Aktivace FLT3 tedy vede přímo i nepřímo k aktivaci Ras prostřednictvím adaptačních proteinů.

Aktivovaný Ras protein interaguje se serin/treoninovou kinázou Raf, což vede ke změně její konformace a k aktivaci, ale také k přesunu Raf blíže k buněčné membráně, bez čeho by aktivace nebyla úplná (Chong, Guan, 2003). Kompletní aktivace se skládá z fosforylace aktivačních míst, defosforylace inhibičních míst a přesunu Raf blíže k cytoplazmatické membráně. Po aktivaci Raf fosforyluje MEK1 a MEK2. Jedná se o dvojiciináz, které fosforylují MAPK/ERK. Po aktivaci se ERK nejběžněji translokuje do jádra, kde fosforyluje řadu transkripčních faktorů. Mezi tyto faktory patří například ETS, které ovlivňují buněčnou diferenciaci, kontrolu buněčného cyklu, migraci buněk, buněčnou proliferaci, apoptózu a angiogenezi (Ciau-Uitz, Wang, Patient, Liu, 2013). Dalším transkripčním faktorem, který je aktivován skrze ERK, je AP-1. Zde dochází k fosforylaci jeho podjednotek FOS a JUN. Mimo tyto dva významné faktory ERK fosforyluje i další, které se podílejí na regulaci

buněčného cyklu (Murphy a kol., 2002). Krom aktivity ERK v jádře, dochází také k fosforylaci substrátů v cytosolu, například ribozomální S6 kinázy (Houles, Roux, 2018).

2.4.2 JAK/STAT signální dráha

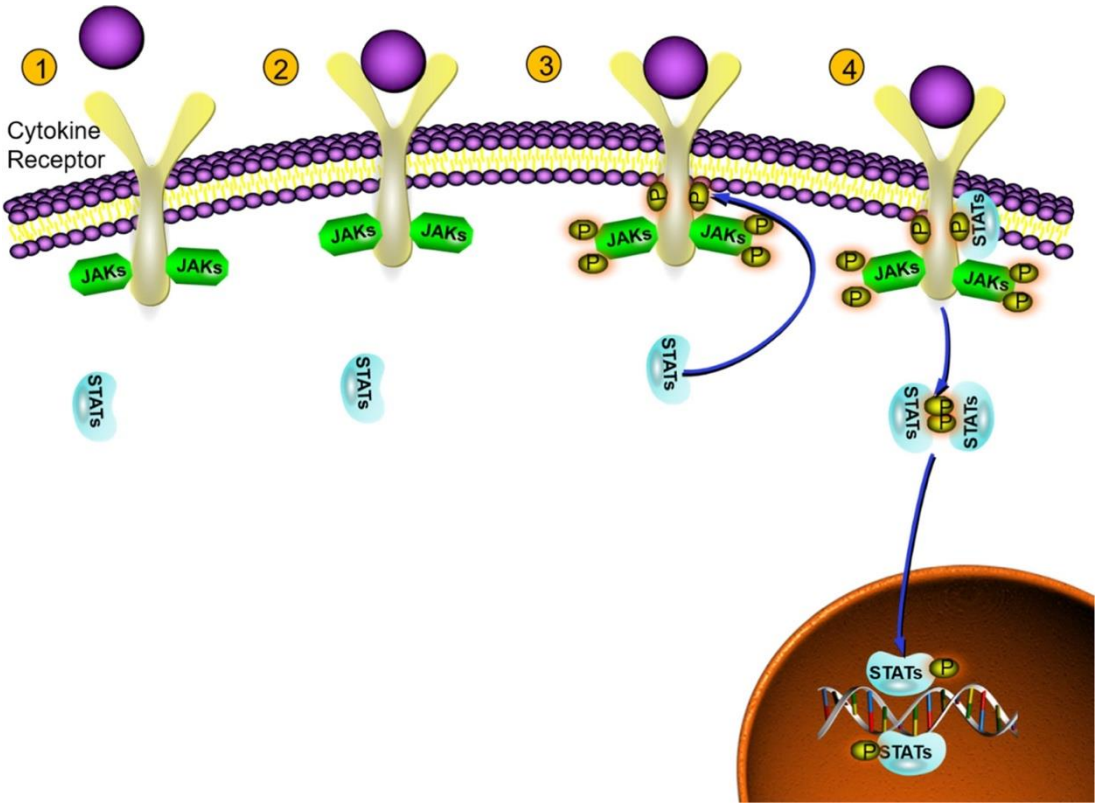
Rodina STAT hraje důležitou roli jako transkripční faktory. Do rodiny patří proteiny STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B a STAT6 (Xin a kol., 2020). Jejich úloha v organismu je rozmanitá. Na rozdíl od ostatních, STAT3 a STAT5 mají širší biologickou funkci při léčbě rezistence chorob a významně ovlivňují proliferaci, rezistenci proti apoptóze a angiogenezi. Dále bylo zjištěno, že STAT3 a STAT5 jsou neustále aktivní u některých nádorů krve a jiných nádorových onemocnění (Yu, Jove, 2004).

Proteiny rodiny STAT jsou aktivovány skrze JAK/STAT signální dráhu. Tato signální dráha je zapojena do mnoha dějů, jako je buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza a hraje významnou roli v regulaci imunitního systému. Na jejím konci je aktivní transkripční faktor z rodiny STAT. Samotný mechanismus této signální dráhy je poměrně jednoduchý. Ovšem komplikací může být překryv této dráhy s jinými signálními drahami. V současné době existuje spousta důkazů, že přetrvávající aktivace JAK/STAT signální dráhy úzce souvisí s mnoha imunitními, nádorovými a zánětlivými chorobami (Xin a kol., 2020). Specifický mechanismus však stále zůstává nejasný a je v zájmu současného výzkumu.

Tato signální dráha je spojena s cytokinovými receptory, kterým chybí kinázová aktivita, a proto mají na své intracelulární části navázané JAK (O'Shea a kol., 2015). Po navázání cytokinu (např. interleukinu) na receptor dojde k fosforylaci receptoru pomocí JAK. Fosforylované tyroziny na receptoru slouží jako místo, kde se váže STAT skrze svou doménu SH2. Po navázání dojde k fosforylaci STAT a jeho dimerizaci, čímž se aktivuje. Po aktivaci je STAT dimer odpojen od receptoru a přenesen z cytoplazmy do jádra, kde reguluje expresi konkrétních genů. Schéma této dráhy je znázorněno na Obr. 5.

Janus kinázy patří mezi tyrozinové kinázy. Na rozdíl od FLT3 nejsou ukotveny v membráně, ale nacházejí se v cytosolu. Někdy jsou také nazývány „two-faced god“ kinázy (Xin a kol., 2020). „Two-faced“ proto, že fosforylují jak cytokininový receptor, tak signální molekuly (např. STAT), které obsahují SH2 doménu. Označení „god“ má původ v jejich názvu, který je odvozen od jména římského boha počátku, duality, cest

a konců Januse. Rodina JAK zahrnuje čtyři hlavní členy: JAK1, JAK2, JAK3 a Tyk2 (Cai a kol., 2015). Pro hematopoézu je klíčová JAK3, která je přítomna pouze u hematopoetických buněk (Wilson, 2010).



Obr. 5 – Schéma JAK/STAT signální dráhy. 1) na receptoru není navázán ligand. 2) ligand se navázal na receptor. 3) došlo k fosforylaci receptoru, čímž se vytvořilo vazebné místo pro STAT. 4) STAT se navázal na receptor a aktivoval se, odpojil se jako dimer a putoval do jádra, kde působil jako transkripční faktor (převzato z Xin a kol., 2020).

Z výše uvedeného vyplývá, že za fyziologických podmínek FLT3 neaktivuje proteiny rodiny STAT. Bylo však zjištěno, že v případě mutace FLT3 dochází k významné aktivaci STAT5, který je běžně aktivován JAK2 (Spiekermann a kol., 2003). Studie Spiekermann a kol. se věnovala jak rekombinantním myším buňkám, tak lidským buňkám AML. V obou případech bylo prokázáno, že FLT3-WT („wild type“) po navázání ligandu nehraje žádnou roli v aktivaci proteinů rodiny STAT. Naopak mutovaná forma, a to převážně FLT3-ITD, přímo aktivuje STAT5, a to ve velké míře. Oproti STAT5 byl STAT3 aktivován minimálně. Zvýšená aktivace STAT5, oproti jiným proteinům z rodiny STAT, je tedy přímým ukazatelem mutace FLT3. U AML však může dojít i k mutaci přímo v JAK3, což může také vést k aktivaci proteinů STAT. Tato mutace má však vliv převážně na aktivaci STAT1 a méně na STAT5, což znamená, že mutace ve FLT3 je dominantnější v aktivaci STAT5 než

mutace v JAK3 (Spiekermann a kol., 2001). Z výše uvedených důvodů byla identifikace STAT5 proteinu zahrnuta i v experimentální části této práce.

2.5 Inhibitory FLT3

Jak bylo sepsáno v předešlých kapitolách, mutace FLT3 hrají klíčovou roli při AML. Jejich množství a typ přímo ovlivňuje prognózu. Od objevení FLT3 na počátku 90. let se intenzivně studovala funkce této receptorové kináz a po objevení významu mutací a jejich spojitosti s AML na přelomu tisíciletí se úsilí vědců zaměřilo na vývoj látek, které dokážou zastavit nepřetržitou aktivitu FLT3 (Kiyoi, Kawashima, Ishikawa, 2020). Během vývoje těchto inhibitorů se klade důraz nejen na jejich specifičnost, ale také na minimalizaci nežádoucích účinků. Aktuálnost výzkumu potvrzuje i fakt, že poměrně nedávno (2017) byl v USA povolen první lék, který je založený na inhibici FLT3, midostaurin (Levis, 2017).

Obecně se inhibitory dají rozdělit na první generaci, která působí méně specificky k FLT3 a spíše inhibuje obecně receptorové kinázy, a na druhou generaci s mnohem vyšší specifitou vůči FLT3 (Zhong a kol., 2020). Dle principu působení lze pak inhibitory rozdělit na různé typy. Buďto působí na principu kompetice s ATP, nebo inhibuje vazebné místo pro ATP navázáním na hydrofobní domény v blízkosti vazebného místa pro ATP, nebo se inhibitory váží na jiná místa, než jsou vazebná místa (alosterická místa), čímž změní konformaci proteinu. Blíže se mechanismům účinku věnuje samostatná kapitola 2.5.3.

2.5.1 Inhibitory první generace

Jedná se o generaci prvních inhibitorů, jejíž cílem měl být FLT3. Z důvodu nízké specifity jsou však postavené na obecné inhibici tyrozinových kináz. Jako nejznámější zástupce se uvádí tandutinib, sunitinib, midostaurin, lestaurtinib a sorafenib (Tab. 1) (Zhong a kol., 2020).

Klinické studie však nedopadly dle prvotních představ a ukázalo se, že monoterapie těmito inhibitory je nevýrazná (Kiyoi, 2015). Problémem byla jednak nízká specifita, tak i skutečnost, že pro dostatečnou účinnost inhibitorů by musela být udržována jejich dostatečná koncentrace v plazmě. To ale komplikuje navazování inhibitorů na plazmatické proteiny, což výrazně snižuje jejich aktivní koncentraci, a tudíž i účinnost. Dle studií, ani po zvýšení koncentrace inhibitorů v plazmě nedocházelo k úplnému potlačení aktivity FLT3 (Levis a kol., 2006). Z tohoto důvodu

byly klinické studie inhibitorů první generace v monoterapii pozastaveny. Následovaly studie účinku těchto inhibitorů v kombinaci s tradiční chemoterapií u pacientů s mutací ve FLT3. Krom terapie v kombinaci s klasickou chemoterapií našly mnohé z těchto inhibitorů uplatnění i při léčbě jiných typů nádorů.

Z výše zmíněných inhibitorů nejlépe obstál midostaurin, což je derivát benzoylstaurosporinu (Kiyoi, 2015). Jedná se o inhibitor jak pro FLT3-ITD, FLT3-WT, tak pro FLT3 s bodovými mutacemi v kinázové doméně. Ve studii Stone a kol. byl části pacientům podáván midostaurin v kombinaci s tradiční chemoterapií, která spočívala v podávání daunoribicinu (60 mg na čtvereční metr povrchu těla po první tři dny, intravenózně) a v podání cytarabinu (200 mg na čtvereční metr povrchu těla po dobu prvních sedmi dní terapie, intravenózně) (Stone a kol., 2017). Midostaurin byl podáván v dávce 50 mg perorálně dvakrát denně od 8. do 21. dne terapie. Výsledky ukázaly, že pacienti s kombinací midostaurinu a klasické chemoterapie vykazovali výrazně příznivější odpověď na léčbu.

Tandutinib je derivátem chinazolinu a inhibuje aktivitu jak FLT3-WT, tak FLT3-ITD, nikoli však FLT3 s bodovou mutací v kinázové doméně (Kiyoi, 2015). Krom FLT3 působí také proti PDGFRβ a c-Kit. Vzhledem k poměrně nízkému počtu cílených receptorů patří mezi inhibitory první generace s vysokou selektivitou, ovšem klinické studie prokázaly, že stejně jako většina inhibitorů první generace nemá přesvědčivý inhibiční efekt v monoterapii (DeAngelo a kol., 2006). Během studie se u pacientů neobjevovaly závažnější vedlejší účinky než nevolnost a únava.

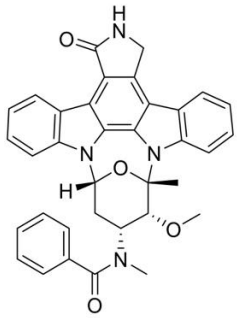
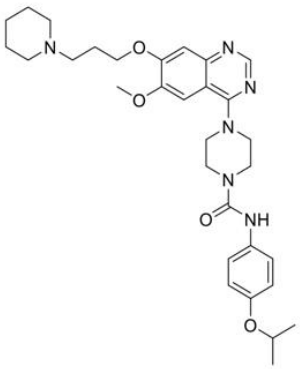
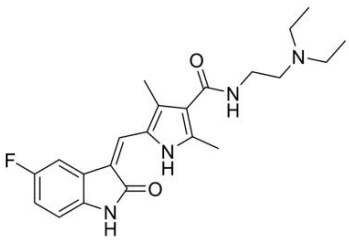
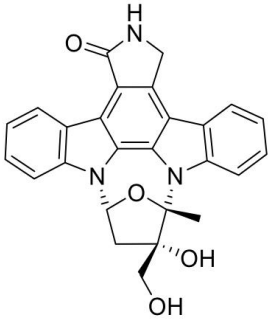
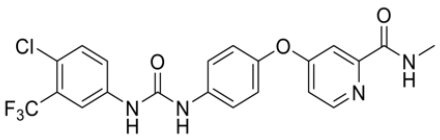
Sunitinib je derivát indolinonu a v Japonsku byl schválen pro léčbu karcinomu ledvin, gastrointestinálního stromálního tumoru a neuroendokrinního tumoru (Kiyoi, 2015). Klinické studie pro léčbu AML byly pozastaveny, jelikož prokazuje vyšší specifičnost k jiným RTK.

Lestaurtinib je derivát indolokarbazolu a strukturou je velmi podobný midostaurinu (Kiyoi, 2015). Oproti midostaurinu je specifičtější k FLT3, ovšem klinické studie prokázaly, že účinnost při monoterapii je nedostačující a vyššího významu nenabývá ani při kombinaci s klasickou chemoterapií (Levis a kol., 2011). Z těchto důvodů byly další klinické testy pozastaveny.

Sorafenib je multikinázový inhibitor, který byl schválen pro léčbu např. hepatocelulárního karcinomu (Liu a kol., 2006). Obdobně jako jiné inhibitory první generace, ani sorafenib nevykazuje přesvědčivé výsledky v monoterapie. Navíc u starších pacientů nevykazuje účinnost ani v kombinaci s klasickou chemoterapií a

doporučuje se další studie tohoto inhibitoru pro použití při léčbě AML (Serve a kol., 2013). Naopak jiná studie, která testovala sorafenib v kombinaci s klasickou chemoterapií u pacientů mladších 60 let prokázala, že sorafenib prodlužuje pacientům s AML život, ale jeho použití je spojeno i s vyšším výskytem vážnějších vedlejších účinků, jako je horečka, krvácení, průjmy a srdeční problémy (Röllig a kol., 2015).

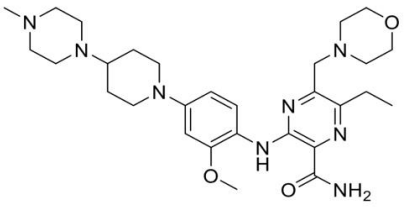
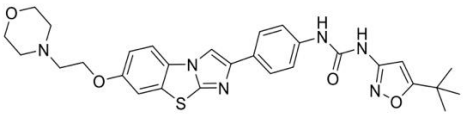
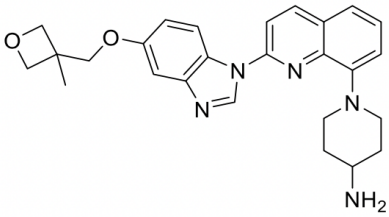
Tab. 1 – Vybrané inhibitory první generace včetně chemické struktury, příkladů cíle účinku a typu mechanismu účinku (Zhong a kol., 2020).

Název	Chemická struktura	Cíle	Mechanismus
Midostaurin		FLT3, PDGFRβ, VEGFR1/2, Syk, Flk-1, c-Kit, c-Src	Typ I
Tandutinib		FLT3, PDGFRβ, c-Kit	neurčeno
Sunitinib		FLT3, PDGFRβ, VEGFR2, c-Kit	Typ I
Lestaurtinib		FLT3, JAK2, TrkA	Typ I
Sorafenib		FLT3, c-Kit, PDGFRβ, VEGFR2/3, Raf-1	Typ II

2.5.2 Inhibitory druhé generace

Pro inhibitory druhé generace je typická vyšší citlivost a selektivita k FLT3. Mezi trojici nejvýznamnějších inhibitorů druhé generace patří gilteritinib, quizartinib a crenolanib (Tab. 2) (Kiyoi a kol., 2020). Gilteritinib byl povolen jak v Japonsku, tak v USA (2018) jako lék proti AML s výskytem mutací v genu pro FLT3. Jedná se tak o první inhibitor FLT3 schválený pro monoterapii na světě. Quizartinib je zatím povolen pouze v Japonsku (2019) a na ověření v USA stále čeká.

Tab. 2 – Vybrané inhibitory druhé generace včetně chemické struktury, příkladů cíle účinku a typu mechanismu účinku (Zhong a kol., 2020).

Název	Chemická struktura	Cíle	Mechanismus
Gilteritinib		FLT3, AXL	Typ I
Quizartinib		FLT3	Typ II
Crenolanib		FLT3, PDGFRα/β	Typ I

Gilteritinib je vysoce selektivní a silný inhibitor FLT3 (Mori a kol., 2017). Krom toho také působí proti další tyrozinové kináze AXL. Proto je některými autory řazen také mezi duální inhibitory, jelikož AXL je receptorová tyrozinová kináza související s aktivací JAK/STAT signální dráhy a její fosforylace vede k tvorbě rezistencí vůči inhibitorům, jako je například midostaurin nebo quizartinib (Wang a kol., 2021). Použití gilteritinibu *in vitro* prokazatelně vedlo k potlačení růstu buněčné linie AML. Působí inhibičně vůči FLT3-ITD i proti bodovým mutacím v kinázové doméně, což vedlo také ke snížení celkové fosforylace ERK a STAT5. Stejně pozitivní

výsledky prokázaly i testy *in vivo* na myších. Klinická studie Perl a kol. testovala gilteritinib na 252 pacientech s AML v průběhu dvou let (Perl a kol., 2017). Gilteritinib byl podáván jednou denně a maximální tolerovaná dávka byla stanovena na 300 mg na den. Při vyšších dávkách se objevovaly vážnější nežádoucí účinky, jako silné průjmy a zvýšení aspartátaminotransferázy. Ideální dávka, která byla také použita v dalších klinických studiích, byla stanovena na 120 mg na den. Gilteritinib je obecně dobře snášen pacienty. Jeho inhibiční účinky byly touto studií prokázány a byl označen jako vhodný lék pro monoterapii AML. Pacienti léčeni gilteritinibem žili v průměru déle než ti léčení klasickou chemoterapií. Na základě klinických studií se gilteritinib stal v roce 2018 prvním povoleným lékem na bázi inhibice FLT3 pro monoterapii AML, a to jak v Japonsku (Kiyoi a kol., 2020), tak v USA (Zhong a kol., 2020).

Quizartinib má velmi silnou selektivitu a afinitu k FLT3, a to konkrétně pouze k FLT3 s interní tandemovou duplikací, tedy neinhibuje FLT3 s bodovou mutací v kinázové doméně (Zarrinkar a kol., 2009). Na rozdíl od gilteritinibu byla pozorována nízká míra zotavení krvinek po léčbě (Galanis, Levis, 2015). Při vyšších koncentracích, nad 28 nM v médiu *in vitro*, se stává potenciálním inhibitorem c-Kit, což může být příčinou nízké míry zotavení krvinek (myelosuprese). Studie *in vitro* pozorovaly antiproliferační účinky quizartinibu u buněčné linie MV-4-11, a to již při koncentracích menších než 1 nM (Kampa-Schittenhelm a kol., 2013). Další studie, zabývající se inhibiční aktivitou quizartinibu vůči FLT3-ITD u buněčné linie MV-4-11 *in vitro*, pozorovala inhibiční účinek této látky při koncentraci 2 nM (Zarrinkar a kol., 2009). Vyšší koncentrace sebou nesly při klinických studiích také vyšší frekvenci a závažnost vedlejších účinků, což vedlo ke snížení dávky v dalších studiích (Cortes a kol., 2018). Obecně však quizartinib vykazoval velmi dobré výsledky při monoterapii AML, což také vedlo k jeho schválení v Japonsku roku 2019.

Crenolanib inhibuje jak FLT3-WT a FLT3-ITD, tak bodové mutace v kinázové doméně (Wu, Li, Zhu, 2018). Krom toho působí i proti PDGFRα a β. Oproti quizartinibu méně narušuje růst erytroidních kolonií. Studie prokázaly, že crenolanib je velmi účinný i proti mnohdy rezistentní bodové mutaci D835Y (Zimmerman a kol., 2013). Tato studie také poukazuje na skutečnost, že kombinace crenolanibu, jakožto inhibitoru typu I, se sorafenibem, jakožto inhibitorem typu II, vykazuje silnější inhibici, než kdyby byly obě látky použity zvlášť. Vedlejší účinky nejsou vážnější než nevolnost, únava, bolest břicha apod. Lze jej tedy považovat za bezpečnou látku, u které nebyl pozorovány žádné limitní hodnoty dávky.

2.5.3 Mechanismy účinků inhibitorů FLT3

Dělení mechanismů účinku je různé. Lze jej rozdělit na dva základní typy (Kiyoi a kol., 2020). Pro typ I je typické, že se váže jak na aktivní, tak na neaktivní FLT3, a to ve vazebném místě pro ATP, v místě aktivační smyčky, tedy na kinázovou doménu. Typ II se naopak může vázat pouze k neaktivním receptorům poblíž místa pro ATP. Inhibitory typu II jsou účinné proti ITD, ale neúčinné proti bodovým mutacím v kinázové doméně (Daver a kol. 2019). Zde platí, že inhibitory typu II mají zpravidla vyšší inhibiční aktivitu a selektivitu, protože působí na inaktivních receptorových kinázách, kde vazebné místo pro ATP je ukryto uvnitř proteinu, což při navázání inhibitoru vede k interakci okolních aminokyselin, které jsou typické pro danou receptorovou kinázu, s inhibitorem.

Jiné dělení definuje tři typy inhibitorů (Zhong a kol., 2020). Inhibitory typu I jsou kompetitivní inhibitory s ATP a dokážou rozpoznat tzv. DFG-in místo (velmi konzervativní část v aktivační smyčce skládající se z aspartátu, fenylalaninu a glycinu) v aktivním FLT3, čímž tedy cílí na vazebné místo pro ATP. Naopak inhibitory typu II rozpoznávají DFG-out místo na neaktivním FLT3 a blokují aktivaci kinázy skrze navázání na hydrofobní doménu, tedy na místo v blízkosti vazebného místa pro ATP. Konečně inhibitory typu III se váží na jiná místa, než je místo pro ATP, a tím způsobují alosterickou inhibici. Obecně mají inhibitory typu II vyšší selektivitu než inhibitory typu I, protože hydrofobní region je více specifický pro různé druhy receptorových kináz.

2.5.4 Mechanismy rezistence vůči inhibitorům FLT3

V průběhu posledních dvaceti let bylo testováno nespočet inhibitorů FLT3 a několik z nich bylo také schváleno k použití v praxi. Klinické studie však odpozorovaly různé mechanismy rezistence vůči těmto inhibitorům. Obecně je můžeme rozdělit na primární a sekundární rezistence (Kiyoi a kol., 2020).

Primární rezistence zahrnují různou inhibiční aktivitu proti různým typům mutací. Některé inhibitory působí pouze proti FLT3-ITD, nikoli proti bodovým mutacím v kinázové doméně, což při potlačení FLT3-ITD může vést k rezistenci ve formě tvorby bodových mutací.

Dalším možností primární rezistence je spojená s koncentrací FL. Studie ukázaly případy, kdy zvýšená koncentrace FL v plazmě po chemoterapii znemožnila

účinnost inhibitorů (Sato a kol., 2011). Výsledky ukazují, že přidání exogenního FL k buňkám, které obsahují FLT3-WT i FLT3-ITD, mělo za následek aktivaci FLT3-WT, ale ne FLT3-ITD (v přítomnosti inhibitorů) (Chen a kol., 2016). Souběžně s aktivací FLT3-WT došlo také k aktivaci ERK, ale nikoli STAT5, což potvrzuje, že FL neaktivuje FLT3-ITD a potlačuje účinky inhibitorů. Studie Chen a kol. prokázala, že inhibitory byly mnohem více účinné u buněčných linií, které obsahovaly pouze FLT3-ITD, než u linií obsahující FLT3-ITD spolu s FLT3-WT. Tento mechanismus rezistence je závislý na typu použitého inhibitoru. Přidání FL působilo silnější rezistenci při použití např. gilteritinibu, quizartinibu a sorafenibu než při použití např. midostaurinu a lestaurtinibu. Je to dáno mechanismem jejich účinku. Gilteritinib, quizartinib a sorafenib vykazují nižší účinnost vůči FLT3-WT, což vede k posílení vlivu FLT3-WT na rezistenci. Naopak midostaurin a lestaurtinib mají srovnatelné inhibiční účinky proti FLT3-WT a proti FLT3-ITD.

Mezi další primární rezistence patří aktivace MAPK/ERK signální dráhy skrze jiné receptory a ligandy, jako například skrze fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2), respektive aktivace jeho receptoru FGFR1. Zvýšená hodnota aktivity FGFR1 byla pozorována u stromálních buněk kostní dřeně po použití quizartinibu u pacientů s FLT3-ITD (Traer a kol., 2016). Dalším mechanismem primární rezistence je skrze protein CYP3A4, což je protein v těle zodpovědný za oxidaci xenobiotik a jejich následné odstranění z těla. V kostní dřeni byla pozorována exprese CYP3A4 při podání sorafenibu, quizartinibu a gilteritinibu, což vedlo k rezistenci proti těmto inhibitorům (Chang a kol., 2019). Obecně je prokázáno, že např. jaterní CYP3A4 inhibuje takřka veškeré inhibitory tyrozinových kináz, včetně těch proti FLT3. Všechny tyto poznatky primární rezistence proti inhibitorům naznačují, že buňky AML v kostní dřeni mohou uniknout účinkům inhibitorů prostřednictvím mikroprostředí kostní dřeně, což vede k přetrvávání onemocnění.

Sekundární rezistence byly objeveny během klinických studiích, kdy se hromadily případy rezistence vůči inhibitorům FLT3. Byly rozděleny na takové rezistence, u kterých dochází ke vzniku sekundární mutace v samotném genu pro FLT3 (tzv. „on-target“ rezistence), při kterých si buňky zachovávají závislost na signálech skrze FLT3, a na takové, při kterých buňky získávají nezávislost na FLT3 (tzv. „off-target“ rezistence) a stávají se závislé na jiných signálních drahách (Kiyoi a kol., 2020).

První typ rezistencí („on-target“) jsou založeny na získání sekundárních mutací v genu *Flt3* (odtud „on-target“). Konkrétně v místě aktivační smyčky v kinázové doméně. Jsou pozorovány u inhibitorů typu II, např. quizartinib nebo sorafenib, které jsou schopny inhibovat pouze FLT3-ITD, nikoli však bodové mutace v kinázové doméně. Nově získané mutace se tedy nacházejí právě v kinázové doméně a způsobují aktivaci FLT3 i přes inhibici ITD (Smith a kol., 2012). Ve studii Smith a kol. identifikovali bodové mutace např. na D835 nebo Y842 (obě místa v aktivační smyčce), což vedlo k rezistenci vůči podanému inhibitoru u pozorovaných pacientů.

Naopak „off-target“ rezistence jsou založeny na získání nezávislosti na FLT3, tedy na vzniku mutace mimo FLT3, která umožní aktivaci podřízených signálních drah, zejména pak MAPK/ERK signální dráhy (McMahon a kol., 2019). Tato rezistence se vyvíjí při použití inhibitorů typu I, typicky při použití gilteritinibu, který je schopen inhibovat i bodové mutace v kinázové doméně FLT3, což vede k vytvoření mutací mimo gen *Flt3* (odtud „off-target“). Studie McMahon a kol. prokázala výskyt mutací v dráze Ras/MAPK po podání gilteritinibu u 12,2 % pacientů. U zbylých pacientů byly identifikovány bodové mutace ve FLT3, ovšem ty se ukázaly jako umlčené skrze inaktivaci FLT3 inhibitorem. Toto zjištění je důležité a poukazuje na fakt, že i při použití inhibitorů typu I se projevuje „on-target“ rezistence, která ovšem nemá transformační důsledky.

2.5.5 Duální inhibitory FLT3

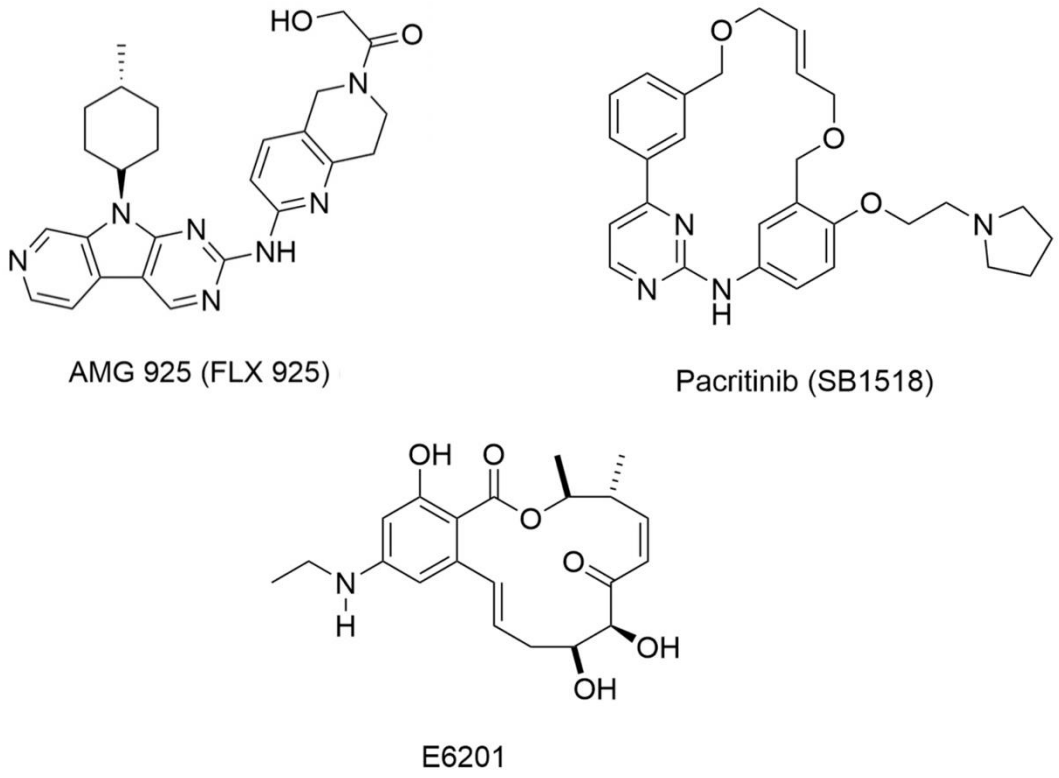
Po odhalení mechanismů rezistence vůči inhibitorům FLT3 se vědecké studie zaměřily na vývoj duálních inhibitorů, které cílí krom FLT3 také na jiné proteiny, které jsou spojeny s FLT3 podřízenou signalizací, což by mohlo vést k zastavení nádorového bujení i při výskytu primární či sekundární rezistence (Yuan a kol., 2019). Takto vyvinuté inhibitory vykazují mnohem vyšší účinnost při léčbě AML a zároveň sebou nesou menší míru nežádoucích vedlejších účinků. Mnoho z těchto inhibitorů je na počátku testování. V této kapitole jsou uvedeny vybrané duální inhibitory.

Prvním významným duálním inhibitorem je AMG 925 (FLX 925) (Obr. 6), který se v současnosti nachází v první fázi klinického testování (Yuan a kol., 2019). Tento inhibitor krom FLT3 inhibuje také cyklin-dependentní kinázu 4/6 (CDK4/6), která hraje zásadní roli v G1 fázi buněčného cyklu a její aktivita napomáhá přechodu skrze G1/S kontrolní bod. V preklinických studiích bylo prokázáno, že aktivita FLT3 souvisí s aktivitou CDK4/6 a stává se tedy vhodným cílem při léčbě AML (Wang a

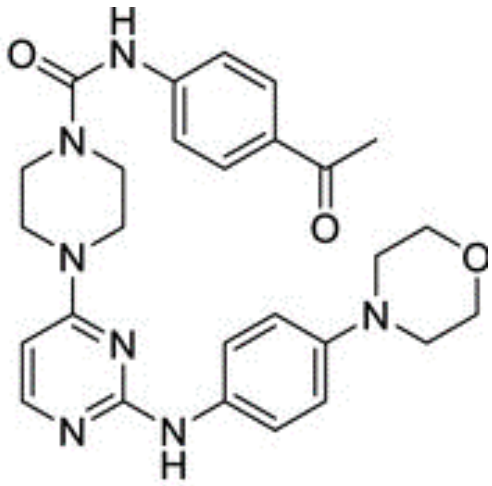
kol., 2007). Samotný AMG 925 byl po preklinických studiích shledán jako vhodný pro klinický vývoj, převážně pro svou vyváženou inhibici FLT3 a CDK4/6, silné antiproliferační účinky, výborné farmakokinetické vlastnosti a dobrý bezpečnostní profil (Li a kol., 2014).

Dalším duálním inhibitorem je pacritinib (SB1518) (Obr. 6), který se v současnosti nachází ve třetí fázi klinického testování (Yuan a kol., 2019). Jeho cílem je krom FLT3 také JAK2. Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, rodina proteinů JAK hraje významnou roli při aktivaci proteinů rodiny STAT, které mají významný vliv na proliferaci buněk. Jejich aktivace může být projevem rezistence nádorových buněk na léčbu inhibitory, kde duální inhibitor FLT3 a JAK2 může být vhodným řešením. V klinických studiích se pacritinib ukázal jako vhodný lék AML (Verstosek a kol., 2016). Byl oceněn pro svou bezpečnost a farmakologickou aktivitu. Inhibiční koncentrace (IC_{50}) JAK2 byla stanovena na 22 nM, zatímco pro další kinázy rodiny JAK byla násobně vyšší (1280 nM pro JAK1 a 520 nM pro JAK3) (Wang a kol., 2021). V roce 2019 byla publikována studie, která přináší další potenciální inhibitor založený na bázi inhibice FLT3 a JAK2 (Li a kol., 2019). Jedná se o sloučeninu, jenž je derivátem 4-piperazinyl-2-aminopyrimidinu a byla pracovně nazvána 14j (Obr. 7). Dle této studie je její inhibiční aktivita IC_{50} 27 nM pro JAK2 a 30 nM pro FLT3.

Mezi významné duální inhibitory patří také E6201 (Obr. 6), který je zaměřen na inhibici FLT3 a MEK (Yuan a kol., 2019). Proteiny MEK jsou součástí klíčové signální dráhy MAPK/ERK, na jejímž konci je aktivovaný ERK, který zásadně ovlivňuje buněčnou proliferaci, apoptózu a další faktory důležité při nádorovém bujení. Využití alternativní aktivace MAPK/ERK signální dráhy je typicky způsobeno primární rezistencí na základě mikroprostředí kostní dřeně. Studie prokázaly, že synergické potlačení FLT3 a MEK působí antileukemicky (Zhang a kol., 2014). Při testech E6201 byly oceněny především jeho účinky podporující apoptózu, a to jak v buňkách s mutací FLT3-ITD, tak v buňkách rezistentních proti inhibitorům (Zhang a kol., 2016). Pozoruhodné je, že E6201 nepodporoval apoptózu u normálních myeloidních buněk. Studie Zhang a kol. (2016) poukázala na další výhodu E6201, a to sice na jeho účinnost proti D835Y a D835G bodovým mutacím, proti kterým běžně inhibitory nepůsobí.



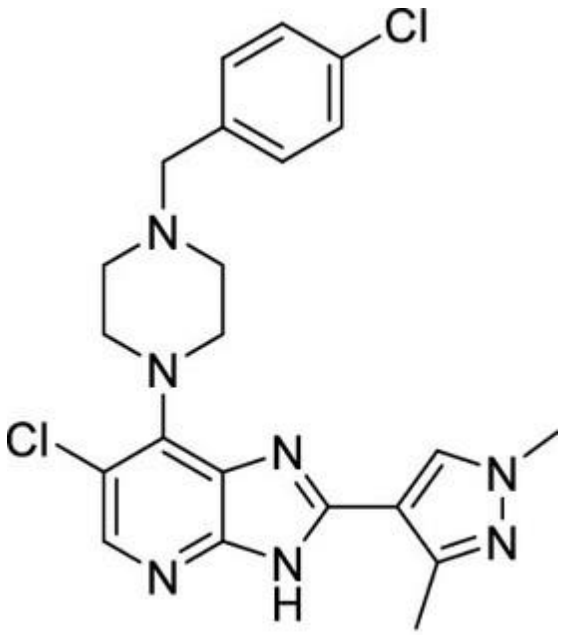
Obr. 6 – Chemické struktury vybraných duálních inhibitorů FLT3 (převzato a upraveno z (Yuan a kol., 2019).



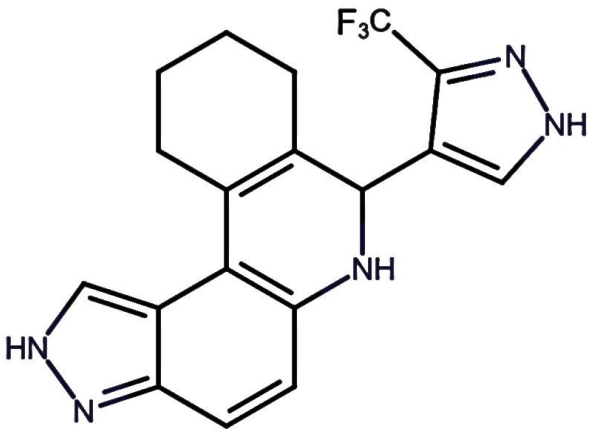
Obr. 7 – Chemická struktura inhibitoru 14j (převzato a upraveno z Li a kol., 2019).

Duálním inhibitorem, který se krom FLT3 zaměřuje také na Aurora kinázy, patřící do rodiny serin-threoninových proteinových kináz, je CCT241736 (Obr. 8). Aurora kinázy hrají důležitou roli v mitóze a zvýšená aktivita Aurory A a Aurory B je spojena se špatnou prognózou různých nádorů, včetně AML (Wang a kol. 2021). Byla pozorována jeho schopnost potlačit nádorové bujení, a to i přes tvorbu sekundárních mutací v kinázové doméně FLT3 nebo při zvýšené expresi FL. Studie také prokázaly,

že aktivita CCT241736 vedla k poklesu hladiny fosforylované formy STAT5 (Moore a kol., 2020).



Obr. 8 – Chemická struktura inhibitoru CCT241736 (převzato a upraveno z Wang a kol., 2021).



Obr. 9 – Chemická struktura látky HSD1169 (dle Dayal a kol., 2018).

V kontextu této práce je důležité zmínit látku HSD1169 (Obr. 9), od které jsou odvozeny látky použité v experimentální části této práce. Tato látka inhibuje krom FLT3 také TOPK (Dayal a kol., 2018). Protein TOPK je serin/threoninová kináza jejíž aktivita je spojená s aktivací lymfoidních buněk. Dřívější studie naznačovaly, že vyřazení genu kódujícího TOPK vedlo u buněk MV-4-11 akutní myeloidní leukemie ke snížení životaschopnosti a podpoře apoptózy (Alachkar a kol., 2015). Pozdější

studie však neprokázaly, že gen kódující TOPK patří mezi esenciální geny rakovinného bujení (Lin a kol., 2019). Nicméně látka HSD1169 v experimentech *in vitro* na buněčných liniích MV-4-11 a Molm-14 vykazovala velmi dobrou inhibiční schopnost vůči FLT3 (Dayal a kol., 2018). Po dvouhodinové inkubaci buněčné linie MV-4-11 s látkou HSD1169 o koncentraci 12,5 nM došlo k prokazatelnému snížení aktivity FLT3, a to skrze detekci snížení koncentrace fosforylované formy STAT5. Obdobně pozitivní výsledky byly v této studii pozorovány při analýze buněčného cyklu buněčné linie MV-4-11 průtokovým cytometrem po ovlivnění látkou HSD1169 o koncentraci 62,5 nM, kde byl již po 24 hodinách pozorován tzv. G1 blok, tedy významný nárust podílu buněk v G1 fázi.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- 2-merkaptoethanol (≥ 97%, Serva, Německo)
- akrylamid (VWR, USA)
- aprotinin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- buthanol (≥ 99%, Lach-Ner, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid, pro buněčné kultury (PanReac AppliChem, Německo)
- dithiotreitol (Roche, Německo)
- dodecylsíran sodný (≥ 98%, Lach-ner, ČR)
- ethanol 96% (Lach-ner, ČR)
- fenylmethansulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum (Biowest, Francie)
- fluorid sodný (≥ 98%, Lach-ner, ČR)
- glycin (≥ 99%, Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, ČR)
- chemiluminiscenční kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate a West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorid draselný (≥ 99%, Lachema, ČR)
- chlorid hořečnatý (hexahydrát, ≥ 98%, Lach-Ner, ČR)
- chlorid sodný (PENTA, Česká republika)
- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (≥ 98%, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (≥ 98,5% Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (≥ 97%, Sigma-Aldrich, USA)

- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner,ČR)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Lach-ner, ČR)
- leupeptin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin, pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, USA)
- marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Biowest, Francie)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (≥ 99%, Sigma-Aldrich, Čína)
- N,N'-methylenbisakrylamid (≥ 98%, Sigma-Aldrich, Čína)
- Nonidet P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin-streptomycin v 0,9% NaCl, pro buněčné kultury – 10 000 U/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxodisíran amonný (≥ 98%, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Ponceau S (SERVA, Německo)
- propidium jodid (≥ 98%, Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (≥ 99% Serva, Německo)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Roztoky

- Kultivační médium RPMI 1640 s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní dH_2O; doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 $U \cdot ml^{-1}$; streptomycin 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$; 2 $mmol \cdot l^{-1}$ L-glutamin
- Fosfátový pufr: 137 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 1,5 $mmol \cdot l^{-1}$ KH_2PO_4; 6,4 $mmol \cdot l^{-1}$ Na_2HPO_4; v dH_2O, pH = 7,4
- Lyzační pufr W: 10 $mmol \cdot l^{-1}$ HEPES; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 1,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 1 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA; 1 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; 0,5% (v/v) Nonidet NP40; v dH_2O, pH = 7,4. Před použitím přidáno: 2 $mmol \cdot l^{-1}$ NaF; 1 $mmol \cdot l^{-1}$ PMSF; 1 $mmol \cdot l^{-1}$ Na_2VO_3; 1 $mmol \cdot l^{-1}$ DTT; 2 $\mu g \cdot ml^{-1}$ aprotinin; 0,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ leupeptin; v dH_2O

- Vzorkovací pufr (5x): 0,3 mol·l^{-1} Tris pH = 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) glycerol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkaptoethanol
- Tris-HCl pH 6,8: 1 mol·l^{-1} Tris v dH_2O; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 6,8
- Tris-HCl pH 8,8: 1 mol·l^{-1} Tris v dH_2O; koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- Tris-pufr: 20 mmol·l^{-1} Tris; 137 mmol·l^{-1} NaCl; v dH_2O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,6
- Tris-pufr s Tweenem: k TBS přídavek 0,05% (v/v) TWEEN 20
- Tris-glycinový elektrodový pufr: 25 mmol·l^{-1} Tris; 192 mmol·l^{-1} glycin; 0,1% SDS (w/v); v dH_2O; pH = 8,3
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) H_3PO_4; v dH_2O
- Blotovací pufr: 25 mmol·l^{-1} Tris; 192 mmol·l^{-1} glycin; v dH_2O
- Roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v dH_2O

3.1.3 Biologický materiál

Buněčná linie MV-4-11, odvozená od akutní myeloidní leukemie (ATCC CRL-9591), pocházející z The American Type Culture Collection (ATCC, USA). Jedná se o buněčnou linii s interní tandemovou duplikací, která je závislá na FLT3.

3.1.4 Protilátky

Tab. 3 – Seznam použitých primárních protilátek s popisem cíle, zdrojem, výrobcem a ředěním.

Název cíle	Molekulární hmotnost (kDa)	Protilátka: kolon/zdroj	Výrobce	Ředění
FLT3	130, 160	8F2/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pFLT3 (Y589/Y591)	130, 160	30D4/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
ERK 1/2	42, 44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pERK 1/2 (T202/Y204)	42, 44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
STAT5	90	D2O6Y/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pSTAT5 (Y694)	90	C71E5/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
α-tubulin	50	DM1A/myší monoklonální	Merck (Německo)	1:500

Tab. 4 – Seznam použitých sekundárních protilátek s popisem, výrobcem a ředěním

Zkrácený název	Celý název	Popis	Výrobce	Ředění
SWAR	swine anti-rabbit Ig	HRP-konjugovaná prasečí Ig proti králičí Ig	Cell Signalling (USA)	1:1000
RAM	rabbit anti-mouse Ig	HRP-konjugovaná králičí Ig proti myší Ig	Cell Signalling (USA)	1:1000

3.1.5 Inhibitory

Studovanými sloučeninami (označené LGR kódem jako 6888, 7052, 7378 a 7385) byly deriváty 3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]chinolinu, které byly poskytnuty prof. Hermanem Sintimem z Purdue University, USA. Podobné sloučeniny byly pro svou schopnost inhibovat FLT3 kinázu studovány již dříve (Dayal a kol., 2018).

3.1.6 Přístrojové vybavení

Použité přístroje:

- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- centrifuga ROTINA 420/420 R (HETTICH, Německo)
- CO_2 inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN, Německo)
- laminární box OS-N (Merci, Česká republika)
- laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- minicentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- souprava pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Dále bylo použito spotřební laboratorní zboží:

- sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika)
- sterilní Petriho misky průměru 10 cm a 5 cm (TPP, Švýcarsko)
- mikrozkumavky 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Německo)

- nitrocelulosová membrána pro western blot (Bio-Rad, USA)
- Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)

Dále bylo použito běžné laboratorní vybavení: kádinky, skleněné tyčinky, odměrné válce, lžičky, váženky, špičky, zkumavky, střičky, stojany na zkumavky a mikrozkumavky, skalpely, pinzety apod.

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány ve sterilních Petriho miskách o průměru 100 mm, v inkubátorech při teplotě 37 ºC, 100% vlhkosti vzduchu a v atmosféře s 5% oxidem uhličitým. Pro buněčnou linii MV-4-11 bylo použito ke kultivaci médium RPMI 1640 s 10% FS.

Buněčné linie byly pravidelně pasážovány, a to minimálně jednou za tři dny. Použitá buněčná linie patřily mezi hematologické nádorové buňky, jednalo se tedy o buňky suspenzní. Pasážování probíhalo v laminárním boxu ve sterilním prostředí. Suspenze buněk byla přenesena do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut při 1000 rpm za laboratorní teploty. Supernatant byl odstraněn a pelet buněk byl v centrifugační zkumavce rozsuspendován v čerstvém médiu o požadovaném objemu, který byl určen na základě počtu buněk, respektive velikosti peletu. Z této suspenze byl přenesen určitý objem do nové sterilní Petriho misky a v případě potřeby doplněn čerstvým médiem na objem 10 ml. Objem suspenze záležel na potřebném množství buněk pro experimenty.

3.2.2 Příprava a ovlivnění buněk pro imunodetekci

Po inkubaci byla každá Petriho miska vždy zkontrolována pod mikroskopem, kde se sledoval počet a morfologie buněk. V laminárním boxu byly buněčné linie přeneseny do sterilní centrifugační zkumavky, která byla centrifugována 5 minut při laboratorní teplotě při 1000 rpm. Supernatant byl poté odsán a odstraněn. Do zkumavky s peletem bylo přidáno přesné množství čerstvého média. Objem média byl určen na základě požadavků experimentu a počtu buněk v původních koloniích v Petriho miskách. Buňky byly v čerstvém médiu rozsuspendovány. Ze vzniklé suspenze buněk bylo sterilně odebráno 15 µl a napipetováno do Bürkerovy komůrky. Byl určen počet buněk

v 1 ml a v celé suspenzi. Suspenze byla poté naředěna čerstvým médiem do požadovaného objemu o požadované koncentraci buněk. Do Sterilních Petriho misek o průměru 100 mm bylo napipetováno 10 ml suspenze. Pro experiment byla použita koncentrace 3 500 000 buněk na 10 ml. Takto připravené buněčné linie byly přemístěny do inkubátoru.

Inhibiční látky byly naředěny v DMSO na požadované koncentrace. Jednalo se konkrétně o 4nM, 20nM, 100nM a 500nM roztoky inhibitorů v DMSO. Buněčné linie v Petriho miskách byly následně ovlivněny 10 µl roztoku inhibitoru o dané koncentraci ve sterilním prostředí. Při ovlivnění bylo dbáno na rovnoměrné rozložení látky v suspenzi buněk. Takto ovlivněné buněčné linie byly následně přemístěny do inkubátoru, kde se kultivovaly po přesně určenou dobu.

3.2.3 Sklízení a lýze buněk

Po uplynutí požadované doby ovlivnění byly suspenze buněk přeneseny do zkumavek a centrifugovány 8 minut při 4 ºC a 1000 g. K důkladnému přenesení buněk byly Petriho misky promyty 2 ml PBS. Supernatant byl odstraněn, pelety byly promyty a rozsuspendovány ve 2 ml PBS a opět centrifugováno za stejných podmínek. Po odsání PBS byl pelet rozsuspendován ve 2 ml PBS a suspenze byla přenesena do mikrozkumavek, které byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Poté bylo PBS odstraněno a mikrozkumavky s peletem buněk uskladněny při -80 ºC.

Lyze buněk byla prováděna na ledu. Byl připraven chlazený lyzační pufr W o objemu 100-200 µl pro jeden vzorek, kdy objem závisel na množství peletu buněk. Pufr o daném objemu byl přidán do mikrozkumavek a pelet rozsuspendován. Následujících 30 minut byl každý vzorek pravidelně rozsuspendován, minimálně třikrát. Po důkladném rozsuspendování byly mikrozkumavky centrifugovány 30 minut při 4 ºC a 14 000 g. Po centrifugaci byl supernatant přenesen do nových mikrozkumavek, přesný objem supernatantu byl zaznamenán.

K určení koncentrace proteinů v odebraném supernatantu byla použita Bradfordova metoda (Bradford, 1976). Do zkumavek s 1 ml Bradfordova činidla byl napipetován 1 µl vzorku. Roztok byl promíchán na vortexu a nechal se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Pomocí spektrofotometru byla změřena absorbance při 595 nm. Každý vzorek byl měřen dvakrát a hodnota koncentrace zprůměrována. Následně byly vzorky naředěny lyzačním pufrem W k dosažení nejnižší určené koncentrace u všech lyzátů. Poté byl ke vzorkům přidán denaturační vzorkovací pufr

(5x). Objem denaturačního pufru odpovídal ¼ objemu vzorku. Mikrozkumavky byly promíchány na vortexu a 5 minut zahřívány v termobloku na 95 ºC. Vzorky byly uloženy ve -20 ºC.

3.2.4 Polyakrylamidová elektroforéza a Western blot

Separace proteinů ve vzorcích proběhla pomocí SDS-PAGE polyakrylamidové diskontinuální elektroforézy dle Laemmliho (1970). Použité gely byly o tloušťce 1 mm. Byla použita kombinace separačního gelu (10%) a zaostřovacího gelu (5%). Gely byly připraveny z roztoků dle tab. 5.

Tab. 5 – Složení roztoků na přípravu dvou 1 mm silných gelů

Složka	Separační gel (10%)	Zaostřovací gel (5%)
AA/BIS	3,13 ml	0,84 ml
Destilovaná voda	2,67 ml	3,51 ml
Tris pH 8,8	3,50 ml	-
Tris pH 6,8	-	0,63 ml
SDS (10%)	94,00 µl	50,00 µl
TEMED	6,25 µl	5,00 µl
APS (10%)	37,50 µl	30,00 µl

Do zkumavek byly přidány všechny složky roztoku na přípravu separačního gelu krom APS, který byl přidán jako poslední k zahájení polymerace. Po přidání poslední složky byla směs okamžitě napipetována mezi skleněné desky určeny k elektroforéze. Roztok byl napipetován cca 4 cm pod okraj skleněné desky. Následně došlo k převrstvení roztoku mezi skly pár kapkami buthanolu k zarovnání gelu a vypuzení vzduchových bublin. Takto připravená směs se nechala cca 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn buthanol a gel byl propláchnut destilovanou vodou. Ve zkumavce byl poté připraven roztok pro zaostřovací gel, opět i zde byl APS přidán jako poslední a ihned po jeho přidání došlo k napipetování roztoku na ztuhlý separační gel až po okraj skelněných desek. Nakonec byl mezi skla zasunut plastový hřeben, který vytvořil jednotlivé komory pro vzorky. Takto přenesený roztok zaostřovacího gelu byl inkubován po dobu cca 30 minut za

laboratorní teploty. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byly skleněné desky s gelem vloženy do elektroforetické komory.

Elektroforetické komory byly vloženy do elektroforetické vany a z gelů byl odstraněn plastový hřeben. Do komor i vany byl nalit Tris-glycinový elektrodový pufr. Mezitím byly vzorky proteinů vyjmuty z mrazu a ponechány v laboratorní teplotě k rozmražení. Poté byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu cca 2 minut. Do vzniklých jamek v zaostřovacím gelu byl nanesen objem vzorků, který odpovídal 50 µg celkových proteinů. Do jedné z jamek byl nanesen marker molekulových hmotností o objemu 3 µl. Vana byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí. Nejprve elektroforéza probíhala při napětí 80 V, po přechodu vzorků ze zaostřovacího gelu do gelu separačního bylo napětí navýšeno na 120 V. Po dostatečném separování jednotlivých proteinů byla elektroforetická sestava odpojena od napětí a skleněné desky s gely vyjmuty.

Skleněné desky byly rozpojeny a byl odstraněn zaostřovací gel. Do připravené vany s blotovacím pufrem byly umístěna blotovací souprava. Gel byl spolu s nitrocelulosovou membránou vložen mezi dvě dvojice filtračním papíru v blotovací soupravě. Blotovací souprava s gelem a membránou byla přenesena do blotovací komory v blotovací vaně. Do vany byl nalit blotovací pufr po rysku. Do vany byla také umístěna nádoba s ledem a elektromagnetické míchátko. Nádoba byla uzavřena víkem, přemístěna na elektromagnetickou míchačku a zapojena do zdroje napětí, čímž probíhal přenos proteinů metodou Western blot. Hodnota proudu byla nastavena na 270 mA. Celkový proces trval 3 hodiny, během této doby byl pufr stále chlazen ledem.

Poté byla souprava odpojena od zdroje napětí a nitrocelulosová membrána byla přenesena do roztoku Ponceau S na dobu 5 minut, což zajistilo vizualizaci proteinů. Membrána byla poté promyta v destilované vodě a vysušena na čistém filtračním papíru za laboratorní teploty.

3.2.5 Imunodetekce proteinů

Z nitrocelulosové membrány byly, na základě makru molekulové hmotnosti a pomocí skalpelu, vyřezány části, které odpovídaly hmotnostem požadovaných proteinů, které bylo v úmyslu detekovat. Vyřezané části byly pro vlastní potřebu označeny a přeneseny do 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Takto byly membrány tzv. blokovány vůči nespecifické vazbě protilátek po dobu 1 hodiny na kývačce.

Membrány byly postupně vysušeny na filtračním papíře a přeneseny na plastovou podložku potaženou parafilmem, která byla umístěna do vany s malou vrstvou destilované vody. Na membrány byl nanesen roztok primární protilátky naředěny ve 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Typ primární protilátky závisel na detekovaném proteinu. Vana s membránami byla přikryta víkem a umístěna do 4 °C k inkubaci přes noc. Po inkubaci byly membrány promývány na kývačce. Nejprve 5 minut v TBS, poté 5 minut v TBS-T, poté 5 minut v TBS a nakonec 10 minut v TBS. Během každého kroku byl roztok vyměněn za nový. Membrány byly poté opět přeneseny na plastovou podložku s parafilmem ve vaně s trochou destilované vody. Poté byl na ně nanesen roztok sekundární protilátky naředěný ve 2-5% roztoku BSA nebo sušeného mléka v TBS-T. Sekundární protilátka byla vybrána na základě specifičnosti k protilátce primární. Následně byla vana uzavřena víkem a membrány se inkubovaly po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Po inkubaci byly membrány promývány na kývačce k odstranění nespecificky navázaných protilátek. Nejprve 10 minut v TBS, poté 5 minut v TBS-T, následně 5 minut v TBS a nakonec 10 minut v TBS. Během každého kroku byl roztok vyměněn za nový.

Membrány byly poté vysušeny na filtračním papíru a přeneseny na suchou plastovou podložku s parafilmem a převrstveny chemiluminiscenčním roztokem West Pico, jenž má detekční limit okolo 1 pg. Takto byly membrány inkubovány 5 minut a následně byla podložka s membránami přesunuta do detekčního systému, kde byl zaznamenán chemiluminiscenční signál v podobě fotografie. V případě, že signál nebyl dostatečně silný, byly membrány promyty 5 minut v TBS a následně byl na ně nanesen chemiluminiscenční roztok West Femto, který má detekční limit v rámci desítek fg. Získaný záznam byl zpracován v programu Multi Gauge 2.2 (Fujifilm, Japonsko).

3.2.6 Analýza buněčného cyklus průtokovým cytometrem

Buněčné linie byly pro cytometrickou analýzu připraveny obdobným způsobem jako pro imunodetekci. Pro cytometrickou analýzu byly používány Petriho misky o průměru 50 mm s objemem 5 ml. Pro tento experiment byla použita koncentrace 1 500 000 buněk na 5 ml. Takto připravené buňky byly umístěny do inkubátoru.

Buňky byly následně ovlivněny 10 µl roztoku inhibitoru v DMSO. Použité koncentrace byly stejné, jako v případě imunodetekce. Jednalo se tedy o 4nM, 20nM,

100nM a 500nM roztoky. Po ovlivnění byly buňky přemístěny na přesně určenou dobu do inkubátoru.

Poté byly buňky sklizeny do centrifugačních zkumavek na ledu. K opláchnutí misky byl použit 1 ml PBS, který byl rovněž přidán do zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Poté bylo PBS odsáno a pelet rozsuspendován v čerstvém 1 ml PBS. Postup centrifugace a promývání PBS byl zopakován. Nakonec byl pelet rozsuspendován ve 100 µl PBS a fixován 1 ml 70% ethanolu. Fixace byla provedena prostupný přikapáváním ethanolu za soustavného jemného míchání na vortexu. Vzorky byly takto uchovány při -20 °C nejméně 1 den.

Po uplynutí nejméně 24 hodiny byly vzorky na ledu důkladně promíchány a centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C. Supernatant byl po centrifugaci odsán a byl přidán 1 ml PBS k rozsuspendování buněk. Suspenze byla ponechána na ledu ke krátké inkubaci (cca 5 minut). Po inkubaci byla suspenze opět centrifugována za stejných podmínek, supernatant byl poté odsán a pelet rozsuspendován ve 600 µl PBS. Poté byl přidán roztok propidium jodidu v PBS do dosažení koncentrace 0,1 mg/ml. Vzorky byly poté inkubovány ve tmě po dobu 30 minut za pokojové teploty a za pravidelného promíchávání.

Samotná analýza byla provedena na průtokovém cytometru. Pro dosažení analýzy obsahu jaderné DNA, a s tím spojené rozdělení buněk dle zastoupení v různých fázích buněčného cyklu, byl využit excitační laser o vlnové délce 488 nm. Měření bylo prováděno dvakrát pro každý vzorek. Výsledky, histogramy, byly analyzovány softwarem ModFit LT 5.0 (Verity Software house, USA). Průměrné hodnoty byly poté zpracovány ve formě grafu, který značil procentuální zastoupení buněk v různých fázích buněčného cyklu. Zvlášť byl v grafu zaznamenán podíl fragmentů buněk označený jako „debris“.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část práce byla prováděna v Laboratoři růstových regulátorů na Univerzitě Palackého v Olomouci v rámci dlouhodobého zkoumání potenciálních inhibitorů kináz. Laboratoř se věnuje studii selektivity a celkové účinnosti inhibitorů FLT3, ale i jiných kináz, jako například CDK (Jorda a kol., 2020). Krom studiu selektivity se laboratoř věnuje také vývoji nových látek (Gucký a kol., 2018). Díky této skutečnosti disponuje laboratoř širokou knihovnou inhibitorů.

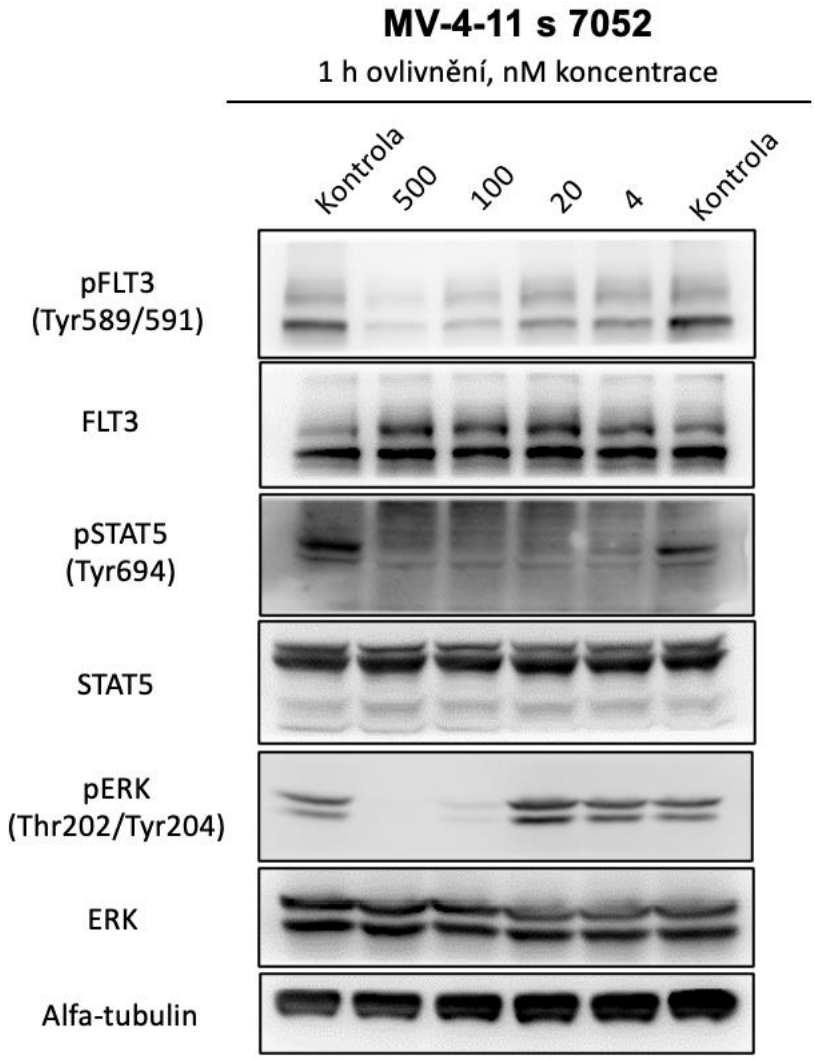
Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium inhibiční aktivity čtyř látek proti FLT3 v buněčné linii MV-4-11 akutní myeloidní leukemie. Na základě imunodetekce FLT3 a vybraných proteinů (a jejich fosforylovaných forem), jejichž signální dráha souvisí s FLT3 (viz kapitola 2.4), se určovala selektivita a účinnost vybraných látek (viz kapitola 3.1.5, Tab. 4). K podrobnější analýze na průtokovém cytometru byla vybrána buněčná linie MV-4-11 akutní myeloidní leukemie, která byla ovlivněna jednou z inhibičních látek. Tato linie je závislá na FLT3 a vyskytuje se u ní interní tandemová duplikace tohoto receptoru.

4.1 Imunodetekce vybraných proteinů po ošetření buněčné linie látkou 7052

V tomto experimentu byly detekovány FLT3, pFLT3, STAT5, pSTAT5, ERK, pERK a alfa-tubulin, který byl detekován pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorků. Seznam použitých protilátek je uveden v kapitole 3.1.4 v Tab. 3 a 4.

Výsledky imunodetekce proteinů po ovlivnění buněčné linie MV-4-11 látkou 7052 jsou znázorněny na Obr. 10. Sytost a rovnoměrnost signálu alfa-tubulinu značí rovnoměrné nanesení vzorků. U látky 7052 byla prokázána její inhibiční aktivita proti FLT3 a zároveň bylo prokázáno, že nepotlačuje expresi této kinázy. Signál aktivované, respektive fosforylované formy slábne s rostoucí koncentrací látky, a to už od nejnižší koncentrace 4 nmol/l. U proteinů, jejichž aktivace souvisí s aktivací FLT3, byla pozorována snižující se koncentrace aktivních fosforylovaných forem se zvyšující se koncentrací testované látky. Signál pERK se začal rapidně snižovat při koncentraci inhibitoru 100 nmol/l, a při 500 nmol/l byl signál takřka nedetekovatelný. Z výsledků je patrné, že po ovlivnění testovanou látkou došlo ke snížení koncentrace pSTAT5. Koncentrace nefosforylovaných forem obou proteinů zůstaly neměnné.

Na základě výsledků imunodetekce byla zhodnocena inhibiční aktivita látky 7052. Vzhledem k poklesu koncentrace fosforylovaných forem FLT3, ale i proteinů, které jsou součástí signálních drah spřažených s FLT3, může být látka 7052 považována za inhibitor FLT3.



Obr. 10 – Imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie MV-4-11 ovlivněné látkou 7052. Alfa-tubulin je kontrolou stejnoměrného nanesení vzorků.

Vědecká skupina prof. Sintima (Dayal a kol., 2018) studovala látku HSD1169, která je podobná látkám studovaných v experimentální části této práce. Pro analýzu inhibiční aktivity vůči FLT3 si tato studie vybrala pSTAT5 a celkový STAT5. Po dvouhodinovém inkubaci buněčné linie MV-4-11 s látkou HSD1169 došlo k prokazatelnému snížení koncentrace pSTAT5, a to již při koncentraci 12,5 nM. Koncentrace STAT5 zůstala neměnná. U látky 7052, testované v rámci této bakalářské práce, byla inhibiční aktivita, prokázána poklesem koncentrace pSTAT5,

pozorovatelná od 20 nM. Lze tedy konstatovat, že obě látky mají velmi podobné inhibiční vlastnosti vůči FLT3, a to skrze pokles koncentrace fosforylované formy STAT5.

Látka 7052 vykazovala obdobné vlastnosti, jako již dříve studovaný quizartinib, inhibitor druhé generace. Skupina Patricka P. Zarrinkara studovala vliv quizartinibu na buněčnou linii MV-4-11 a zaměřila se, mimo jiné, také na imunodetekci fosforylované formy FLT3 (Zarrinkar a kol., 2009). Z výsledků jejich studie je patrné, že po hodinové inkubaci buněk v prostředí s quizartinibem bylo možné pozorovat citelný pokles koncentrace fosforylované formy FLT3, a to již při koncentraci 2 nM. V experimentální části této práce byl také prokázán pokles koncentrace fosforylované formy FLT3 u buněčné linie MV-4-11 při ošetření látkou 7052 a po hodinové inkubaci, a to již od koncentrace 4 nM. Skrze fosforylované formy proteinů, jejichž aktivace je spjata s FLT3 (např. ERK), bylo patrné, že inhibiční aktivita látky 7052 je v rozmezí 20 a 100 nM. V porovnání s quizartinibem byla tedy u látky 7052 také pozorována inhibiční aktivita vůči FLT3, ovšem až při vyšších koncentracích, tedy mezi 20 a 100 nM.

Z důvodu velkého inhibičního potenciálu látky 7052 vůči FLT3 se doporučuje provést další analýzy. Obdobně jako ve studii prof. Sintima je možné provést kvantifikaci mRNA vybraných proteinů pomocí metody PCR (Dayal a kol., 2018). Také je možné studovat aktivitu vůči FLT3, FLT3-ITD a FLT3 s bodovou mutací D835Y na základě rostoucí koncentrace inhibitoru pomocí kinázové inhibiční reakce s rekombinantními proteiny. Dále je možné rozšířit výběr detekovaných proteinů, například o retinoblastomový protein, jehož gen patří mezi tumor supresorové geny a samotný protein se váže na klíčový transkripční faktor E2F, čímž zadržuje buňku v G0 bodě buněčného cyklu. Jedná se tak o klíčový antiproliferační faktor, jehož funkce bývá u většiny nádorů, včetně AML, narušena. Také je možné sledovat vliv studované látky na apoptózu prostřednictvím detekce známých proteinů zahrnutých v tomto procesu, jako je například protein PARP. Látka HSD1169 je označována jako duální inhibitor FLT3/TOPK, ovšem detekce proteinu TOPK se nedoporučuje, jelikož studie neprokázaly, že gen kódující TOPK patří mezi esenciální geny rakovinného bujení (Lin a kol., 2019).

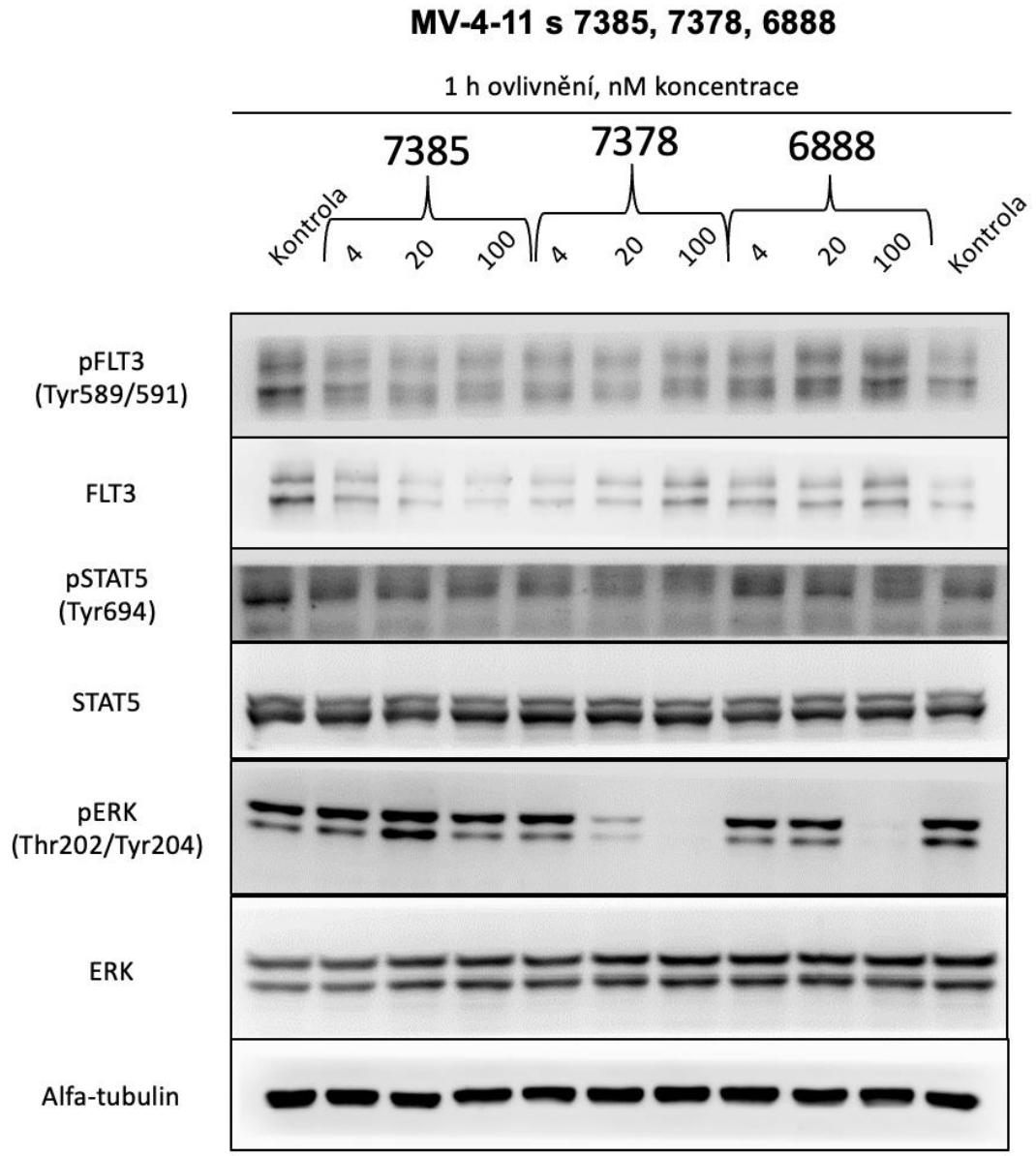
4.2 Imunodetekce vybraných proteinů po ošetření buněčné linie látkami 6888, 7378, 7385

Cílem imunodetekce byly proteiny FLT3, pFLT3, ERK, pERK, STAT5 a pSTAT5. Seznam použitých protilátek je uveden v kapitole 3.1.4 v Tab. 3 a 4.

Výsledky imunodetekce proteinů po ovlivnění buněčné linie MV-4-11 látkami 6888, 7378 a 7385 jsou znázorněny na Obr. 11. U látky 6888 byla pozorovatelný úbytek koncentrace fosforylované formy ERK, a to při 100 nmol/l. U pSTAT5 byla také pozorovatelná nižší koncentrace u nejvyšší použité koncentrace inhibitoru. Tento fakt odpovídá předpokladům, jelikož se jedná o látku strukturně podobnou látce HSD1169, která vykazovala inhibiční aktivitu vůči FLT3 skrze pokles koncentrace pSTAT5 (Dayal a kol., 2018). Nefosforylované formy ERK a STAT5, stejně jako FLT3, byly dle předpokladu koncentračně stále. U koncentrace pFLT3 nebyla pozorována žádná prokazatelná změna. Tyto výsledky prokazují inhibiční aktivitu látky 6888 na aktivaci ERK a STAT5, ovšem neprokazují inhibiční aktivitu vůči FLT3. Buďto došlo k nesprávné detekci fosforylované formy proteinu FLT3, nebo tento inhibitor pracuje na jiném mechanismus inhibice pERK a pSTAT5 než skrze FLT3. Tuto skutečnost je možné prověřit dalším výzkumem.

Látka 7378 měla dle imunodetekce podobný charakter účinku jako látka 6888. Dle Obr. 11 je možné usoudit, že má prokazatelnou inhibiční aktivitu vůči fosforylaci ERK, jelikož koncentrace pERK klesala již při použití 20 nmol/l látky 7378. Z důvodu nutnosti použití citlivějšího chemiluminiscenčního roztoku je méně patrné, zdali došlo ke změně koncentrace také u pSTAT5. Pokles koncentrace pSTAT5 je však předpokládán, jelikož je látka strukturně podobná látce HSD1169, která dle studií vykazuje inhibiční aktivitu vůči FLT3 a s ní pokles koncentrace pSTAT5 (Dayal a kol., 2018). Ovšem pro jasné určení je doporučeno provést experiment znovu. Obdobně jako v případě látky 6888 nebyl pozorován pokles koncentrace ERK, STAT5, FLT3 ani pFLT3, což opět poukazuje na chybu při detekci, nebo odlišný mechanismus účinku látky, tedy inhibici pSTAT5 a pERK přímo, nebo skrze jinou signální dráhu než skrze FLT3.

Konečně u látky 7385 nebyla pozorován žádná inhibiční aktivita. Koncentrace nefosforylovaných forem byly nezávislé na koncentraci látky a byly neměnné. Stejně tak koncentrace pFLT3, pSTAT5 a pERK. Látka je tedy nevhodná k použití jakožto inhibitor FLT3 při daných koncentracích a době ovlivnění.



Obr. 11 – Imunodetekce vybraných proteinů buněčné linie MV-4-11 ovlivněné látkami 6888, 7378 a 7385. Alfa-tubulin je kontrolou stejnoměrného nanesení vzorků.

Na základě výsledků tohoto experimentu lze usoudit, že látka 7385 nemá dostatečnou inhibiční aktivitu při zkoumaných koncentracích a době ovlivnění, jelikož nedošlo ke změně koncentrace fosforylovaných forem zkoumaných proteinů. Naopak látky 6888 a 7378 vykazovaly velmi podobné výsledky, kdy při koncentraci 100 nmol/l prokazatelně snižovali koncentrace pSTAT5 a pERK. Bohužel se nepodařilo prokázat jejich inhibiční aktivitu vůči samotnému receptoru FLT3. Nicméně se předpokládá jejich obdobná inhibiční aktivita jako u látky 7052, respektive HSD1169.

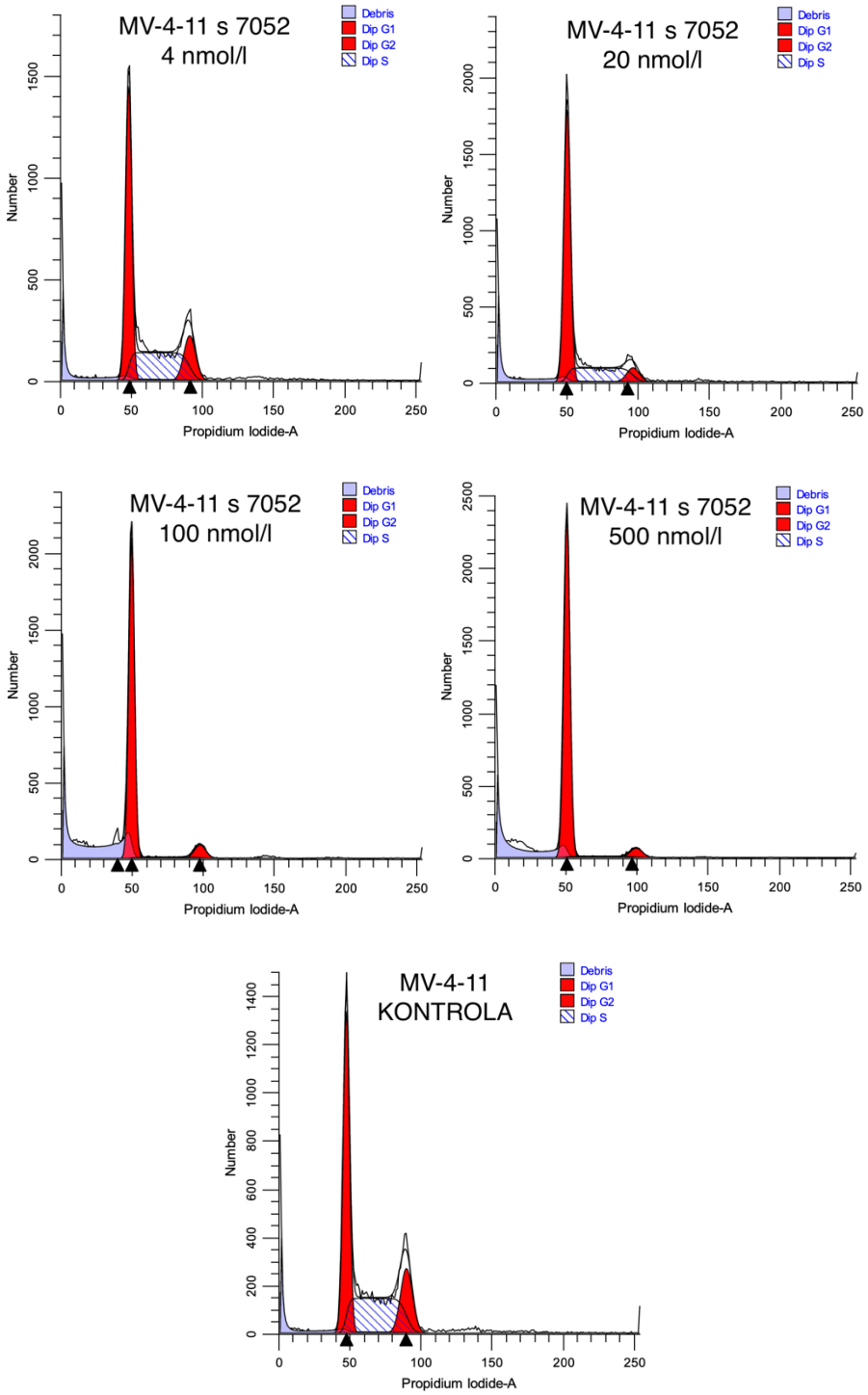
Stejně jako u látky 7052, se u látek 6888 a 7378 doporučuje další analýzy. Jedná se zopakování experimentu pro průkaznější výsledky, kvantifikace mRNA vybraných proteinů pomocí PCR, rozšíření výběru detekovaných proteinů, studium aktivity FLT3, FLT3-ITD a FLT3 s bodovou mutací D835Y v závislosti na koncentraci inhibitorů, popřípadě sledování životaschopnosti buněk v prostředí inhibitorů po delší časový úsek.

4.3 Analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem po ošetření buněčné linie látkou 7052

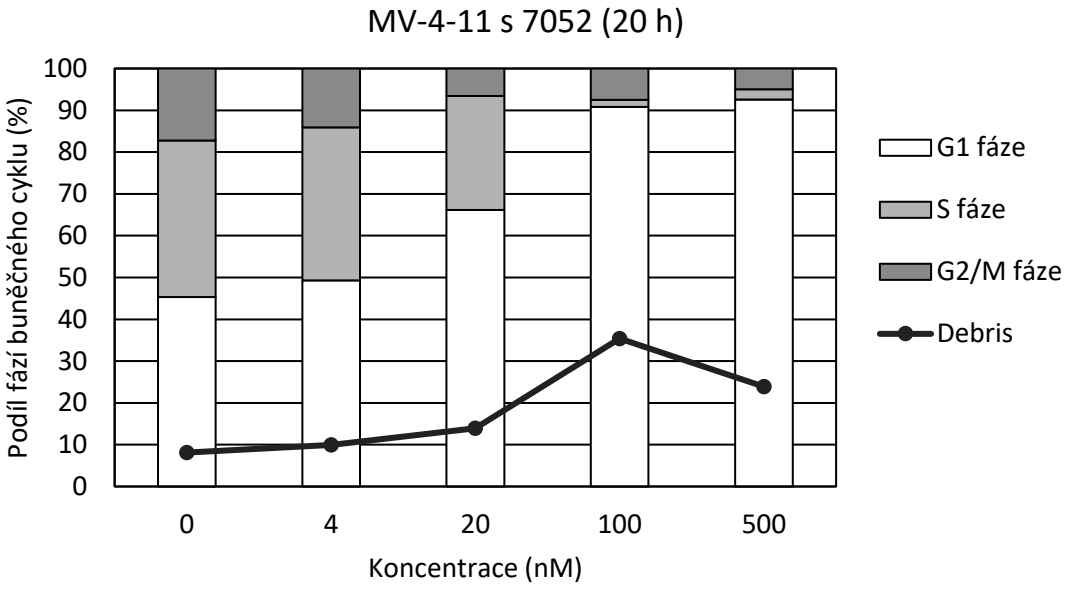
Z důvodu pozitivních výsledků inhibiční aktivity látky 7052 získaných imunodetekcí, byla tato látka aplikována také na buněčnou linii MV-4-11 určenou k analýze buněčného cyklu průtokovým cytometrem. Z důvodu klíčové role FLT3 během buněčného cyklu je zjištění poměrného zastoupení buněk v jednotlivých fázích cenným ukazatelem míry účinku látky 7052 na inhibici FLT3.

Výsledné histogramy jsou zobrazeny na Obr. 12. Souhrnný graf, zobrazující podíl fází buněčného cyklu u jednotlivých buněčných linií je zobrazen na Obr. 13. Z grafů je patrné, že látka 7052 zásadně ovlivňuje podíl fází buněčného cyklu. Látka při koncentraci 4 nmol/l nijak zásadně poměr nemění a zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu je obdobné jako u vzorku kontroly. Od koncentrace 20 nmol/l je patrný pokles počtu buněk v S a G2/M fázi a růst počtu buněk v G1 fázi. Při koncentraci 100 nmol/l a 500 nmol/l vzrůstá i podíl buněčných fragmentů, což značí úmrtí buněk, apoptózu.

Výsledky průtokové cytometrie jsou v souladu s výsledky imunodetekce klíčových proteinů u buněčných linií ošetřenými látkou 7052. V kapitole 4.1 byla prokázána inhibiční aktivita látky 7052 vůči FLT3. Tato receptorová kináza je spojena s klíčovými signálními drahami, které ovlivňují buněčný cyklus a přechod buňky skrze G1/S kontrolní bod (viz kapitola 2.4). Mimo tyto signální dráhy je mutace FLT3, konkrétně FLT3-ITD, spojena se zvýšenou expresí CDK6, na které jsou leukemické buňky závislé, a což je kináza spoluzodpovědná za přechod buňky skrze kontrolní bod G1/S, tedy spoluzodpovědná za přechod buňky z G1 fáze. Inhibice FLT3-ITD, tedy snížení exprese CDK6 a zastavení klíčových signálních drah, způsobí tzv. G1 blok. Z tohoto důvodu je velmi patrný pokles počtu buněk v S, respektive G2/M fázi buněčného cyklu.



Obr. 12 – Histogramy buněčné linie MV-4-11, ošetřené látkou 7052 o daných koncentracích (včetně kontroly) a analyzované průtokovým cytometrem dle softwaru ModFit LT 5.0 (Verity Software house, USA). Grafy znázorňují počet buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. První červený peak zleva znázorňuje počet buněk v G1 fázi, druhý červený peak značí počet buněk v G2/M fázi, šrafovaná část mezi peaky znázorňuje buňky v S fázi. Šedá část, před G1 peakem, označuje fragmenty buněk, tzv. debris.



Obr. 13 – Graf znázorňující jednotlivé buněčné linie MV-4-11 ošetřené látkou 7052 po dobu 20 hodin. Jednotlivé linie jsou rozděleny dle koncentrací včetně kontroly, která je v grafu označená jako koncentrace „0“. Jednotlivé fáze buněčného cyklu jsou znázorněny barevně v rámci sloupce, buněčné fragmenty jsou znázorněny zvlášť formou spojnicového grafu.

Obdobné výsledky je možné pozorovat v dřívějších studiích. Studie prof. Sintima prokázala, že látka HSD1169 (označována jako duální inhibitor FLT3/TOPK), ze které látka 7052 vychází, způsobuje tzv. G1 blok, tedy významný nárust podílu buněk v G1 fázi (Dayal a kol., 2018). Použitá koncentrace pro látku HSD1169 v této studii byla 62,5 nM a buněčná linie MV-4-11 byla této látce vystavena po dobu 24, 48 a 72 hodin. Jasné výsledky bylo možné pozorovat již po 24 hodinách. V případě látky 7052 bylo možné pozorovat tuto skutečnost po 20 hodinách ošetření a koncentraci 100 nM, respektive koncentraci mezi 20 a 100 nM. Na základě obdobné koncentrace a inkubační doby nutné k pozorování zvýšeného podílu buněk v G1 fázi (tzv. G1 blok) lze usoudit, že látka 7052 vykazuje obdobnou účinnost jako látka HSD1169 i přes skutečnost, že látka 7052 neinhibuje protein TOPK.

5 ZÁVĚR

V posledních desetiletích se v léčbě akutní myeloidní leukemie udělal velký pokrok, a to především díky objevu inhibitorů receptorových kináz, převážně pak FLT3. I přes prvotní skeptické výsledky se dnes můžeme setkat například s léčbou inhibitorem první generace midostaurinem, a to v kombinaci s běžnou chemoterapií. V současnosti se intenzivně pracuje na klinických studiích nových, případně duálních inhibitorů, které by měly vyřešit problémy předešlých inhibitorů, a to jak s nižší selektivitou vůči FLT3, tak s mechanismem rezistence nádoru vůči inhibitorům.

V praktické části byly studovány čtyři látky s potenciální inhibiční aktivitou vůči FLT3 na buněčné linii MV-4-11 akutní myeloidní leukemie. Látky byly testovány ve třech, respektive čtyřech různých koncentracích a cílem byla následná imunodetekce nejen samotného proteinu FLT3, potažmo jeho fosforylované formy, ale také proteinů, jejichž aktivace úzce souvisí se signální drahou vedoucí od FLT3, tedy ERK a STAT5. Buněčný cyklus linie, ošetřené látkou 7052, byl následně analyzován na průtokovém cytometru.

Látka 7052 projevila vysoký potenciál jakožto inhibitor FLT3. Na základě imunodetekce vybraných proteinů byla prokázána snižující se koncentrace fosforylovaných forem FLT3, ERK i STAT5 vlivem zvyšující se koncentrace inhibitoru. Zároveň nebyla pozorována snižující se koncentrace nefosforylovaných forem. Touto látkou byly ošetřeny také buněčné linie, u nichž byla provedena analýza buněčného cyklu průtokovým cytometrem. Výsledky této analýzy byly v souladu s výsledky imunodetekce. U buněčných linií s vyšší koncentrací inhibitoru byl pozorován vyšší podíl buněk v G1 fázi na úkor podílu buněk v S a G2/M fázi. Tato skutečnost potvrzuje inhibici receptorové kinázy FLT3, která je spojena s faktory umožňující průchod buněk skrze G1/S kontrolní bod. Výsledky látky 7052 byly srovnatelné s výsledky z odborných studií, ve kterých byla použita látka HSD1169, ze které jsou odvozeny látky použité v experimentální části této práce.

Látky 6888, 7378 a 7385 prokázaly méně přesvědčivé výsledky. Látky 6888 a 7378 vykazovaly podobný charakter inhibice. Bylo prokázáno snížení koncentrace fosforylovaných forem ERK a STAT5 při použití vyšších koncentrací těchto dvou látek. Snížení koncentrace fosforylované formy FLT3 se však prokázat nepodařilo. Látka 7385 pak nevykazovala žádnou inhibiční aktivitu. Koncentrace všech proteinů,

včetně jejich fosforylovaných forem byly konstantní i při zvýšených koncentrací této látky.

Výsledky této práce jasně prokazují inhibiční potenciál látky 7052. Látky 6888 a 7378 je vhodné opakovaně a podrobněji studovat, neboť jejich výsledky jsou pozitivní, nikoli však průkazné. Doporučuje se například kvantifikace mRNA vybraných proteinů pomocí PCR, rozšíření výběru detekovaných proteinů, další studium aktivity FLT3, FLT3-ITD a FLT3 s bodovou mutací D835Y v závislosti na koncentraci inhibitorů, popřípadě sledování životaschopnosti buněk v prostředí inhibitorů po delší časový úsek. U látky 7385 nebyla pozorována žádná inhibiční aktivita a pro další studium není vhodná. Práce však jasně poukazuje na fakt, že inhibice FLT3 má klíčovou roli při léčbě akutní myeloidní leukemie.

LITERATURA

Adrain C., Freeman M. (2014): Regulation of receptor tyrosine kinase ligand processing. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6, a008995.

Alachkar H, Mutonga M, Malnassy G, Park JH, Fulton N, Woods A, Meng L, Kline J, Raca G, Odenike O, Takamatsu N, Miyamoto T, Matsuo Y, Stock W, Nakamura Y. T-LAK cell-originated protein kinase presents a novel therapeutic target in FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2015 Oct 20;6(32):33410-25.

Arber Daniel A., Orazi Attilio, Hasserjian Robert, Thiele Jürgen, Borowitz Michael J., Le Beau Michelle M., Bloomfield Clara D., Cazzola Mario, Vardiman James W. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 127, 2391-2405.

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, 248-54.

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.

Cai B., Cai J. P., Luo Y. L., Chen C., Zhang S. (2015): The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. Inflammation 38, 1599-1608.

Cancer Genome Atlas Research Network; Timothy J Ley, Christopher Miller, Li Ding, Benjamin J Raphael, Andrew J Mungall, A Gordon Robertson, Katherine Hoadley, Timothy J Triche Jr, Peter W Laird, Jack D Baty, Lucinda L Fulton, Robert Fulton, Sharon E Heath, Joelle Kalicki-Veizer, Cyriac Kandoth, Jeffery M Klco, Daniel C Koboldt, Krishna-Latha Kanchi, Shashikant Kulkarni, Tamara L Lamprecht, David E Larson, Ling Lin, Charles Lu, Michael D McLellan, Joshua F McMichael, Jacqueline Payton, Heather Schmidt, David H Spencer, Michael H Tomasson, John W Wallis, Lukas D Wartman, Mark A Watson, John Welch, Michael C Wendl, Adrian Ally, Miruna Balasundaram, Inanc Birol, Yaron Butterfield, Readman Chiu, Andy Chu, Eric Chuah, Hye-Jung Chun, Richard Corbett, Noreen Dhalla, Ranabir Guin, An He, Carrie Hirst, Martin Hirst, Robert A Holt, Steven Jones, Aly Karsan, Darlene Lee, Haiyan I Li, Marco A Marra, Michael Mayo, Richard A Moore, Karen Mungall, Jeremy Parker, Erin Pleasance, Patrick Plettner, Jacquie Schein, Dominik Stoll, Lucas Swanson, Angela Tam, Nina Thiessen, Richard Varhol, Natasja Wye, Yongjun Zhao, Stacey Gabriel, Gad Getz, Carrie Sougnez, Lihua Zou, Mark D M Leiserson, Fabio Vandin, Hsin-Ta Wu, Frederick Applebaum, Stephen B Baylin, Rehan Akbani, Bradley M Broom, Ken Chen, Thomas C Motter, Khanh Nguyen, John N Weinstein, Nianziang Zhang, Martin L Ferguson, Christopher Adams, Aaron Black, Jay Bowen, Julie Gastier-Foster, Thomas Grossman, Tara Lichtenberg, Lisa Wise, Tanja Davidsen, John A Demchok, Kenna R Mills Shaw, Margi Sheth, Heidi J Sofia, Liming Yang, James R Downing, Greg Eley (2013): Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The New England Journal of Medicine 368, 2059-2074.

Chang Y. T., Hernandez D., Alonso S., Gao M., Su M., Ghiaur G., Levis M. J., Jones R. J. (2019): Role of CYP3A4 in bone marrow microenvironment-mediated protection of FLT3/ITD AML from tyrosine kinase inhibitors. Blood Advances 3, 908-916.

Chen F., Ishikawa Y., Akashi A., Naoe T., Kiyoi H. (2016): Co-expression of wild-type FLT3 attenuates the inhibitory effect of FLT3 inhibitor on FLT3 mutated leukemia cells. Oncotarget 7, 47018-47032.

Chong H., Guan K. L. (2003): Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. Journal of Biological Chemistry 278, 36269-36276.

Ciau-Uitz A., Wang L., Patient R., Liu F. (2013): ETS transcription factors in hematopoietic stem cell development. Blood Cells, Molecules, and Diseases 51, 248-255.

Cortes J., Perl A. E., Döhner H., Kantarjian H., Martinelli G., Kovacsovics T., Rousselot P., Steffen B., Dombret H., Estey E., Strickland S., Altman J. K., Baldus C. D., Burnett A., Krämer A., Russell N., Shah

N. P., Smith C. C., Wang E. S., Ifrah N., Gammon G., Trone D., Lazzaretto D., Levis M. (2018): Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. The Lancet Oncology 19, 889-903.

Critchley W. R., Pellet-Many C., Ringham-Terry B., Harrison M. A., Zachary I. C., Ponnambalam S. (2018): Receptor Tyrosine Kinase Ubiquitination and De-Ubiquitination in Signal Transduction and Receptor Trafficking. Cells 7, 22.

Dayal N., Opoku-Temeng C., Hernandez D. E., Sooreshjani M. A., Carter-Cooper B. A., Lapidus R. G., Sintim H. O. (2018): Dual FLT3/TOPK inhibitor with activity against FLT3-ITD secondary mutations potently inhibits acute myeloid leukemia cell lines. Future Medicinal Chemistry 10, 823-835.

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.

DeAngelo D. J., Stone R. M., Heaney M. L., Nimer S. D., Paquette R. L., Klisovic R. B., Caligiuri M. A., Cooper M. R., Lecerf J. M., Karol M. D., Sheng S., Holford N., Curtin P. T., Druker B. J., Heinrich M. C. (2006): Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. Blood 108, 3674-3681.

Eidenschenk C., Crozat K., Krebs P., Arens R., Popkin D., Arnold C. N., Blasius A. L., Benedict C. A., Moresco E. M., Xia Y., Beutler B. (2010): Flt3 permits survival during infection by rendering dendritic cells competent to activate NK cells. Proc Natl Acad Sci USA 107, 9759-9764.

Esche C., Subbotin V. M., Maliszewski C., Lotze M. T., Shurin M.R. (1998): FLT3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. Cancer Res 58, 380-383.

Galanis A., Levis M. (2015): Inhibition of c-Kit by tyrosine kinase inhibitors. Haematologica 100, 77-79.

Gale R. E., Green C., Allen C., Mead A. J., Burnett A. K., Hills R. K., Linch D. C., Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party (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 111, 2776-2784.

Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V., Kryštof V. (2018): Discovery of N2-(4-Amino-cyclohexyl)-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. Journal of Medicinal Chemistry 61, 3855-3869.

Horiuchi K., Morioka H., Takaishi H., Akiyama H., Blobel C. P., Toyama Y. (2009): Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme. Journal of immunology 182, 7408-7414

Houles T., Roux P.P. (2018): Defining the role of the RSK isoforms in cancer. Seminars in Cancer Biology 48, 53-61.

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, 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, doi: 10.1186/1476-4598-12-19.

Kayser S., Schlenk R. F., Londono M. C., Breitenbuecher F., Wittke K., Du J., Groner S., Späth D., Krauter J.., Ganser A., Döhner H., Fischer T., Döhner K.,German-Austrian AML Study Group (AMLSG) (2009): Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood 114, 2386-2392.

Kazi J. U., Chougule R. A., Li T., Su X., Moharram S. A., Rupar K., Marhäll A., Gazi M., Sun J., Zhao H., Rönnstrand L. (2017): Tyrosine 842 in the activation loop is required for full transformation by the oncogenic mutant FLT3-ITD. Cellular and Molecular Life Sciences 74, 2679-2688.

Kazi J. U., Rönnstrand L. (2019): FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. Physiological Reviews 99, 1433-1466.

Kiyoi H., Ohno R., Ueda R., Saito H., Naoe T. (2002): Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. Oncogene 21, 2555-2563.

Kiyoi H. (2015): FLT3 INHIBITORS: RECENT ADVANCES AND PROBLEMS FOR CLINICAL APPLICATION. Nagoya Journal of Medical Science 77, 7-17.

Kiyoi H., Kawashima N., Ishikawa Y. (2020): FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. Cancer Science 111, 312-322.

Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Levis M., Brown P., Smith B. D., Stine A., Pham R., Stone R., Deangelo D., Galinsky I., Giles F., Estey E., Kantarjian H., Cohen P., Wang Y., Roesel J., Karp J. E., Small D. (2006): Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. Blood 108, 3477-3483.

Levis M., Ravandi F., Wang E. S., Baer M. R., Perl A., Coutre S., Erba H., Stuart R. K., Baccarani M., Cripe L. D., Tallman M. S., Meloni G., Godley L. A., Langston A. A., Amadori S., Lewis I. D., Nagler A., Stone R., Yee K., Advani A., Douer D., Wiktor-Jedrzejczak W., Juliusson G., Litzow M. R., Petersdorf S., Sanz M., Kantarjian H. M., Sato T., Tremmel L., Bensen-Kennedy D. M., Small D., Smith B. D. (2011): Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. Blood 117, 3294-3301.

Levis M. (2017): Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. Blood 129, 3403-3406.

Li Z., Wang X., Eksterowicz J., Gribble M. W. Jr., Alba G. Q., Ayres M., Carlson T. J., Chen A., Chen X., Cho R., Connors R. V., DeGraffenreid M., Deignan J. T., Duquette J., Fan P., Fisher B., Fu J., Huard J. N., Kaizerman J., Keegan K. S., Li C., Li K., Li Y., Liang L., Liu W., Lively S. E., Lo M. C., Ma J., McMinn D. L., Mihalic J. T., Modi K., Ngo R., Pattabiraman K., Piper D. E., Queva C., Ragains M. L., Suchomel J., Thibault S., Walker N., Wang X., Wang Z., Wanska M., Wehn P. M., Weidner M. F., Zhang A. J., Zhao X., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai K., McGee L. R., Medina J. C. (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, 3430-3449.

Li Y., Ye T., Xu L., Dong Y., Luo Y., Wang C., Han Y., Chen K., Qin M., Liu Y., Zhao Y. (2019): Discovery of 4-piperazinyl-2-aminopyrimidine derivatives as dual inhibitors of JAK2 and FLT3. European Journal of Medicinal Chemistry 181, 111590.

Lin A., Giuliano C. J., Palladino A., John K. M., Abramowicz C., Yuan M. L., Sausville E. L., Lukow D. A., Liu L., Chait A. R., Galluzzo Z. C., Tucker C., Sheltzer J. M. (2019): Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. Science Translational Medicine 11, eaaw8412.

Liu L., Cao Y., Chen C., Zhang X., McNabola A., Wilkie D., Wilhelm S., Lynch M., Carter C. (2006): Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. Cancer Research 66, 11851-11858.

Liu K., Victora G. D., Schwickert T. A., Guermonprez P., Meredith M. M., Yao K., Chu F. F., Randolph G. J., Rudensky A. Y., Nussenzweig M. (2009): In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. Science 324, 392-397.

Lopez S., Voisset E., Tisserand J. C., Mosca C., Prebet T., Santamaria D., Dubreuil P., De Sepulveda P. (2016): An essential pathway links FLT3-ITD, HCK and CDK6 in acute myeloid leukemia. Oncotarget 7, 51163-51173.

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.

Lyman S. D., Jacobsen S. E. (1998): c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. Blood 91, 1101-1134.

Mackarehtschian K., Hardin J. D., Moore K. A., Boast S., Goff S. P., Lemischka I. R. (1995): Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity 3, 147-161.

Matthews W., Jordan C. T., Wiegand G. W., Pardoll D., Lemischka I. R. (1991): A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell 65, 1143-1152.

McKenna H. J., Stocking K. L., Miller R. E., Brasel K., De Smedt T., Maraskovsky E., Maliszewski C. R., Lynch D. H., Smith J., Pulendran B., Roux E. R., Teepe M., Lyman S. D., Peschon J. J. (2000): Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood 95, 3489-3497.

McMahon C. M., Ferng T., Canaani J., Wang E. S., Morrissette J. J. D., Eastburn D. J., Pellegrino M., Durruthy-Durruthy R., Watt C. D., Asthana S., Lasater E. A., DeFilippis R., Peretz C. A. C., McGary L. H. F., Deihimi S., Logan A. C., Luger S. M., Shah N. P., Carroll M., Smith C. C., Perl A. E. (2019): Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Discovery 9, 1050-1063.

Mead A. J., Linch D. C., Hills R. K., Wheatley K., Burnett A. K., Gale R. E. (2007): FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. Blood 110, 1262-1270.

Meyers J., Yu Y., Kaye J. A., Davis K. L. (2013): Medicare Fee-for-Service Enrollees with Primary Acute Myeloid Leukemia: An Analysis of Treatment Patterns, Survival, and Healthcare Resource Utilization and Costs. Applied Health Economics and Health Policy 11, 275-286.

Moore A. S., Faisal A., Mak G. W. Y., Miraki-Moud F., Bavetsias V., Valenti M., Box G., Hallsworth A., de Haven Brandon A., Xavier C. P. R., Stronge R., Pearson A. D. J., Blagg J., Raynaud F. I., Chopra R., Eccles S. A., Taussig D. C., Linardopoulos S. (2020): Quizartinib-resistant FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells are sensitive to the FLT3-Aurora kinase inhibitor CCT241736. Blood Advances 4, 1478-1491.

Mori M., Kaneko N., Ueno Y., Yamada M., Tanaka R., Saito R., Shimada I., Mori K., Kuromitsu S. (2017): Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. Investigational New Drugs 35, 556-565.

Murphy L. O., Smith S., Chen R. H., Fingar D. C., Blenis J. (2002): Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. Nature Cell Biology 4, 556-564.

O'Shea J. J., Schwartz D. M., Villarino A. V., Gadina M., McInnes I. B., Laurence A. (2015): The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. Annual review of medicine 66, 311-328.

Ozeki K., Kiyoi H., Hirose Y., Iwai M., Ninomiya M., Kodera Y., Miyawaki S., Kuriyama K., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Ueda R., Ohno R., Emi N., Naoe T. (2004): Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. Blood 103, 1901-1908.

Patel J. P., Gönen M. Figueroa M. E., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J., Vlierberghe P. V., Dolgalev I., Thomas S., Aminova O., Huberman K., Cheng J., Viale A., Socci N. D., Heguy A., Cherry A., Vance G., Higgins R. R., Ketterling R. P., Gallagher R. E., Litzow M., van den Brink M. R. M., Lazarus H. M., Rowe J. M., Luger S., Ferrando A., Paietta E., Tallman M. S., Melnick A., Abdel-Wahab O., Levine R. L. (2012): Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. The New England Journal of Medicine 366, 1079-1089.

Perl A. E., Altman J. K., Cortes J., Smith C., Litzow M., Baer M. R., Claxton D., Erba H. P., 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. S., Stuart R., Röllig 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. The Lancet Oncology 18, 1061-1075.

Puissant A., Fenouille N., Alexe G., Pikman Y., Bassil C. F., Mehta S., Du J., Kazi J. U., Luciano F., Rönnstrand L., Kung A. L., Aster J. C., Galinsky I., Stone R. M., DeAngelo D. J., Hemann M. T., Stegmaier K. (2014): SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 25, 226-242.

Robinson Dan R, Wu Yi-Mi, Lin Su-Fang (2000): The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene 19, 5548-5557.

Röllig C., Serve H., Hüttmann A., Noppeney R., Müller-Tidow C., Krug U., Baldus C. D., Brandts C. H., Kunzmann V., Einsele H., Krämer A., Schäfer-Eckart K., Neubauer A., Burchert A., Giagounidis A., Krause S. W., Mackensen A., Aulitzky W., Herbst R., Hänel M., Kiani A., Frickhofen N., Kullmer J., Kaiser U., Link H., Geer T., Reichle A., Junghanß C., Repp R., Heits F., Dürk H., Hase J., Klut I. M., Illmer T., Bornhäuser M., Schaich M., Parmentier S., Görner M., Thiede C., von Bonin M., Schetelig J., Kramer M., Berdel W. E., Ehninger G., Study Alliance Leukaemia. (2015): Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. The Lancet Oncology 16, 1691-1699.

Sato T., Yang X., Knapper S., White P., Smith B. D., Galkin S., Small D., Burnett A., Levis M. (2011): FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. Blood 117, 3286-3293.

Schnittger S., Bacher U., Haferlach C., Alpermann T., Kern W., Haferlach T. (2012): Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. Genes Chromosomes Cancer 51, 910-924.

Serve H., Krug U., Wagner R., Sauerland M. C., Heinecke A., Brunnberg U., Schaich M., Ottmann O., Duyster J., Wandt H., Fischer T., Giagounidis A., Neubauer A., Reichle A., Aulitzky W., Noppeney R., Blau I., Kunzmann V., Stuhlmann R., Krämer A., Kreuzer K. A., Brandts C., Steffen B., Thiede C., Müller-Tidow C., Ehninger G., Berdel W. E. (2013): Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. Journal of Clinical Oncology 31, 3110-3118.

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. P., Zarrinkar P. P., Schadt E. E., Kasarskis A., Kuriyan J., Shah N. P. (2012): Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature 485, 260-263.

Spiekermann K., Biethahn S., Wilde S., Hiddemann W., Alves F. (2001): Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. European Journal of Haematology 67, 63-71.

Spiekermann K., Bagrintseva K., Schwab R., Schmieja K., Hiddemann W. (2003): Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. Clinical Cancer Research 9, 2140-2150.

Stone R. M., Mandrekar S. J., Sanford B. L., Laumann K., Geyer S., Bloomfield C. D., Thiede C., Prior T. W., Döhner K., Marcucci G., Lo-Coco F., Klisovic R. B., Wei A., Sierra J., Sanz M. A., Brandwein J. M., de Witte T., Niederwieser D., Appelbaum F. R., Medeiros B. C., Tallman M. S., Krauter J., Schlenk R. F., Ganser A., Serve H., Ehninger G., Amadori S., Larson R. A., Döhner H. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. The New England Journal of Medicine 377, 454-464.

Šálek C. (2012): Diagnostika a léčba akutní leukemie. Interní medicína pro praxi 10, 366-372.

Šustková Z., Čulen M., Semerád L., Ježíšková I., Dvořáková D., Ráčil Z., Mayer J. (2017): New drugs in the treatment of acute myeloid leukemia in the elderly. Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno 3, 190-196.

Thien Ch. B. F., Langdon W. Y. (2001): Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2, 294-307.

Traer E., Martinez J., Javidi-Sharifi N., Agarwal A., Dunlap J., English I., Kovacsovics T., Tyner J. W., Wong M., Druker B. J. (2016): FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Research 76, 6471-6482.

Uras I. Z., Walter G. J., Scheicher R., Bellutti F., Prchal-Murphy M., Tigan A. S., Valent P., Heidel F. H., Kubicek S., Scholl C., Fröhling S., Sexl V. (2016): Palbociclib treatment of FLT3-ITD+ AML cells uncovers a kinase-dependent transcriptional regulation of FLT3 and PIM1 by CDK6. Blood 127, 2890-2902.

Verstovsek S., Odenike O., Singer J. W., Granston T., Al-Fayoumi S., Deeg H. J. (2016): Phase 1/2 study of pacritinib, a next generation JAK2/FLT3 inhibitor, in myelofibrosis or other myeloid malignancies. Journal of Hematology and Oncology 9, 137.

Verstraete K., Vandriessche G., Januar M., Elegheert J., Shkumatov A. V., Desfosses A., Van Craenenbroeck K., Svergun D. I., Gutsche I., Vergauwen B., Savvides S. N. (2011): Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. Blood 118, 60-68.

Wang L., Wang J., Blaser B. W., Duchemin A. M., Kusewitt D. F., Liu T., Caligiuri M. A., Briesewitz R. (2007): Pharmacologic inhibition of CDK4/6: mechanistic evidence for selective activity or acquired resistance in acute myeloid leukemia. Blood 110, 2075-2083.

Wang Z., Cai J., Cheng J., Yang W., Zhu Y., Li H., Lu T., Chen Y., Lu S. (2021): FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Challenges and Recent Developments in Overcoming Resistance. Journal of Medicinal Chemistry 64: 2878-2900.

Wilson L. J. (2010): Recent patents in the discovery of small molecule inhibitors of JAK3. Expert Opinion on Therapeutic Patents 20, 609-623.

Wodnar-Filipowicz A., Lyman S. D., Gratwohl A., Tichelli A., Speck B., Nissen C. (1996): Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia. Blood 88, 4493-4499.

Wu M., Li C., Zhu X. (2018): FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. Journal of Hematology and Oncology 11, 133.

Xin P., Xu X., Deng C., Liu S., Wang Y., Zhou X., Ma H., Wei D., Sun S. (2020): The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. International Immunopharmacology 80:106210.

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.

Yamamoto J. F., Goodman M. T. (2007): Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. Cancer Causes & Control 19, 379-390.

Yu H., Jove R. (2004): The STATs of cancer--new molecular targets come of age. Nature Reviews Cancer. 4, 97-105.

Yuan T, Qi B., Jiang Z., Dong W., Zhong L., Bai L., Tong R., Yu J., 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.

Zarrinkar P. P., Gunawardane R. N., Cramer M. D., Gardner M. F., Brigham D., Belli B., Karaman M. W., Pratz K. W., Pallares G., Chao Q., Sprankle K. G., Patel H. K., Levis M., Armstrong R. C., James J.,

Bhagwat S. S. (2009): AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). Blood 114, 2984-2992.

Zhang S., Mantel C., Broxmeyer H. E. (1999): Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. Journal of Leukocyte Biology 65, 372-380.

Zhang W, Gao C., Konopleva M., Chen Y., Jacamo R. O., Borthakur G., Cortes J. E., Ravandi F., Ramachandran A., Andreeff M. (2014): Reversal of acquired drug resistance in FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells via distinct drug combination strategies. Clinical Cancer Resarch 20, 2363-2374.

Zhang W., Borthakur G., Gao C., Chen Y., Mu H., Ruvolo V. R., Nomoto K., Zhao N., Konopleva M., Andreeff M. (2016): The Dual MEK/FLT3 Inhibitor E6201 Exerts Cytotoxic Activity against Acute Myeloid Leukemia Cells Harboring Resistance-Conferring FLT3 Mutations. Cancer Research 76, 1528-1537.

Zheng R., Levis M., Piloto O., Brown P., Baldwin B. R., Gorin N. C., Beran M., Zhu Z., Ludwig D., Hicklin D., Witte L., Li Y., Small D. (2004): FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. Blood 103, 267-274.

Zhong Y., Qiu R. Z., Sun S. L., Zhao C., Fan T. Y., Chen M., Li N. G., Shi Z. H. (2020): Small-Molecule Fms-like Tyrosine Kinase 3 Inhibitors: An Attractive and Efficient Method for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Journal of Medical Chemistry 63, 12403-12428.

Zimmerman E. I., Turner D. C., Buaboonnam J., Hu S., Orwick S., Roberts M. S., Janke L. J., Ramachandran A., Stewart C. F., Inaba H., Baker S. D. (2013): Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. Blood 122, 3607-3615.