

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**



**Diplomová práce**

**Interindividuální variabilita exprese vybraných  
membránových transportérů a jejich vliv na prognózu  
a terapii pacientů s akutní myeloidní leukémií**

**Karolína Nálevková**

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

Konzultant: PharmDr. Aleš Šorf, Ph.D.

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2022**

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

**Poděkování:**

Děkuji doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za možnost podílet se na výzkumu a za veškeré rady. Velké poděkování patří PharmDr. Alešovi Šorfovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, velkou trpělivost, obdivuhodnou ochotu, pomoc během vypracování a za veškerý čas, který mi v průběhu věnoval. Ráda bych také poděkovala své rodině a všem blízkým přátelům za trpělivost a podporu během celého studia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studentka:** Karolína Nálevková

**Školitelka:** doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

**Konzultant:** PharmDr. Aleš Šorf, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Interindividuální variabilita exprese vybraných membránových transportérů a jejich vliv na prognózu a terapii pacientů s akutní myeloidní leukémií.

Akutní myeloidní leukémie je maligní nádorové onemocnění hematopoetického systému. Dostupná léčba stále nepřináší dostatečné výsledky, jelikož pět let od stanovení diagnózy se dožívá pouze necelých 30 % pacientů. Základní indukční terapii už dlouhá desetiletí tvoří kombinace cytarabinu s antracyklinem, nazývaná také jako „7+3“ terapie. Díky karyotypizaci a imunofenotypizaci pacientů se v posledních pár letech potvrdila velká heterogenita onemocnění, což podpořilo i rozvoj cílených léčiv. Na výsledek terapie mohou mít vliv i další faktory, například transportéry podílející se na přestupu léčiv či esenciálních molekul přes buněčné membrány. V této práci jsem se proto věnovala zejména vlivu vybraných membránových přenašečů OCTN1, OCTN2 a ABCC4 na prognózu onemocnění a terapii pacientů.

Nejprve jsme si na mononukleárních buňkách izolovaných z krve *de novo* diagnostikovaných pacientů s AML pomocí RT-PCR a ddPCR metody určili množství transkriptů studovaných genů. Největší interindividuální variabilita se ukázala u OCTN1 a ABCC4 transportéru, jakožto influxního a efluxního přenašeče pro cytarabin. Na základě těchto hodnot jsme vytvořili Kaplan-Meierovy křivky přežití a zjistili, že exprese OCTN1 transportéru se jeví jako prediktivní pro délku přežití. Výsledky z RT-PCR a ddPCR metody jsme dále hodnotili v kombinaci s klinickými daty z Fakultní nemocnice Hradec Králové a hledali možné souvislosti. Nejzajímavější fakt, který se prozatím v žádné jiné studii neobjevil, je ten, že přítomnost FLT3 mutace je spojená s nižší expresí právě prediktivního OCTN1 transportéru. U NPM1 mutace, s pozitivním prognostickým vlivem, se žádný trend neobjevil. U klasifikace ELN, která je z prognostického pohledu nejaktuálnější a nyní nejvíce rozšířená, jsme zaznamenali trend, že pacienti zařazení do nepříznivé kategorie mají výrazně vyšší expresi OCTN2 transportéru. Tento fakt si vysvětlujeme jako obranný mechanismus buňky, která se velmi rychle dokáže adaptovat na okolní prostředí a vyšší potřebu L-karnitinu pro oxidaci mastných kyselin a produkci energie.

Vývoj nových cílených selektivních léčiv je na vzestupu, právě díky konkrétnějšímu prozkoumání patofyziologie nemoci. Z cílených léčiv na FLT3 mutaci jsou v ČR schváleny zatím pouze dvě – a to

midostaurin a gilteritinib. Kvůli zjištěnému vztahu mezi OCTN1 a FLT3 mutací se nabízí hypotéza ohledně ovlivnění OCTN1 transportéru inhibitory FLT3 – a to z pohledu jeho exprese i funkce. S využitím modelové MDCKII-OCTN1 linie jsme zjistili, že ani jedno ze schválených léčiv funkčně neovlivňuje OCTN1 transportér. Při expozici MV4-11 buněk, které nesou FLT3 mutaci, léčivům jsme zaznamenali signifikantní zvýšení u OCTN2 transportéru, a zároveň signifikantní, i když mírné, zvýšení OCTN1 transportéru.

Výsledky naší práce ukazují významnou souvislost OCTN1 transportéru s přežitím AML pacientů léčených cytarabinem. Vyplývá z nich možná úprava terapeutického schématu pacientů s AML a zároveň FLT3 mutací, kdy se nabízí do iniciační fáze indukční terapie přidat selektivní inhibitor FLT3 mutace. Mohlo by dojít ke zvýšení exprese OCTN1 transportéru, a tak k lepším terapeutickým výsledkům. Je ovšem nutné se těmito teoretickým závěrům dále věnovat a ověřit je.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

**Student:** Karolína Nálevková

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

**Consultant:** PharmDr. Aleš Šorf, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Interindividual variability in expression of selected membrane transporters; their impact on prognosis and therapy of patients with acute myeloid leukaemia.

Acute myeloid leukaemia (AML) is a malignant disease of hematopoietic system. Available treatment does not produce suitable results, as the 5-year survival is only about 30%. The primary induction therapy has remained the same for many years – combination of cytarabine and anthracycline, known as "7+3". By karyotyping and immunophenotyping of patients in the last few years, heterogeneity of the disease was confirmed, which also led to the development of targeted drugs. Other factors such as transporters that play a role in drug transport across plasma membranes may affect the treatment outcome. In my diploma thesis, I therefore focused on the effect of selected membrane transporters OCTN1, OCTN2 and ABCC4 on the prognosis and therapy of AML patients.

First, we specified the number of transcripts of studied genes using the RT-PCR and ddPCR methods in samples isolated from mononuclear cells of the blood of *de novo* diagnosed AML patients. The significant interindividual variability was found for the OCTN1 and ABCC4 transporters, which represent influx and efflux transporters for cytarabine. Based on the results from PCR, we generated the Kaplan-Meier survival curves and discovered that the OCTN1 transporter appears to be predictive marker of survival. Using the values from PCR method and clinical data from University Hospital Hradec Králové, we took a closer look at possible context to the patients' characteristics. The most interesting fact, which had not appeared in other studies yet, was that the most common FLT3 mutation was related to the significant downregulation of predictive OCTN1 transporter. On the contrary, we did not observe any changes for NPM1 mutation. Regarding the most recent and widely used risk classification ELN, we noticed that the patients in adverse risk category had significantly increased OCTN2 expression. It could be explained as a defence mechanism of cells that could very quickly adapt to their surroundings and high need of L-carnitine for fatty acid oxidation and energy production.

Based on new knowledge of pathophysiology of the disease, the development of new targeted drugs accelerated rapidly. From FLT3 inhibitors category, two compounds have been approved in the

Czech Republic so far – midostaurin and gilteritinib. Because of the identified relation between OCTN1 and FLT3 mutation, we hypothesized about influencing OCTN1 transporter by selective FLT3 inhibitors from the perspective of changes in both function and expression. Using model MDCKII-OCTN1 cells, we found out that none of approved target drugs functionally affected OCTN1 transporter. After we exposed MV4-11 cell line, that carries FLT3 mutation, to tested drugs, we observed significant increase of OCTN2 expression and also significant moderate increase of OCTN1 expression.

The results of our experimental work confirmed role of OCTN1 transporter for survival of AML patients treated by cytarabine. They also suggest possible modification of the therapeutic scheme of AML patients with FLT3 mutation. The selective inhibitor of FLT3 could be added into the induction chemotherapy to increase the level of OCTN1 transporter to improve the cytarabine therapy outcome. However, further study of this hypothesis is necessary to verify its clinical significance.

# Obsah

<b>1. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>9</b>
<b>2. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
3.1. AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE .....	12
3.1.1. <i>Patofyziologie, klinický obraz</i> .....	12
3.1.2. <i>Diagnostika a prognostické markery</i> .....	13
3.1.3. <i>NPM1 a FLT3 mutace</i> .....	15
3.1.4. <i>Terapie AML</i> .....	16
3.2. TRANSPORTÉRY .....	20
3.2.1. <i>SLC22A4 – OCTN1</i> .....	21
3.2.2. <i>SLC22A5 – OCTN2</i> .....	22
3.2.3. <i>ABCC4 – ABCC4</i> .....	22
<b>4. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>25</b>
5.1. MATERIÁL .....	25
5.1.1. <i>Přístroje</i> .....	25
5.1.2. <i>Chemikálie</i> .....	25
5.1.3. <i>Buněčné linie</i> .....	26
5.1.4. <i>Pacienti</i> .....	26
5.2. METODY .....	27
5.2.1. <i>Izolace RNA, reverzní transkripce a RT-PCR</i> .....	27
5.2.2. <i>Dropletová digitální PCR</i> .....	29
5.2.3. <i>Kultivace buněk</i> .....	30
5.2.4. <i>Změna genové exprese u MV4-11 buněk</i> .....	31
5.2.5. <i>Kinetika akumulace ASP+</i> .....	31
5.3. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT .....	31
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>33</b>
6.1. RT-PCR.....	33
6.2. ZMĚNA GENOVÉ EXPRESE U MV4-11 .....	40
6.3. KINETIKA AKUMULACE ASP+.....	42
<b>7. DISKUZE</b> .....	<b>45</b>
<b>8. ZÁVĚR</b> .....	<b>49</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>51</b>



## 1. SEZNAM ZKRATEK

„7+3“	základní indukční chemoterapie sestávající z cytarabinu podávaného 7 dní v kombinaci s antracyklinem po dobu 3 dnů
ABC	ATP – vázající
ABCB1/MDR1	P-glykoprotein
ABCC4/MRP4	multidrug resistance-associated protein 4
AML	akutní myeloidní leukémie
ARF	alternative reading frame
ASP+	4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium jodid
B2M	beta-2-mikroglobulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CEBPA	CCAAT/enhancer-vazebný protein alfa
CPX351	kombinace cytarabinu a daunorubicinu v poměru 5:1
ddPCR	dropletová digitální PCR
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELN	European LeukemiaNet
FBS	fetální bovinní sérum
FLT3	tyrozinkinázový receptor 3
FLT3-ITD	interní tandemová duplikace FLT3
FLT3-TKD	bodová mutace FLT3
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPRT1	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MDCKII	Madin-Darby canine kidney II
NPM1	nukelofosmin 1
OAT	organic anion transporter – transportér organických aniontů
OCTN	organic cation/carnitine transporter novel
PBS	fosfátový pufr
SLC	solute carrier
WHO	Světová zdravotnická organizace

## 2. ÚVOD

Nádorová onemocnění představují stále aktuální celosvětový problém. I když vývoj v medicíně jde velkými kroky vpřed, nádory jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaném světě (s ohledem na zdravotní onemocnění). Ke vzniku rakovinných buněk v těle existují jisté předurčující faktory jako rostoucí věk nebo genetický vliv, ovšem konkrétní spouštěče se často nedaří definovat. Karcinogeneze, proces změn vedoucích k tvorbě neoplastické buňky, probíhá u daného jedince dlouhou řadu let a je to několikastupňový proces – proto hovoříme o tak moc heterogenním a u každého pacienta individuálním stavu.

Akutní myeloidní leukémie (AML) je jedním ze čtyřech základních typů krevních malignit. Jedná se o nádorové onemocnění kostní dřeně ovlivňující primárně krvetvorné buňky. Prognóza u pacientů s touto diagnózou není moc nadějná, přežití pěti let dosáhne pouze necelých třicet procent pacientů. Velikou roli ale hrají také další klinické aspekty jako vstupní celkový stav nebo věk. Jelikož jejím vlivem neprobíhá diferenciace společného myeloidního progenitoru, dochází tak ke sníženému počtu všech dalších krevních elementů (kromě T a B lymfocytů) pacienta, a naopak k nadměrnému hromadění nezralých myeloprogenitorů (blastů). U jedince dochází například k anémii, trombocytopenii i k neutropenii a následně tak k výrazné únavě, krvácení nebo více či méně závažným nebo opakujícím se infekcím. V těle se postupně utlačuje zdravý a funkční imunitní systém ve prospěch nezralých a nefunkčních nádorových elementů, které postupně mohou infiltrovat i další orgány. Pokud se tyto příznaky objevují u jedince rychle a ve velké míře, jedná se o akutní stav leukémie (Doubek and Mayer, 2020; Pelcovits and Niroula, 2020).

Terapie AML není jednotná, vždy záleží na konkrétním stavu pacienta. Základní schéma zahrnuje indukční a konsolidační terapii. Hlavním cílem indukční terapie je eradikovat veškeré leukemické buňky u pacienta a dostat tak hodnoty krevních elementů na fyziologické – hovoříme pak o kompletní remisi onemocnění. Nejčastěji se používá chemoterapie, kombinace dvou cytostatických léčiv – cytarabinu (7 dní) a antracyklinu (3 dny), především daunorubicinu nebo idarubicinu – a tato kombinace se nazývá „7+3“. Ne vždy se dosáhne po jednom cyklu indukční chemoterapie kompletní remise, a proto je nutné ji buď opakovat nebo opět zvážit stav pacienta s ohledem na rizika a přehodnotit dosud stanovený cíl a strategii terapie. Pokud dojde ke kompletní remisi, pacienta ještě čeká konsolidační, nebo také postremisní, terapie. Ta se opět volí dle klinických aspektů jedince. Jejím hlavním cílem je zamezit návratu onemocnění, tedy relapsu. Nejčastěji se rozhoduje mezi intenzivní chemoterapií, kdy se podává vysoká nebo střední dávka cytarabinu, nebo chemoterapií následovanou transplantací kostní dřeně. Obě dvě možnosti s sebou přinášejí i výrazná úskalí pro pacienta – vysoké horečky, krvácení, život ohrožující infekce, urputné gastrointestinální problémy – proto je velice důležité každého pacienta hodnotit individuálně a aktuálně dle jeho postupujícího stavu. Ve stádiích onemocnění, kdy

by pacient nebyl schopen snést náročnost chemoterapie, se volí paliativní nebo symptomatická léčba AML. Cílem je umírnit veškeré příznaky a komplikace onemocnění a zvýšit tak co nejvíce kvalitu života jedince (Molica et al., 2019; Yang and Wang, 2018).

Vidinu úspěšnější terapie pacientů přináší nové skupiny léčiv, včetně těch cílených na určitý typ abnormality. Schváleno je zatím pouze malé množství těchto molekul, většina se nachází stále v klinických studiích, už teď ale lze říci, že u jistých z nich lze očekávat velmi kladné terapeutické výsledky a naději pro pacienty.

V této diplomové práci se věnuji charakteristice vzorků pacientů nově diagnostikovaných pro AML. Zaměřuji se hlavně na expresi membránových transportérů, které hrají důležitou roli pro správný a dostatečný účinek v odpovědi na terapii. Konkrétně pak tedy na léčivo cytarabin, zejména pro jeho široké a velmi časté užití. V neposlední řadě se také zaobírám vlivem nových cílených léčiv, FLT3 inhibitorů, na OCTN1 transportér – klíčový membránový přenašeč pro cytarabin.

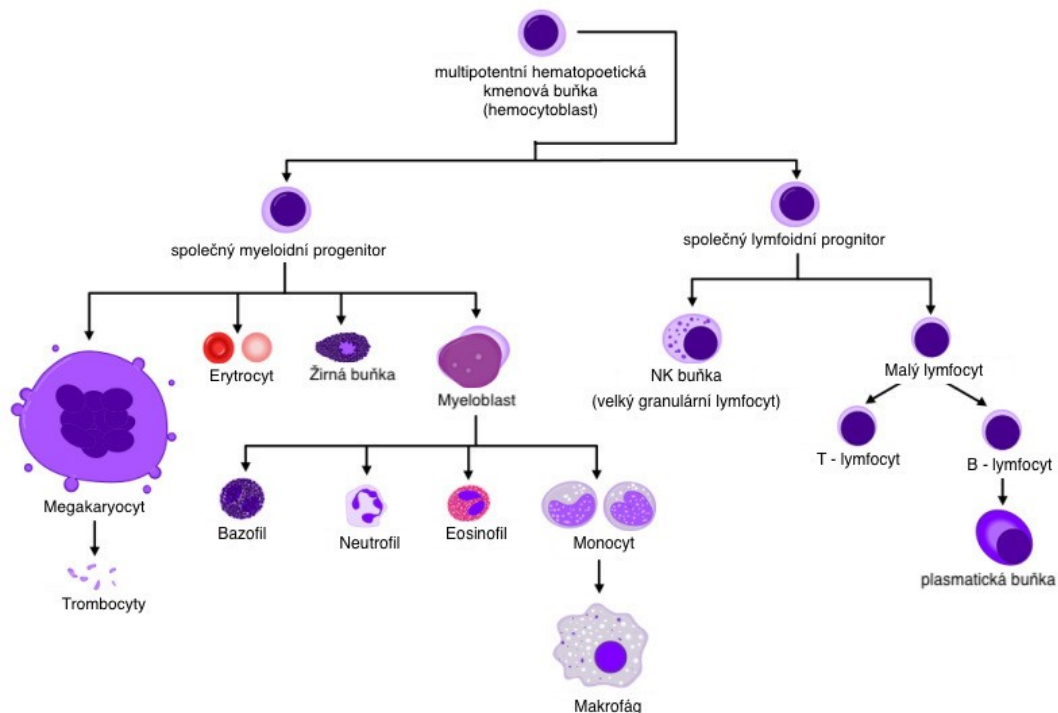
### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní nádorové onemocnění krevní buňky začínající v kostní dřeni. Problematika tohoto onemocnění je velmi závažná, jelikož pouhých 29,5 % pacientů diagnostikovaných na toto onemocnění se dožívá následujících pěti a více let (NIH, 2021a). Větší incidence se vyskytuje u mužů – medián věku při pozitivní diagnóze je 67 let. Incidence u dospělých pacientů je 15/100 000 obyvatel, kdežto u dětí 2-3/100 000 obyvatel, s věkem tak výrazně stoupá (Doubek and Mayer, 2013).

##### 3.1.1. Patofyziologie, klinický obraz

Při rozvoji AML dochází k poškození hematopoetického systému, kdy se v těle jedince tvoří nezralé klony myeloidní kmenové buňky vlivem abnormální proliferace a diferenciace. AML se může u pacientů vyskytnout i v důsledku radiace nebo například alkylačních činidel, ale u valné většiny případů se jedná o primární onemocnění. U více jak 95 % pacientů k jejímu rozvoji dochází v důsledku genetické mutace. Důvod může být i chromozomální, a to translokace tzv. „core-binding“ faktoru AML, čímž dochází ke změně procesu proliferace všech buněk v linii – např. trombocytů, erytrocytů, myeloblastů. Linie buněk (NK buněk, T a B lymfocytů) vycházející z lymfoidní kmenové buňky poškozeny v tomto případě nejsou (De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016; NIH, 2021b; Pelcovits and Niroula, 2020) (Obr. 1).



**Obrázek 1:** Schéma krve tvorby z kmenové buňky; převzato a upraveno z: (Chennamadhavuni et al., 2022)

Manifestace klinického obrazu u akutní myeloidní leukémie zahrnuje převážně symptomy vycházející z kumulace maligních, málo diferenciovaných myeloidních buněk jak v kostní dřeni, tak i v periferní krvi nebo orgánech (De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016). Projevy onemocnění nejsou často vůbec jednoznačné. Pacient může být dlouhou dobu bezpříznakový nebo může pociťovat velmi nespecifické symptomy jako například horečka, malátnost, krátký mělký dech, rychle se tvořící modřiny na těle nebo petechie, únava nebo ztráta chuti k jídlu včetně úbytku hmotnosti. Samozřejmě se vyskytuje i skupina pacientů, kteří mají již od propuknutí nemoci charakteristické příznaky nebo spíše většinou jejich vzájemnou kombinaci. Mezi ně patří například časté krvácení, opakující se infekce nebo diseminovaná intravaskulární koagulace (NIH, 2021b; Šálek, 2012).

### **3.1.2. Diagnostika a prognostické markery**

*De novo* diagnostikovaný pacient může být odhalen při běžné kontrole krve nebo na základě podrobného vyšetření při výše zmíněných symptomech. Testuje se aktivita myeloperoxidázy, dělá se imunofenotypizace, počítačová tomografie, morfologické, cytogenetické, molekulárně cytogenetické, molekulárně genetické testy, genomové studie nebo se zkoumá přítomnost Auerových tyčinek (azurofilní červené tyčky). Při jejich zvýšeném množství se zároveň zvyšuje koagulační riziko. AML se u pacientů potvrzuje při výskytu dvaceti a více procent přítomnosti blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi. Diagnózu také lze potvrdit na základě přítomnosti extramedulárního tkáňového infiltrátu bez ohledu na přítomné množství blastů (Döhner et al., 2010; De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016).

Určení správné charakteristiky pacienta je pro výsledek léčby zásadní. Proto jsou často využívány různé klasifikace. Ty jsou u AML velmi rozmanité a mnohočetné. Od roku 1976 existuje Francouzsko-americko-britská klasifikace a ta na základě morfologických a cytochemických charakteristik rozřazuje AML do osmi subtypů – a to M0 až M7 (Bennett et al., 1976). Poté Světová zdravotnická organizace (WHO) několikrát, naposledy v roce 2016, revidovala klasifikaci AML, která rozlišuje šest hlavních typů AML zahrnující genetické informace s morfologií, imunofenotypizací a také klinický obraz (A. Arber and Orazi, 2016). V roce 2017 European LeukemiaNet (ELN) vytvořila klasifikaci AML navíc zahrnující i predikci prognózy. Tím výrazně pomohla také v rozhodování o typu terapie pacientů. Pacienti jsou tak rozdělení do tří kategorií – příznivá, střední a nepříznivá – a to na základě cytogenetického a molekulárního profilu (Döhner et al., 2017) (Tab. 1).

**Tabulka 1:** Rozdělení AML dle ELN klasifikace do tří kategorií pomocí cytogenetického a molekulárního profilu; převzato a upraveno z (Voso et al., 2019).

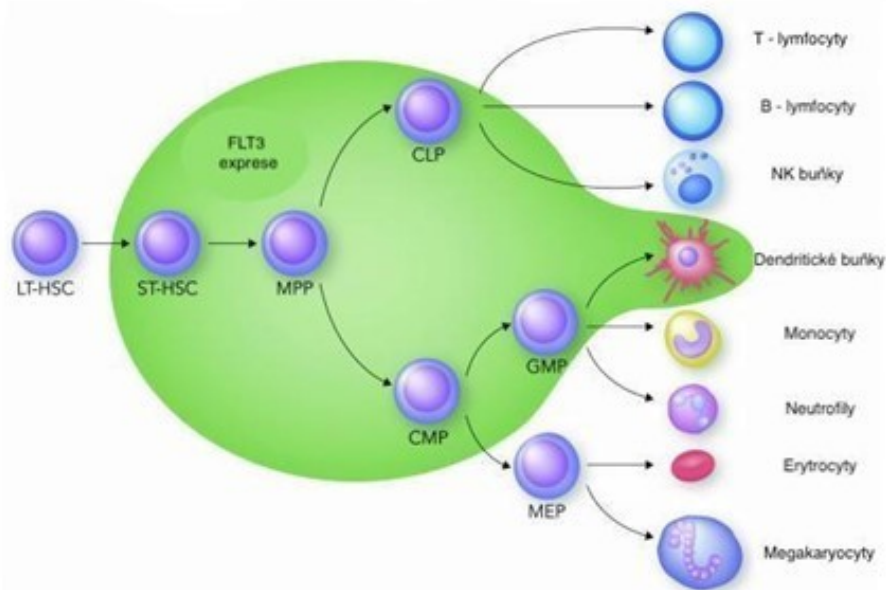
<b>PŘÍZNIVÁ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX –RUNX1T1</i></li> <li>○ inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB – MYH11</i></li> <li>○ <i>NPM1</i>mut s <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup></li> <li>○ bialelická mutace <i>CEBPA</i></li> </ul>
<b>STŘEDNÍ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>NPM1</i>mut a <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li>○ <i>NPM1</i><sup>wild type</sup> bez <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup></li> <li>○ t(9;21)(q21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></li> <li>○ cytogenetické abnormality neklasifikované jako příznivé nebo nepříznivé</li> </ul>
<b>NEPŘÍZNIVÁ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK–NUP214</i></li> <li>○ t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> přeorganizovaný</li> <li>○ t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>○ inv(3)(q21.3q26.2) nebo t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i></li> <li>○ -5 nebo del(5q); -7; -17/abn(17p)</li> <li>○ komplexní karyotyp, monosomální karyotyp</li> <li>○ <i>NPM1</i><sup>wild type</sup> a <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li>○ mutovaný <i>RUNX1</i></li> <li>○ mutovaný <i>ASXL1</i></li> <li>○ mutovaný <i>TP53</i></li> </ul>

Prognostické faktory mohou určitou mírou predikovat závažnost stavu pacienta nebo jeho odpověď na léčbu. Zároveň pomáhají při rozhodování ohledně typu léčby. Jednotlivé faktory můžeme rozdělit, zda jsou v souvislosti s pacientem nebo s AML. Základním prognostickým faktorem jsou klinické aspekty pacienta – věk, komorbidity a celkový fyzický a psychický stav. Se vzrůstajícím věkem, komorbiditami i horšícím se fyzickým a psychickým stavem klesá šance na kompletní remisi nebo přežití pacienta. Důležitou roli hrají i hodnoty získané z krve – a to celkový počet krevních destiček, sérový kreatinin nebo albumin. Ve spojitosti s AML hrají nejsilnější prognostickou roli cytogenetické změny u pacienta (Tab. 1). Výraznou váhu mají zejména molekulárně-genetické mutace, z nichž nejčastější u AML jsou mutace nukleofosminu 1 (*NPM1*) a FMS-like tyrozinkinázového receptoru 3 (*FLT3*) (Cairoli et al., 2012; Döhner et al., 2017; De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016). Tyto předurčující markery lze rozdělit na ty s pozitivním nebo negativním vlivem - *FLT3* mutace například patří mezi ty nepříznivé, dále také *KIT* tyrozinkinázové receptorové mutace zahrnující karyotyp t(8;21), věk nad 60 let, vysoká exprese *CD34* nebo sekundární AML a další. K pozitivním se řadí mnohem méně charakteristik a to například *NPM1* a *CEBPA* mutace nebo specifické markery jako například t(15;17) (de Jonge-Peters et al., 2007).

### 3.1.3. NPM1 a FLT3 mutace

Nukleofosmin je fosfoprotein s onkogenetickou funkcí. Má důležitou roli při tvorbě ribozomů a podporuje růst a proliferaci buněk, je součástí apoptotické odpovědi buňky na stres (např. přes signální dráhu p53), účastní se působení onkogenů a ovlivňuje dráhy nádorových supresorů. Nukleofosmin, kódovaný genem NPM1, je tzv. shuttling protein. Váže se na protein zvaný „alternative reading frame“ (ARF), který je považován za nádorový supresor. U solidních nádorů a lymfoidních malignit dochází ke zvýšené expresi NPM1, tím pádem dochází k potlačení nádorového supresoru ARF a dochází tak ke snížené apoptóze buněk. Pravděpodobně dochází i během této mutace k nekontrolované produkci abnormálních bílých krvinek. NPM1 mutace je nejčastější genetický defekt u akutní myeloidní leukémie (Box et al., 2016; Fuchs, 2007; NIH, 2020).

FLT3 hraje důležitou roli v diferenciaci a proliferaci hematopoetických buněk, předává dál signálovou transdukcí prostřednictvím signálních drah PI3K, RAS nebo STAT5. Hlavní role tohoto receptoru v hematopoéze je na úrovni progenitoru, kde má vliv zejména na tvorbu dalších podskupin buněk (Obr. 2).



**Obrázek 2:** Hematopoéza a FLT3 exprese. LT-HSC – dlouhodobá hematopoetická kmenová buňka, ST-HSC – krátkodobá hematopoetická kmenová buňka, MPP – multipotentní progenitor, CLP – společný lymfoidní progenitor, CMP – společný myeloidní progenitor, GMP – progenitor granulocytů a makrofágů, MEP – megakaryocytární a erytroidní progenitor; převzato a upraveno z (Levis and Perl, 2020).

Existují dvě hlavní mutace vznikající fosforylací, a to interní tandemová duplikace FLT3 (FLT3-ITD) charakterizovaná duplikační mutací v juxtamembránové doméně, která tvoří přibližně 25 % všech AML případů, a bodová mutace FLT3 (FLT3-TKD) s typickou bodovou mutací nebo delecí v tyrozin kinázové

doméně vyskytující se přibližně u 7-10 % případů. Vlivem mutace dochází k aktivaci mnoha signálních drah, a to například STAT5, MAPK a AKT, což vede k potlačení apoptózy a k nekontrolovatelné proliferaci buněk (Grafone et al., 2012). Tato mutace je silně spojena s leukocytózou a zvýšeným množstvím blastových buněk v periferní krvi a kostní dřeni. Zjistilo se také, že FLT3-ITD mutace je jednou z nejčastěji se vyskytujících mutací, přesněji že FLT3-ITD mutace je jedním ze tří nejčastějších hnacích mechanismů rozvoje AML u pacientů. Tato mutace se vyskytuje u více než 30 % pacientů nad 55 let, vytváří značnou leukemickou zátěž, výrazně negativně ovlivňuje stav a prognózu pacienta, zvyšuje riziko relapsu a snižuje šanci na celkové přežití po standardní léčbě. FLT3-ITD mutace je natolik závažná, že i přes podstoupení transplantace hematopoetických kmenových buněk je riziko relapsu stále vysoké, přičemž pacienti po relapsu mají velmi nízké riziko druhé kompletní remise onemocnění. Studie také prokázaly fakt, že FLT3-ITD mutace je pravděpodobně zodpovědná za progresi onemocnění, což ukazuje na důležitost opětovného testování pacientů při relapsu – u 8 % pacientů se potvrdí pozitivní nález na FLT3-ITD mutaci a u 2 % na FLT3-TKD. Samozřejmě ale stav pacienta nezávisí pouze na jednotlivých mutacích, ale spíše na jejich vzájemné kombinaci a překrývání se. Například výše zmíněná NPM1 mutace má pozitivní prognostický vliv pouze v případě, že se nevyskytuje v kombinaci s FLT3-ITD mutací (nebo pouze s nízkým poměrem). Časnější záchyt mutace pomůže při rozhodování typu terapie, včetně té cílené na FLT3 mutaci, a zároveň jednoznačně pomůže při pochopení klinického stavu pacienta (Daver et al., 2019a; Kiyoi et al., 2020).

#### **3.1.4. Terapie AML**

Základní terapie akutní myeloidní leukémie spočívá zaprvé v indukční terapii, která má za cíl dosáhnout kompletní remise, a také v postremisní terapii, jejímž hlavním cílem je zabránit recidivě onemocnění. Zvolená indukční terapie se vždy volí na základě pacienta a jeho stavu – důležitou roli hrají klinické aspekty jedince, typ AML s cytogenetickým a morfologickým profilem a také se bere do úvahy cíl terapie (dosáhnoutí kompletní remise nebo paliace). Existují dvě varianty indukční terapie, a to cytotoxická chemoterapie nebo hypometylační činidla – obě možnosti buď v kombinaci s cílenou terapií nebo bez ní. Základní schéma chemoterapie je u AML stejné už po dobu 50 let. Pacienti, kteří spadají do příznivé nebo střední kategorie onemocnění a jsou dostatečně fyzicky zdatní snést chemoterapii, dostávají iniciační léčbu v podobě infuze cytarabinu (nukleosidový analog) po dobu 7 dnů v kombinaci s antracyklinem, nejčastěji daunorubicinem (inhibitor topoizomerázy II), prvních 3 dny. Terapie je známá jako „7+3“. Až u 80 % pacientů s příznivým stavem onemocnění tato chemoterapie vede ke kompletní odpovědi, u pacientů se středně závažným stavem to ke kompletní odpovědi vede u 50-60 % (Pelcovits and Niroula, 2020). Často se do této zavedené dvojkombinace přidávají cílená léčiva. U příznivého a středně závažného stavu se ke kombinaci cytarabinu s daunorubicinem přidává



například monoklonální protilátka proti CD-33 gemtuzumab ozogomycin nebo u pacientů pozitivních na FLT3 mutaci midostaurin (detailněji níže). Ten v kombinaci s chemoterapií zlepšil hodnotu celkového přežití z mediánu 25 měsíců na 74 měsíců (Stone et al., 2017). Pokud se ovšem jedná o pacienta s nepříznivým stavem AML, standardní chemoterapie „7+3“ nevykazuje uspokojivé výsledky. Jednu z nejnovějších strategií léčby vysoce rizikových pacientů představuje venetoklax, selektivní inhibitor BCL-2, který lze použít i v kombinaci s CPX351 – kombinace cytarabinu a daunorubicinu v poměru 5:1 v lipozomální formě, což vede k prodloužené expozici. Tato terapie má mnohem lepší výsledky než indukční chemoterapie bez přidání cíleného léčiva (Kadia et al., 2020). Venetoklax se používá s hypometylačními činidly (azacitidin a decitabin), přičemž jejich vzájemnou kombinací bylo dosaženo příznivějších výsledků než při použití samotných hypometylačních činidel. (Dombret et al., 2015; Doubek and Mayer, 2020; Kantarjian et al., 2021).

Co se týče postremisní terapie, opět existují dva základní přístupy. Jedná se o dodatečnou cytotoxickou chemoterapii, kde se podává vysoká nebo střední dávka cytarabinu v kombinaci s cílenou terapií nebo bez ní. Druhou možností je autologní nebo alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk, které předchází konsolidační chemoterapie. Tato možnost připadá v úvahu pouze po úspěšném dosažení kompletní remise (snížení blastů v kostní dřeni pod 5 %) (Doubek and Mayer, 2020). Obě linie terapie mají své úskalí, proto se opět volí dle celkového stavu pacienta.

V jistých případech je stav pacienta natolik závažný a neslučitelný s léčbou, že se přistupuje na léčbu paliativní. Často se využívá nízkodávkové podávání cytarabinu s cílem potlačit aktivitu onemocnění. U většiny toto schéma nepřináší dlouhodobé účinky. Možností je také pouze symptomatická léčba s cílem zaléčit veškeré symptomy AML zhoršující kvalitu života jedince.

Díky detailnějšímu probádání AML (zjištění cytogenetického a molekulárního profilu – Tab. 1) můžeme nejen dosahovat lepších výsledků co se týče terapie nebo včasné diagnózy (která je velmi důležitá pro pozitivní výsledek), ale otevřela se tím i cesta pro vývoj nových cílených léčiv (Kantarjian et al., 2021).

Kvůli vysoce negativnímu vlivu FLT3 mutace na prognózu a stav pacienta, včetně vysoké frekvence výskytu, se postupně vyvíjejí léčiva na tuto mutaci s cílem narušit či úplně zabránit signalizaci iniciovanou FLT3 v mutantním stavu. V dnešní době už máme dvě řady cílených léčiv na FLT3 mutaci (Tab. 2).

**Tabulka 2:** Přehled cílených inhibitorů FLT3 mutace první a druhé generace; převzato a upraveno z: (Daver et al., 2019a; EMA, 2019).

LÉČIVA PRVNÍ GENERACE	FÁZE VÝVOJE	HLAVNÍ NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY
SUNITINIB	2	Snížení chuti k jídlu, bolest hlavy, GIT obtíže
SORAFENIB	3	Vyrážka, únava, průjem
MIDOSTAURIN	Schválen pro léčbu <i>de novo</i> diagnostikované AML v kombinaci s chemoterapií	Horečka, příznaky podobné chřipce, vředy v ústech
LEUSTAURTINIB	2	Infekce, sepse, infarkt myokardu
PONATINIB	2	Pankreatitida
<b>LÉČIVA DRUHÉ GENERACE</b>		
KRENOLANIB	3	Nauzea, zvracení, zadržování tekutin
KVIZARTINIB	3	Prodloužení QTc intervalu
GILTERITINIB	Schválen pro léčbu recidivující nebo refrakterní (R/R) AML s FLT3 mutací	GIT problémy, prodloužení QTc intervalu, respirační poruchy, porucha svalové soustavy

Léčiva cílená na FLT3 mutaci můžeme také rozdělit na typ I nebo II, a to na základně interakce s tyrozinkinázovým receptorem. Receptor po navázání ligandu přejde do své aktivní formy a podstoupí transformační změnu. Všechna výše zmíněná cílená léčiva interagují s vazebným místem pro ATP a kompetitivně tak inhibují jeho vazbu, čímž zabraňují fosforylaci a aktivaci signalizace. Léčiva typu I, kam řadíme sunitinib, lestaurtinib, midostaurin, krenolanib a gilteritinib, se váží na vazebné místo ATP v případě, kdy je receptor aktivní. Tato léčiva inhibují signalizaci u mutací typu FLT3-ITD i FLT3-TKD. Léčiva typu II, mezi které patří sorafenib, kvizartinib a ponatinib, interagují s hydrofobní oblastí v bezprostřední blízkosti vazebného místa ATP – kdy toto místo je přístupné pouze v případě, že je receptor v neaktivním stavu a inhibují signalizaci pouze u mutace FLT3-ITD (Larrosa-Garcia and Baer, 2017; Levis and Perl, 2020).

Studie, které hodnotily FLT3 inhibitory první generace v monoterapii (Tab. 2), neprokázaly zcela pozitivní a přínosný efekt. Měly vcelku nízkou antileukemickou aktivitu a někdy se objevila i zvýšená toxicita. Některé studie naopak přinesly vcelku pozitivní výsledky – a to studie hodnotící sunitinib

v kombinaci se standardní indukční terapií a konsolidační terapií cytarabin+daunorubicin přinesla výsledky, že 50 % pacientů s FLT3-ITD mutací a 38 % pacientů s FLT3-TKD dosáhlo remise. Dále například, že midostaurin v monoterapii u pacientů s relabující nebo refrakterní FLT3 mutací má také omezenou antileukemickou aktivitu. Zkoumal se také v kombinaci s chemoterapií „7+3“ u *de novo* diagnostikovaných AML pacientů s FLT3 mutací (FLT3-ITD i FLT3-TKD), kde u něj bylo prokázáno významné zlepšení celkového přežití a remise ve srovnání se samotnou chemoterapií. Ovlivňuje i jiné regulační dráhy, a to PKC, PKA, KIT, Fgr, VEGFR1 nebo VEGFR2 a další. Na základě těchto výsledků byl midostaurin v roce 2017 schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu *de novo* diagnostikovaných dospělých AML pacientů s FLT3 mutací. V Evropě je midostaurin schválen v indikaci k udržovací terapii pro dospělé pacienty s AML po indukci chemoterapií cytarabin/daunorubicin s midostaurinem (RATIFY studie). Midostaurin se ukázal jako nejvíce účinný u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk v první kompletní remisi onemocnění. Jelikož je to stále relativně mladé léčivo, neustále s ním probíhají studie a jeho celkové využití a přínosy nebo rizika se nadále zkoumají (Daver et al., 2019a; Hassanein et al., 2016; Wang, 2019).

Léčiva z druhé generace mají vyšší specifitu pro FLT3 receptor, vyšší účinnost i toleranci pacientů. Přesto kromě této cílené dráhy ovlivňují i další, jako například LTK, ALK nebo AXL dráhu. Jelikož se jedná o ještě novější molekuly než léčiva první generace, opět na všechny probíhají stále studie o zjišťování jejich benefitů a rizik. Nicméně už byla například u gilteritinibu v monoterapii prokázána u pacientů s relabující nebo refrakterní AML s FLT3 mutací 49% celková míra odezvy (zahrnující kompletní a parciální remise), kdy pozitivní odpověď korelovala spolu se zvyšujícími se dávkami. Navíc se u něj také prokázala inhibiční účinnost u tyrosinkinázového receptoru AXL, který je upregulován v maligních buňkách (včetně AML) a souvisí se špatnou prognózou (Kiyoi et al., 2020). Gilteritinib u pacientů *de novo* diagnostikovaných je zatím v první fázi studie a zkouší se jeho kombinace s indukční a konsolidační chemoterapií. Průběžné výsledky prozatím naznačují, že tento postup by mohl být proveditelný a bezpečný (Kennedy and Smith, 2020). Kvizartinib se ve studiích ukázal jako vysoce potentní a nadějně léčivo. Měl výrazně kladné výsledky v monoterapii (počáteční dávka 30 nebo 60 mg/den) u pacientů s AML s FLT3 mutací, kdy kompletní remise dosáhlo 47 % pacientů. Dávka 60 mg/den byla spojena i se 42% úspěšností týkající se přemostění k transplantaci kostní dřeně. Zkušenosti s kvizartinibem doposud jsou velice slibné a ukazuje se, že i v kombinaci s azacitidinem nebo nízkou dávkou cytarabinu u *de novo* diagnostikovaných AML pacientů s FLT3-ITD mutací jsou proveditelné a mají pozitivní výsledky. Je nutné ještě ve studiích pokračovat, aby se zjistilo celé spektrum účinku této molekuly, ale již nyní se ukazuje jako vysoce účinný FLT3-ITD inhibitor se slibnou klinickou strategií, což by mohlo vést k výrazně lepším klinickým výsledkům (Antar et al., 2020; Daver et al., 2019a; James et al., 2020; Wang, 2019).

## 3.2. Transportéry

Jedná se o proteiny, které jsou membránově vázané a zprostředkovávají přesun přes biologickou membránu, čímž zároveň také zajišťují buněčnou homeostázu. Jsou velmi hojně exprimovány v celém těle, zejména pak v epitelech hlavních orgánů jako například játra, střeva, ledviny nebo v orgánech s bariérovou funkcí jako například mozek, varlata nebo placenta. Existují také typy orgánově specifické, které zajišťují vstup i eliminaci endogenních a xenobiotických sloučenin (Nicholls, G., 2016).

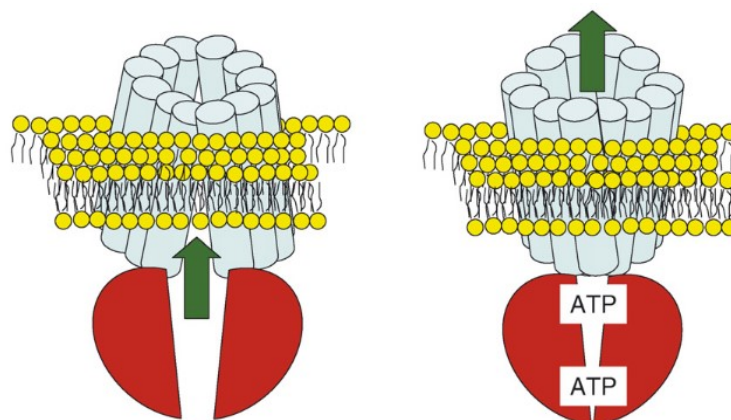
Máme dvě hlavní nadrodiny transportérů – a to ATP – vázající (ABC) transportéry a solute carrier (SLC) transportéry.

Většina SLC transportérů funguje jako influxní, některé ale fungují jako obousměrné a existují i transportéry z SLC nadrodiny fungující jako efluxní. Hydrofilní sloučeniny a sloučeniny s nábojem nesnadno procházejí membránou, a proto se pohybují pomocí kanálů, pump nebo právě transportérů. Jedná se o facilitativní nebo sekundárně aktivní transportéry – spoléhají se buď na elektrochemický gradient pro pohyb sloučenin přes membránu nebo na iontový gradient tvořený ATP dependentními pumpami. Tento transport přes membránu je proti koncentračnímu gradientu. Existují také typy spoléhající se na gradient vytvořený sekundárně aktivními transportéry nazývanými terciárně aktivní (např. organic anion transporter (OAT1)). U lidí bylo dosud objeveno 52 rodin SLC transportérů, konkrétně 456 druhů transmembránových proteinů. Tento typ je schopný interagovat s velkou škálou substrátů – organických i anorganických. Některé typy jsou vysoce selektivní, co se týče substrátu (např. aminokyselinové transportéry z rodiny SLC7), a některé jsou naopak velmi málo substrátově specifické (např. OAT transportéry z rodiny SLCO). Lišit se mohou i navzájem v jedné rodině – např. v rodině SLC22 se vyskytuje novel urate transporter 1 (URAT1) transportér selektivní pro kyselinu močovou, kdežto OAT1 nebo organic cation transporter (OCT) jsou velmi málo substrátově specifické a transportují celou řadu organických aniontů a kationtů – a to endogenní molekuly nebo třeba různá antivirotika (Lin et al., 2015; Nicholls, G., 2016; Song et al., 2020). Z nadrodiny SLC transportérů se budu věnovat hlavně dvěma konkrétním, a to organic cation/carnitine transporter novel 1 a 2 (OCTN1 a OCTN2), které byly součástí experimentální části mé práce.

Druhou skupinou jsou ABC transportéry. Víme o 49 transportních proteinech, zakódovaných v lidském genomu, které jsou rozřazeny do sedmi podrodin – ABCA až ABCG (Szakács et al., 2006). Všechny přenašeče této nadrodiny mají charakteristickou strukturu – a to dvě cytoplazmatické nukleotidové vazebné domény (NBD) vázající a hydrolyzující ATP, a dvě transmembránové domény (TMD) rozpoznávající a transportující substráty (Obr.3).

NBD struktury jsou charakteristické pro jednotlivé rodiny, kdežto TMD struktury jsou vysoce heterogenní i v rámci jedné rodiny, což podněcuje substrátovou specifičnost jednotlivých transportérů. Celá tato skupina ABC transportérů funguje díky hydrolýze ATP jako efluxní transportéry (bez ohledu

na koncentrační gradient). Transportují velkou škálu substrátů – ionty, polární, amfipatické a hydrofobní organické molekuly, peptidy, lipidy a malé proteiny. Mezi hlavní proteiny této skupiny patří P-glykoprotein (ABCB1/MDR1), breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP) a několik typů z rodiny ABCC (Dean et al., 2001; Nicholls, G., 2016; Robey et al., 2019). Dále se budu věnovat z nadrodiny ABC transportérů konkrétně ABCC4 z důvodu souvislosti s experimentální částí mé práce.



**Obrázek 3:** Schématické znázornění struktury a funkce ABC transportéru. Modře znázorněné transmembránové domény (TMD), žlutá je fosfolipidová dvojvrstva a dvě červeně znázorněné nukleotidové vazebné domény (NBD). V levé části obrázku jsou NBD otevřené a TMD směřují dovnitř buňky (transportér v neaktivním stavu). Na pravé straně je ABC transportér v efluxním stádiu, kdy TMD jsou otevřeny směrem vně a dochází tak k disociaci ligandu, a to díky NBD doménám, které vážou a hydrolyzují ATP; převzato z: (Szakács et al., 2008).

### 3.2.1. *SLC22A4* – OCTN1

Gen kódující OCTN1 transportér se nazývá *SLC22A4*. Jedná se o přenašeče organických kationtů. Je hojně exprimován v tkáních – např. na membráně kartáčového lemu v proximálním tubulu, lumenální straně epitelálních buněk dýchacích cest, v srdci, mozku, brzlíku, prostatě, rohovce, spermích nebo například CD14+ monocitech a mnoho dalších. Skládá se z 11 transmembránových domén. Může fungovat jako kationtový měnič, Na<sup>+</sup>-dependentní/non-dependentní přenašeč nebo jako organický kationt/proton výměník. Fyziologickým substrátem tohoto transportéru je aminokyselina ergothionein, mající antioxidační funkci – vychytává radikály a tím snižuje oxidační poškození buněk, L-karnitin (v malé míře), který hraje důležitou roli při transportu mastných kyselin do mitochondrií, a také transportuje nukleosidy do buňky (Kato et al., 2010). Mezi exogenní substráty transportéru patří například pregabalín a gabapentín, tiotropium a ipratropium, chinidín, doxorubicin, imatinib, metformin, oxaliplatin nebo například právě cytarabin a mnoho dalších. Cytarabin, jak je výše zmiňováno, se používá v základní linii chemoterapie pacientů s AML. Exprese tohoto transportéru

právě u myeloidních buněk hraje důležitou roli v odpovědi pacientů na terapii (Brecht et al., 2020; Drenberg et al., 2018; Gaborik et al., 2015).

### 3.2.2. *SLC22A5* – OCTN2

OCTN2 transportér je kódován *SLC22A5* genem. Je opět široce lokalizován v mnoha tkáních jako například apikální strana enterocytů, apikální strana proximálního tubulu v ledvinách, v kosterním svalstvu, oku, plicích, makrofázích, lymfocytech nebo v CNS a v dalších. Je složený z 12 transmembránových domén. Charakteristické pro tento transportér je jeho afinita, Na<sup>+</sup> závislost a pH citlivost. Hraje velice významnou roli v transportu L-karnitinu, kde je primárně zodpovědný za příjem této kvartérní amoniové sloučeniny do buněk – jako je vychytávání do adipocytů, srdečních myocytů, buněk kosterního svalstva, neuronů nebo mozku. Pouze játra a ledviny mají schopnost si L-karnitin biosyntetizovat, proto jsou ostatní tkáně vysoce závislé na absorpci ze střev pomocí OCTN2. Karnitin je životně důležitý pro oxidaci mastných kyselin v mitochondriích, pro udržování stability buněčné membrány acetylací fosfolipidů nebo pro antioxidantní účinky. U genu *SLC22A5* se často vyskytuje polymorfismus – některé jeho varianty jsou spojené například se zánětlivým onemocněním střev nebo s deficitem karnitinu a tím pádem s poruchou oxidace mastných kyselin, což může vést ke kardiomyopatii nebo hepatomegalii a dalším symptomům. Mezi exogenní substráty tohoto transportéru patří například tetraethylamonium (TEA), etoposid, tiotropium a ipratropium stejně jako pro OCTN1, spironolakton, beta-laktámová antibiotika nebo imatinib a další (Gaborik et al., 2015; Samodelov et al., 2020; Wang et al., 2020).

### 3.2.3. *ABCC4* – ABCC4

V ABCC podrodině nalezneme celkem 12 transportérů s různými funkcemi. Věnovat se budu konkrétně multidrug resistance-associated protein 4 (*ABCC4*/MRP4) transportéru – a to hlavně z důvodu zjištění jeho interakce s cytarabinem, deoxynukleosidovým analogem, používaným v terapii AML. Mezi hlavní problémy s neúspěchem terapie AML mimo jiné patří také rezistence vůči chemoterapeutikům. Efluxní transportéry se na tomto procesu výrazně podílejí, právě svou schopností aktivně vytlačit sloučeninu z buňky ven. Nadměrná exprese ABC transportérů v rakovinných buňkách je jednou z častých příčin mnohočetné lékové rezistence. Jedná se zejména o ABCB1, ABCG2, multidrug-resistance protein 1 (*ABCC1*/MRP1), ale například i *ABCC4* transportér. U *ABCC4* transportéru se kromě výše zmíněné lékové rezistence u AML hovoří také o souvislosti nedostatečné odpovědi na terapii kvůli jeho regulaci proliferace a diferenciaci leukemických buněk prostřednictvím cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Pravděpodobně se jedná o roli *ABCC4* v cAMP signalizaci v normálním vývoji krvetvorných buněk, kdy se právě hladiny exprese *ABCC4* transportéru snižují

během diferenciaci ke zralým leukocytům. U tohoto konkrétního typu proteinu je potvrzena omezená retence cytarabinu v AML buňkách, ale také schopnost inhibitoru ABCC4 transportéru sorafenibu tento fakt zvrátit (Dean et al., 2001; Drenberg et al., 2016; de Jonge-Peeters et al., 2007; Liu et al., 2018).

## 4. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo v první řadě zjistit kvantitativní množství genů námi zvolených transportérů u *de novo* diagnostikovaných pacientů na AML, a to *SLC22A4*, *SLC22A5* a *ABCC4* kódujících OCTN1, OCTN2 a ABCC4 transportéry a určit prediktivní vliv jednotlivých přenašečů na přežití pacientů. Důležitou částí bylo také porovnat množství transkriptů u jednotlivých pacientů na základě jejich klinických a diagnostických charakteristik – ELN klasifikace, FLT3 mutace a NPM1 mutace – a odhalit tak možnou souvislost prognostických markerů s expresí daného transmembránového přenašeče. V neposlední řadě jsme také prozkoumali vliv nových cílených léčiv, FLT3 inhibitorů, na OCTN1 transportér jak z hlediska funkčnosti, kde ale bylo potřeba si vhodnou metodu zavést a optimalizovat, tak i možného ovlivnění genové exprese.



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Materiál

#### 5.1.1. Přístroje

- Laminární box, Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Inkubátor, Sartorius AG (Göttingen, Německo)
- Centrifugy, Schoeller (Praha, Česká republika)
- Cykler pro reverzní transkripci a ddPCR, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Quantstudio 6 systém pro RT-PCR, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- ddPCR systém, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- HIDEX microplate reader, Hidex (Turku, Finsko)

#### 5.1.2. Chemikálie

- Fosfátový pufr (PBS), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS), Diagnostum (Ebsdorfergrund, Německo)
- Voda pro injekci (API), Braun (Frankfurt, Německo)
- TRI Reagent, Molecular research center (Cincinnati, OH, USA)
- Chloroform, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Isopropylalkohol, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Etanol absolutní, Penta (Praha, Česká republika)
- Revert-aid kit pro reverzní transkripci, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- RT-PCR Master mix, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- RT-PCR assay, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- ddPCR supermix, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Olej pro tvorbu kapiček, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Midostaurin, Scintila (Jihlava, Česká republika)
- Gilteritinib, Scintila (Jihlava, Česká republika)
- Verapamil, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium (ASP+), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

### 5.1.3. Buněčné linie

V experimentech, které jsem dělala v rámci mé diplomové práce, jsem používala Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) buněčnou linii – a to jak buňky transfekované genem nesoucím informaci pro expresi OCTN1 transportéru, tak i vektorovou kontrolu, u které je tento gen prázdný. Tyto buňky byly získány od Dr. Markuse Grubeho (Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Německo).

Druhou buněčnou linii, kterou jsem používala pro pozorování změny exprese OCTN1 transportéru na genové úrovni, je linie reprezentující akutní myeloidní leukemii s FLT3-ITD mutací – a to MV4-11. Tato linie byla pořízena z ATCC (American type culture collection, Rockville, MD, USA).

### 5.1.4. Pacienti

Ve spolupráci s 4. interní hematologickou klinikou Fakultní nemocnice v Hradci Králové byly získány vzorky periferní krve 28 pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií. Pomocí gradientové centrifugace byly z krve vyizolovány mononukleární buňky, které byly následně použity pro analýzu genové exprese. Klíčové charakteristiky pacientů jsou shrnuty v tabulce 3. Celkem bylo ve studii zahrnuto 13 žen a 15 mužů s mediánem věku 64 let. Deset pacientů (36 %) bylo pozitivních na FLT3 mutaci. Celková mortalita po dobu sledování byla 54%. Studie probíhala se souhlasem etické komise Fakultní nemocnice v Hradci Králové (číslo souhlasu 20L70S7 LLP) a vzorky byly poskytnuty a dále zpracovány pouze na základě informovaného souhlasu podepsaného pacientem.

**Tabulka 3:** Základní charakteristika pacientů zahrnutých do diplomové práce.

POHLAVÍ	VĚK	ELN KLASIFIKACE	KARYOTYP	GENETICKÉ MUTACE
Ž	64	neznámá	neznámý	FLT3-ITD, NPM1 A
M	51	střední	46 XY	Žádné
Ž	68	střední	46 XX	FLT3-ITD, NPM1 A
M	69	příznivá	46 XY	NPM1 A
M	54	střední	46 XY	FLT3-ITD, NPM1 A
M	65	příznivá	46 XY	AML1/ETO
Ž	74	příznivá	neznámý	FLT3-ITD, NPM1 A
M	64	nepříznivá	46 XY	FLT3-ITD
M	67	nepříznivá	44,XY,del(2)(q?21q?31),del(5)(q12q34),del(6)(q21q25),add(8)(q24),der(9)t(8?;9),dic(16)t(16;17)(?;q10),del(20q) [25]	TP53

M	64	střední	46,XY,t(1;3)(p36;q21),der(1)t(1;3)(p36;q21)[25]	žádné
Ž	68	nepříznivá	44,XX,- 2,del(5)(q21q34),der(13)t(2;13;?), ?del(17p),-18,del(20)(q12)[30]	TP53
M	54	střední	46 XY	FLT3-ITD
Ž	59	střední	46 XX	NPM1 D
Ž	66	střední	46 XX	FLT3-ITD, NPM1 D
M	28	střední	46 XY	FLT3-ITD, NPM1 A
Ž	70	střední	46 XX	žádné
M	32	střední	46 XY	NPM1 A
Ž	68	nepříznivá	44,XX,del(5)(q13q34),+6,-7,- 10,+der(11)t(11;11),-15,- 16,add(17)(p13),-18,+20[24]/46,XX[1]	žádné
M	67	příznivá	46,XY,der(2;8;21)[28]/46,XY[2]	AML1/ETO
M	30	nepříznivá	46 XY	NPM1 A
Ž	73	nepříznivá	76-91<4n>,XX,-X,- 8,i(17)(q10),del(X)(q?),+1-3 mar[cp16]/46,XX[4]	žádné
Ž	60	střední	46 XX	Žádné
Ž	47	nepříznivá	46 XX	FLT3-ITD, NPM1 A
Ž	76	střední	46,XX, t(9,11)	KMT2A/MLLT3
M	23	střední	46 XY	MLL-PTD
Ž	60	nepříznivá	47,XX,+1q,add(19)(p13),del(20q)[5]/4 7,XX, idem, t(2;9)(q14;p24),del(13)(q13)[10]	žádné
M	41	nepříznivá	46 XY	FLT3-ITD
M	78	neznámá	neznámý	neznámé

## 5.2. Metody

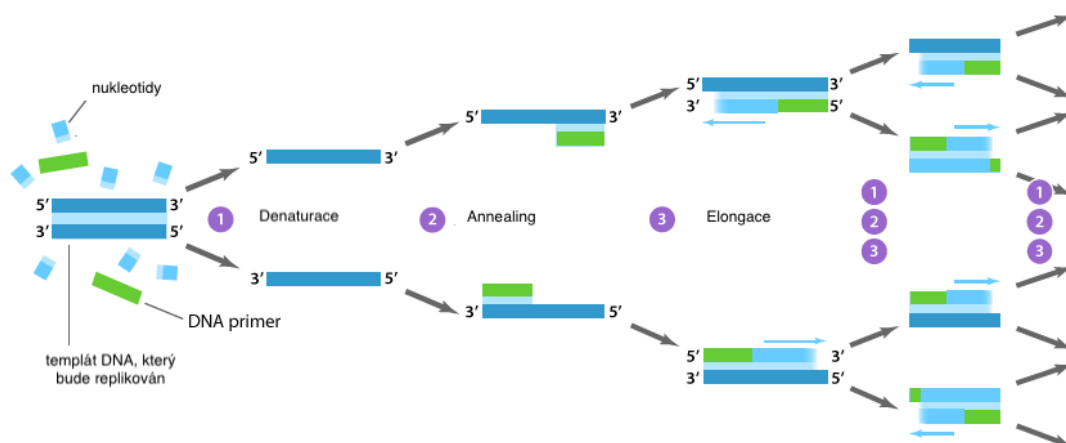
### 5.2.1. Izolace RNA, reverzní transkripce a RT-PCR

Prvním krokem izolace RNA je homogenizace buněk. Suspenzní buňky stočíme do pelety, centrifugace probíhá 5 minut při 150 × g. Dále odsajeme médium a přidáme 1 ml TRI Reagentu na

1 000 000 buněk a následně je několikrát propipetujeme. Tento vzorek necháme po dobu 5 minut stát při pokojové teplotě. Poté přidáme 200  $\mu$ l chloroformu na 1 ml vzorku a důkladně protřepeme. Vzorek opět necháme stát při pokojové teplotě zhruba 10-15 minut. Po uplynutí této doby následuje centrifugace při 4°C, 12 000  $\times$  g a to po dobu 15 minut. V tomto kroku izolace dojde k rozdělení vzorku na 3 fáze – horní vodná bezbarvá obsahující RNA, mezifáze obsahující DNA a spodní barevná organická fáze obsahující proteiny. Pro nás potřebnou horní vodnou fázi s RNA přeneseme do nové zkumavky, přidáme 500  $\mu$ l isopropylalkoholu na 1 ml TRI Reagentu a důkladně promísíme. Zkumavku necháme stát při pokojové teplotě 10 minut a poté zcentrifugujeme při 4°C, 12 000  $\times$  g opět po dobu 10 minut. V tomto kroku dojde k precipitaci RNA a k vytvoření pelety na dně zkumavky. Pro dosažení dostatečné čistoty RNA v peletě ji dvakrát promyjeme 75% etanolem. Po finálním odsátí etanolu necháme peletu při pokojové teplotě sušit a následně ji rozpustíme ve 20  $\mu$ l vody na injekci. Pomocí spektrofotometru stanovíme čistotu a koncentraci námi vyzolované celkové RNA.

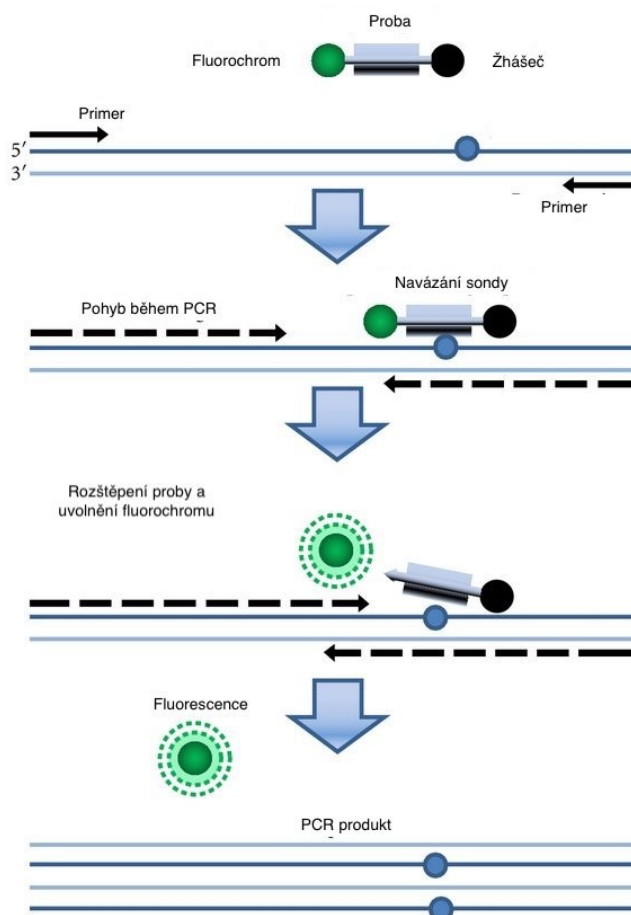
Při reverzní transkripci dochází k přepisu mRNA do cDNA. Z mononukleárních buněk ale vyzolujeme veškerou RNA, a proto do reakce k templátu RNA použijeme primer, který rozpozná charakteristické poly-adenylové konce mRNA (oligo-dT primer) a vodu. K reakci přidáme reakční pufr, RNAsový inhibitor, dNTP mix a enzym reverzní transkriptázu. Po hodinové inkubaci při 42°C získáme templát cDNA, který následně použijeme jako vstupní materiál do PCR metody.

Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR metody) několikanásobně zmnožíme a následně detekujeme námi vybrané geny (Obr. 4).



**Obrázek 4:** Princip RT-PCR metody. Na začátku reakce máme templát DNA, ke kterému přidáme reakční komponenty. Tato metoda probíhá v cyklech a každý z nich se pak skládá z následujících fází – denaturace, kdy dojde k oddělení dvou řetězců; následuje annealing, tedy připojení specifického primeru pro gen, který chceme amplifikovat; a poté elongace, kdy DNA polymeráza syntetizuje vláknko DNA ve směru 5'-3'. V n-tém cyklu následuje to stejné a na konci reakce vznikne  $2^n$  množství amplifikovaného genu; převzato a upraveno z: (Bechling, 2022)

Do reakce kromě templátu cDNA přidáme ještě master mix (obsahující nukleotidy, polymerázu atd.), assay obsahující specifické primery a sondu (proba) tvořenou komplementární oligonukleotidovou sekvencí k cílovému genu, na kterou jsou připojeny fluorochrom a žhášeč – díky které můžeme poté detekovat fluorescenci a  $C_t$  hodnotu (cyklus, ve kterém nárůst fluorescence překročí prahovou hodnotu) (Obr. 5).



**Obrázek 5:** Princip funkce sondy. Proba je tvořená fluorochromem a žhášečem, které jsou navázané na komplementární úsek k nám zvolenému cílovému genu. Při amplifikaci dojde vlivem exonukleázové aktivity Taq-DNA polymerázy k rozštěpení těchto dvou složek a k fluorescenci, kterou můžeme detekovat při překročení prahové hodnoty –  $C_t$  hodnota; převzato a upraveno z: (Bass et al., 2010)

### 5.2.2. Dropletová digitální PCR

Dropletová digitální polymerázová řetězová reakce (ddPCR) je varianta PCR metody, díky které můžeme přímo kvantifikovat počet kopií daného úseku genu kódujícího nám zvolený transportér. Do reakce použijeme víceméně stejné komponenty jako do RT-PCR metody a to – supermix, assay, templát cDNA a vodu. Poté v kombinaci se speciálním olejem vytvoříme až 20 tisíc kapek, které následně

opatrně přepipetujeme do destičky. V těchto kapkách izolovaně buď proběhne nebo neproběhne PCR reakce v závislosti na tom, zda se v templátu uzavřeném uvnitř kapky vyskytuje či nevyskytuje úsek cílového genu. Experiment je následně vyhodnocován pomocí přístroje na bázi průtokového cytometru, kdy na základě počtu kapek, ve kterých PCR reakce proběhla či nikoliv, určíme počet kopií testovaného genu. V této práci jsme provedli absolutní kvantifikaci jak genů kódujících testované transportéry, tak housekeepingového genu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (*GAPDH*) u referenčního vzorku, který byl stanovován na všech RT-PCR reakcích a sloužil spolu s příslušnými efektivitami reakce jako podklad pro výpočet absolutního počtu kopií všech genů u všech vzorků.

### 5.2.3. Kultivace buněk

Po rozmrazení buněčné linie MDCKII – OCTN1 a kontrolní MDCKII linie následuje jejich kultivace. Buňky se uchovávají v inkubátoru při konstantní teplotě 37°C ve stabilní atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> a se stabilní vlhkostí. Při 85-90% konfluenci se buňky musí pasážovat, jinak by došlo k jejich přemnožení, vyčerpání veškerých živin z média a hrozí i riziko změny jejich buněčného cyklu a tím pádem jejich nepoužitelnosti na pokus.

Jedná se o přisedlou buněčnou linii, proto můžeme po kontrole jejich konfluenci odsát staré médium. Následuje jejich opláchnutí 5 ml PBS zahřátého na 37°C (z důvodu, aby buňky nedostaly teplotní šok). PBS se poté opět odsaje – používá se kvůli odstranění nežádoucích nečistot (např. mrtvých buněk) a zbytků média v kombinaci s FBS (to by v dalším kroku reagovalo s trypsinem a deaktivovalo by ho). Navazující krok zahrnuje přidání 750 µl trypsinu do 25 cm<sup>2</sup> lahve. Po uvolnění všech buněk ode dna kultivační lahve se přidá 4,25 ml DMEM a buňky se řádně rozsuspendují. Poté se odebere požadované množství suspenze a přendá se do nové malé lahve s již připraveným DMEM. Pasážovací poměr do malé a velké lahve je 1:25.

Na rozdíl od MDCKII linie, MV4-11 jsou suspenzní buňky, a tak se postup při jejich kultivaci liší. Jejich uchovávání probíhá za stejných podmínek jako u MDCKII, tedy 37°C, atmosféra s 5% CO<sub>2</sub> a se stabilní vlhkostí. Jelikož však nelze pozorováním pod mikroskopem snadno určit denzitu, buňky spočítáme a necháme stočit na 5 minut při 150 × g, abychom získali buněčnou peletu a zároveň v supernatantu starého média zůstaly fragmenty mrtvých buněk. Peletu rozsuspendujeme a část buněk přeneseme do lahve s čerstvým médiem – v tomto případě se používá IMDM médium opět s 10% FBS. Optimální denzita buněk je mezi 200 tisíci a 1 milionem buněk na 1 ml a pro její udržení je dostačující pasážovat dvakrát týdně.

#### 5.2.4. Změna genové exprese u MV4-11 buněk

Abychom zjistili, zda inhibice FLT3 povede ke změně exprese námi studovaných transportérů, vystavili jsme buňky MV4-11 působení midostaurinu a gilteritinibu v koncentracích, které přibližně odpovídají volné frakci plasmatické hladiny při standardním dávkování. Každých 24 hodin jsme měnili médium a v čase 48 a 72 hodin jsme milion buněk lyzovali pomocí TRI reagentu. Následně jsme izolovali RNA, provedli reverzní transkripci a RT-PCR (obecný postup viz 3.2.2). Rozdíl exprese *SLC22A4*, *SLC22A5* a *ABCC4* u buněk exponovaných léčivům vůči kontrolním buňkám byl stanoven pomocí  $\Delta\Delta C_t$  metody, přičemž jako referenční gen byl opět použit *GAPDH*.

#### 5.2.5. Kinetika akumulace ASP+

Možnou interakci mezi gilteritinibem a midostaurinem s OCTN1 transportérem na funkční úrovni jsme ověřili pomocí metody kinetiky akumulace modelového fluorescenčního substrátu ASP+ u MDCKII–OCTN1 buněk a v kontrolní linii. Jako modelový inhibitor jsme použili verapamil. Nejprve jsme akumulaci sledovali v čase a fluorescenci pomocí ASP+ jsme detekovali pomocí fluorimetru.

Buňky pro pokus nasadíme v počtu 50 000 na jamku v objemu 100  $\mu$ l na 96 jamkovou destičku a následně inkubujeme 24 hodin do 100% konfluence. Pro zajištění dostatečné čistoty je důležité po odsátí média buňky několikrát opláchnout zahřátým PBS. Následně jsme si připravili koncentrační řadu selektivních inhibitorů FLT3 mutace midostaurinu a gilteritinibu a přidali je k buňkám – u midostaurinu od 0,1  $\mu$ M, přes 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M až k 5  $\mu$ M a u gilteritinibu od 0,1  $\mu$ M, přes 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M až k 50  $\mu$ M. Ty se poté nechali společně inkubovat 15 minut při 37°C ve stabilní atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> a konstantní vlhkostí. Ihned poté se k buňkám s léčivý přidá modelový substrát ASP+ a změří se fluorescence při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Tím zjistíme možnou inhibici OCTN1 transportéru námi zvolenými léčivy.

### 5.3. Statistická analýza dat

Expresi sledovaných cílových genů u AML pacientů jsme přepočítali na absolutní počet kopií na základě počtů kopií v referenčním vzorku, který jsme zjistili pomocí ddPCR. Referenční vzorek byl dále použit u všech RT-PCR reakcí, a to ve třech různých koncentracích, aby mohla být zároveň spočítána efektivita pro každou assay v jednotlivých RT-PCR reakcích. Po testování třech různých housekeepingových genů (beta-2-mikroglobulin (*B2M*), *GAPDH* a hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza (*HPRT1*)) byl za pomoci RefFinder analýzy vyhodnocen jako optimální referenční gen *GAPDH*. Stejným způsobem jako pro cílové geny byl každý AML vzorek analyzován pro

housekeepingový gen *GAPDH* a počty kopií cílových genů byly pro přehlednou prezentaci dat vyjádřeny jako počet kopií na 1000 kopií referenčního genu *GAPDH*.

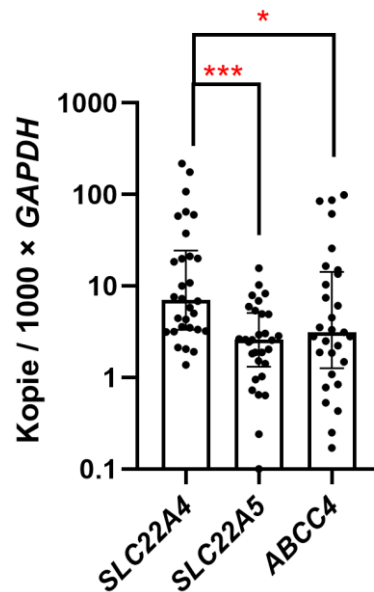
K vyhodnocení křivek přežití jsme použili Kaplan-Meierovu analýzu, přičemž parametry jako poměr rizik byl získán pomocí Log-rank (tzv. Mantel-Coxova) testu. Korelace mezi expresemi genů jsme vyhodnocovali prostřednictvím lineární regrese. U pokusů vyžadujících testování nulové hypotézy jsme použili neparametrický Mann-Whitneyův (2 subpopulace), nebo Kruskal-Wallisův (3 a více subpopulací) test v případě patientských vzorků. U buněčných experimentů pak analogicky probíhaly analýzy parametrickým t-testem, respektive ANOVA analýzou s Dunettovým post hoc testem pro porovnání testovaných vzorků vůči kontrole. Ve všech případech byla hladina pro určení statistické významnosti nastavena jako  $p < 0,05$ .



## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. RT-PCR

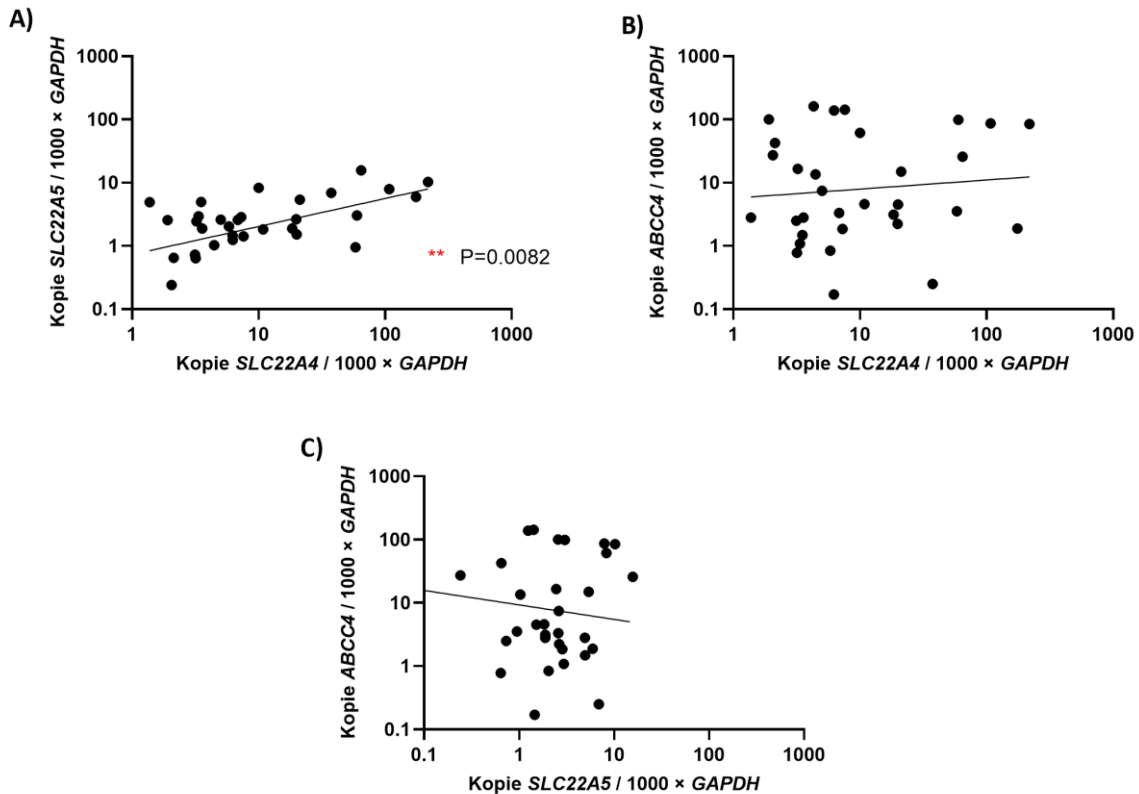
Veškeré výsledky z RT-PCR metody jsme normalizovali na 1000 kopií housekeepingového genu *GAPDH*. A to z důvodu, že tento gen je exprimován ve všech leukemických buňkách u AML stejně a díky tomu můžeme normalizovat množství vložené cDNA a následně tím zkreslené Ct.



**Obrázek 6:** Porovnání exprese vybraných transportérů, a to OCTN1 (*SLC22A4*), OCTN2 (*SLC22A5*) a ABCC4 (*ABCC4*) u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilové rozpětí. Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallisova testu, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Z hlediska absolutního počtu kopií je nejvíce exprimovaný transportér OCTN1. Medián u množství OCTN1 transportéru je 8,50 kopií genu na 1000 kopií *GAPDH*, u OCTN2 transportéru 4,11 a u ABCC4 transportéru 4,96. Maximální hodnota množství genu kódujícího OCTN1 transportér je 2,34 kopií na 1000 kopií *GAPDH*, kdežto u OCTN2 transportéru je to 1,20 kopií genu na 1000 kopií *GAPDH*. Signifikantní rozdíly v mediánu exprese jsou zaznamenány mezi OCTN1 a OCTN2 transportérem ( $p < 0,001$ ) a mezi OCTN1 a ABCC4 transportérem ( $p < 0,05$ ). Dále jsme se zaměřili na identifikaci variability pacientů z pohledu jednotlivých transportérů. Výrazná interindividuální variabilita – a to až v rámci dvou až tří řádů – je zaznamenána u OCTN1 a ABCC4 transportérů, kdežto u OCTN2 je variabilita nižší, pouze v rámci jednoho až dvou řádů (Obr. 6).

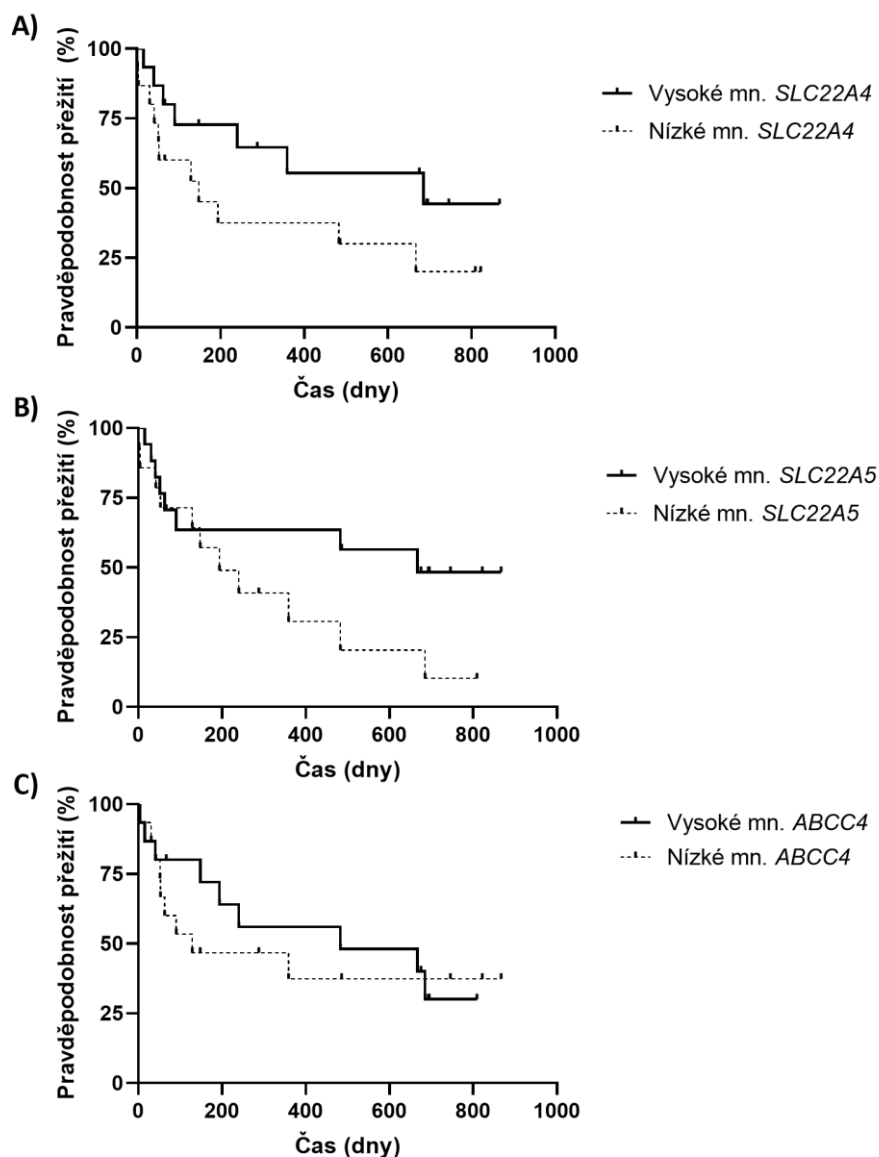
Pro zjištění souvislostí mezi jednotlivými transportéry jsme si udělali jejich vzájemnou korelaci (Obr. 7).



**Obrázek 7:** Korelace mezi expresí jednotlivých transportérů u pacientů s AML. Korelace mezi OCTN1 (*SLC22A4*) a OCTN2 (*SLC22A5*) transportérem – A, mezi OCTN1 (*SLC22A4*) a ABCC4 (*ABCC4*) transportérem – B a mezi OCTN2 (*SLC22A5*) a ABCC4 (*ABCC4*) transportérem – C. Statistická analýza byla provedena pomocí lineární regrese, \*\* $p < 0,01$ .

Při zjišťování vzájemné korelace jednotlivých transportérů u pacientů byla signifikantní závislost zaznamenána pouze u OCTN1 a OCTN2 transportéru ( $p < 0,01$ ). Mezi ABCC4 a oběma OCTN nebyla signifikance zaznamenána – jsou tedy exprimovány nezávisle na sobě.

Klinická data získaná z FNHK a výsledky z PCR metody jsme také využili k tvorbě Kaplan-Meierových křivek přežití a zkoumali tak možnou existující vzájemnou souvislost množství námi studovaných transportérů a přežití pacientů. Nejprve jsme pacienty rozdělili do dvou skupin, a to podle mediánu na pacienty s vysokou a nízkou expresí daného transportéru (Obr. 8).

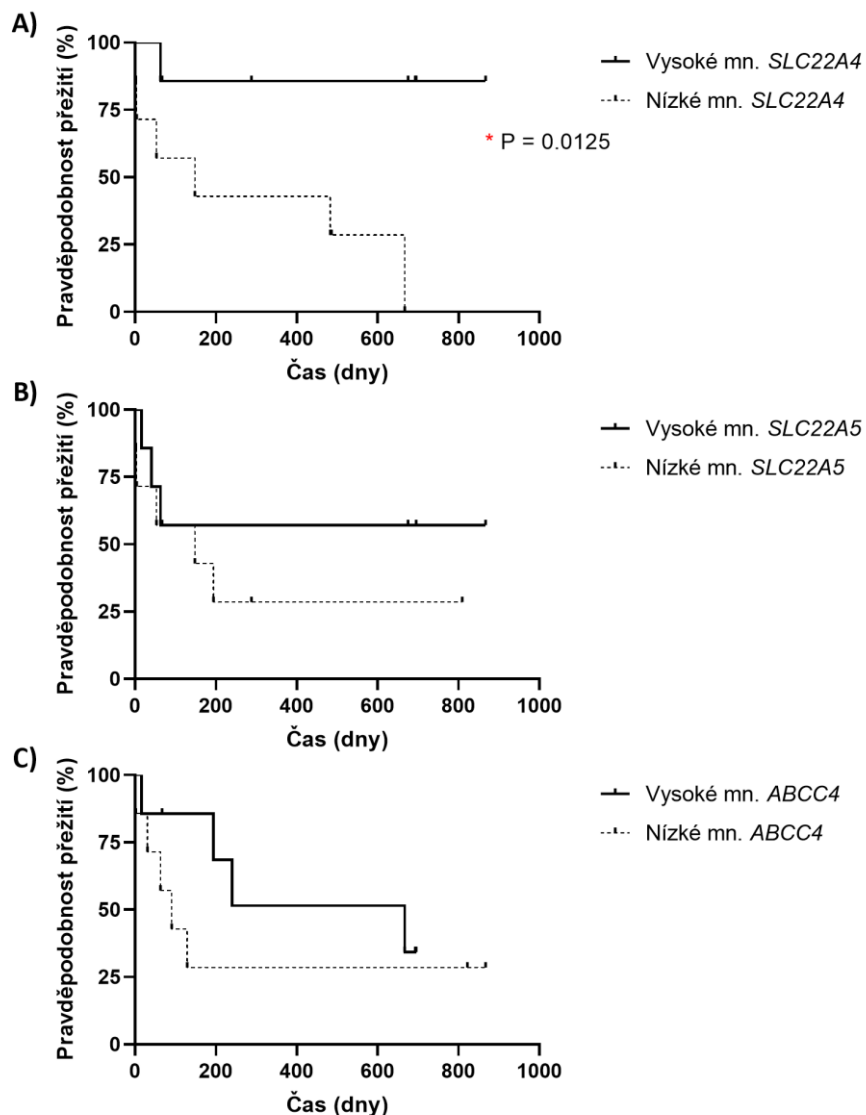


**Obrázek 8:** Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů v závislosti na množství exprese daných transportérů – rozdělení dle mediánu na vysoké a nízké množství OCTN1 (*SLC22A4*) transportéru – A, OCTN2 (*SLC22A5*) transportéru – B a ABCC4 (*ABCC4*) transportéru – C. Statistická významnost byla určena pomocí Log-rank (Mantel-Coxova) testu.

Ani u jednoho transportéru nám nevyšel signifikantní rozdíl v přežití pacientů na základě množství studovaných transportérů. Signifikance se nejvíce blížila u OCTN1 transportéru ( $p = 0,1135$ ). Medián přežití pacientů s vysokou expresí OCTN1 transportéru je 658 dní, kdežto u pacientů s nízkou expresí tohoto transportéru pouze 148 dní. Poměr rizik (hazard ratio, HR) je 0,475, tedy riziko úmrtí u pacientů s vyšším množstvím OCTN1 je o 52,46 % nižší (Obr. 8 – A). Podobné výsledky jsme pozorovali i pro OCTN2, kdy mediány přežití jsou 667, respektive 194 dní pro pacienty s vysokým a nízkým množstvím

OCTN2. Poměr rizik mezi vysokým a nízkým množstvím OCTN2 transportéru je pak 0,490 (Obr 8 – B). Medián přežití u vysokého množství ABCC4 transportéru je 483 dní, u nízkého množství 129 dní. HR mezi vysokým a nízkým množstvím ABCC4 je 0,828, tedy vysoké množství u těchto pacientů riziko úmrtí snížilo o 17,2 % (Obr. 8 – C).

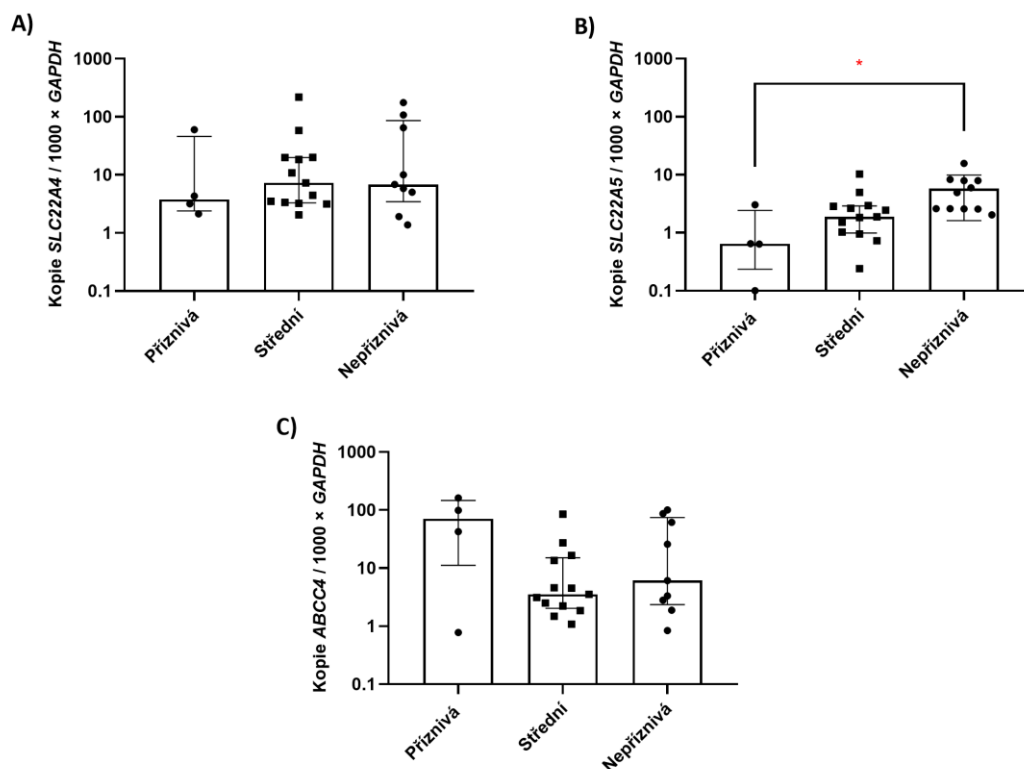
Pro zamezení zkreslení výsledků analýzy způsobené pacienty se střední expresí okolo mediánu jsme poté použili pouze první a čtvrtý kvartil – tedy pacienty s nejvyšší expresí daného transportéru a pacienty s nejnižší expresí.



**Obrázek 9:** Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů rozdělených do kvartilů a porovnání prvního (tedy nejvyšší množství daného transportéru) a čtvrtého (tedy nejnižší množství daného transportéru) kvartilu exprese OCTN1 (*SLC22A4*) transportéru – A, OCTN2 (*SLC22A5*) transportéru – B a ABCC4 (*ABCC4*) transportéru – C. Statistická významnost byla určena pomocí Log-rank (Mantel-Coxova) testu,  $*p < 0,05$ .

Při analýze přežití s využitím pouze prvního a čtvrtého kvartilu jsme zaznamenali signifikanci u OCTN1 (*SLC22A4*) transportéru ( $p < 0,05$ ). V prvním kvartilu (s vysokým množstvím OCTN1 transportéru) zemřel pouze jeden pacient, kdežto v kvartilu čtvrtém (s nízkým počtem OCTN1 transportéru) zemřelo pacientů šest. Poměr rizik je 0,112, tedy vyšší množství OCTN1 transportéru snížilo riziko úmrtí o 88,8 % (Obr. 9 – A). Ti s vyšším množstvím OCTN1 transportéru mají delší dobu přežití oproti pacientům s nízkým množstvím. OCTN1 transportér je tedy prediktivní marker pro prognózu a přežití pacientů. U kvartilů týkajících se OCTN2 transportéru (Obr. 9 – B), je poměr rizik 0,556, tedy vyšší množství OCTN2 transportéru snížilo riziko úmrtí o 44,4 %. Ve skupině s vysokým množstvím OCTN2 transportéru zemřeli tři pacienti, s nízkým množstvím zemřelo pacientů pět. Poměr rizik mezi skupinou s vysokým a nízkým množstvím ABCC4 transportéru je 0,573, tedy vysoké množství ABCC4 transportéru snížilo riziko úmrtí o 42,7 % a stejně jako u OCTN2 nebylo dosaženo statistické významnosti (Obr. 9 - C).

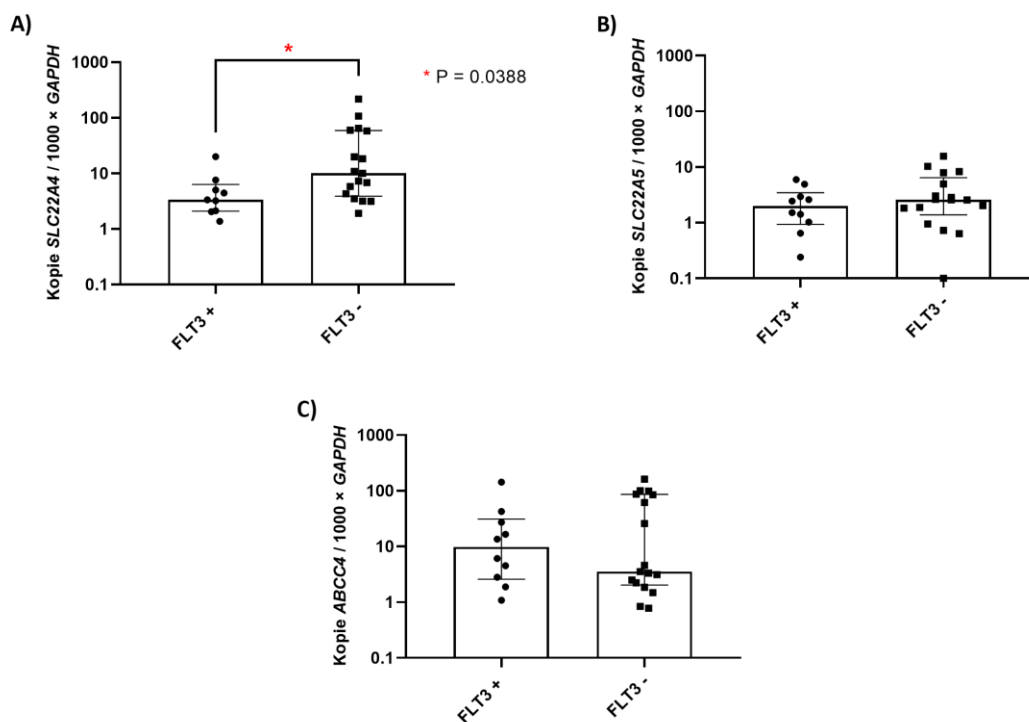
Při diagnostice jsou pacienti s AML rozděleni dle ELN stratifikace – na prognózu příznivou, střední a nepříznivou. Porovnali jsme si takto rozdělené pacienty v závislosti na jednotlivých transportérech a hledali jsme možnou existující souvislost (Obr. 10).



**Obrázek 10:** Expres studovaných transportérů v rámci diagnostických skupin pacientů dle stratifikace ELN (European LeukemiaNet) na prognózu příznivou, střední a nepříznivou v závislosti na jednotlivých transportérech – OCTN1 (*SLC22A4*) – A, OCTN2 (*SLC22A5*) – B, ABCC4 (*ABCC4*) – C. Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilové rozpětí. Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallisova testu, \* $p < 0,05$ .

Medián exprese genu kódujícího OCTN1 transportér u pacientů je ve všech ELN kategoriích srovnatelný (Obr. 10 – A). Vzestupný trend se zhoršující se prognózou jsme naopak pozorovali u OCTN2 transportéru. Medián v příznivé kategorii je 0,645, u střední prognózy je to 1,88 a u nepříznivé 4,92 kopií na 1000 kopií *GAPDH* (Obr. 10 – B). Statisticky signifikantní rozdíl byl zaznamenán mezi příznivou a nepříznivou prognózou pacientů ( $p < 0,05$ ). Výrazně nejvyšší hodnota mediánu u *ABCC4* transportéru je u příznivé prognózy – 70,51 kopií na 1000 kopií *GAPDH*. U střední a nepříznivé prognózy se počet pohybuje v řádu jednotek – 3,54 a 6,10 kopií na 1000 kopií *GAPDH*. Vzhledem k rozsahu hodnot a nízkému počtu pacientů ve skupině s příznivou prognózou jsme však nedosáhli statistické významnosti (Obr. 10 – C).

Klíčovým negativním prognostickým markerem AML je FLT3 mutace. Ta se mimo jiné také zahrnuje právě do kritérii, podle kterých se pacienti rozdělují do výše zmíněných skupin dle ELN. Z tohoto důvodu jsme si pacienty rozdělili dle negativity/pozitivity na FLT3 mutaci a hledali tak možné detailnější souvislosti mezi studovanými transportéry a FLT3 mutací (Obr. 11).

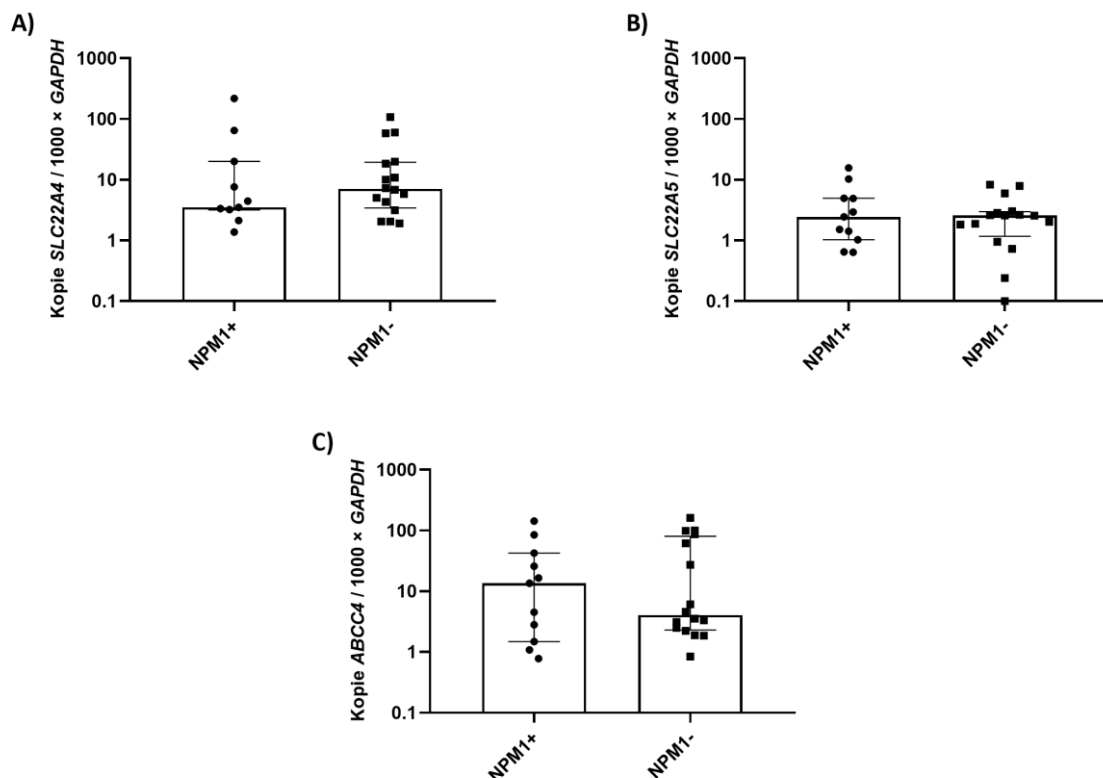


**Obrázek 11:** Expres jednotlivých transportérů – OCTN1 (*SLC22A4*) – A, OCTN2 (*SLC22A5*) – B a *ABCC4* (*ABCC4*) – C u pacientů rozdělených dle negativity/pozitivity na FLT3 mutaci. Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilové rozpětí. Statistická analýza byla provedena pomocí Mann-Whitneyho testu,  $*p < 0,05$ .

Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze mezi expresí OCTN1 transportéru a přítomností FLT3 mutace, kde pacienti diagnostikovaní jako FLT3+ mají významně menší množství OCTN1. Medián

množství kopií u těchto pacientů je 3,36 na 1000 kopií *GAPDH*, rozmezí je pak mezi 1,38 a 19,96 kopiemi na 1000 kopií *GAPDH*. U pacientů negativních na FLT3 mutaci je medián množství 10,02 kopií na 1000 kopií *GAPDH*, tedy třikrát vyšší než u FLT3 mutovaných. Minimální exprese v této skupině byla 1,91 kopií a maximum pak 218,6 kopií na 1000 kopií *GAPDH* (Obr. 11 – A). Tento výsledek potvrzuje fakt, že FLT3 mutace je vedena jako negativní prognostický marker, jelikož přes OCTN1 transportér se dostává cytarabin do buněk, a zároveň potvrzuje trend vystupující z Kaplan-Meierových křivek přežití, a to ten, že u pacientů s menším množstvím OCTN1 transportéru je vyšší mortalita. U dalších dvou transportérů, OCTN2 a ABCC4 (Obr. 11 – B, C), nebyla zaznamenána statistická významnost.

Dále jsme se podívali i na opačný, tedy pozitivní marker pro pacienty – a to NPM1 mutaci, zda i tady nenalezneme signifikantní souvislost. I ta patří mezi jedny z kritérií, podle kterých se pacienti rozřazují do ELN stratifikace.



**Obrázek 12:** Expresa studovaných transportérů po rozdělení pacientů na základě positivity/negativity NPM1 mutace– OCTN1 (*SLC22A4*) – A, OCTN2 (*SLC22A5*) – B a ABCC4 (*ABCC4*) – C. Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilové rozpětí. Statistická analýza byla provedena pomocí Mann-Whitneyho testu.

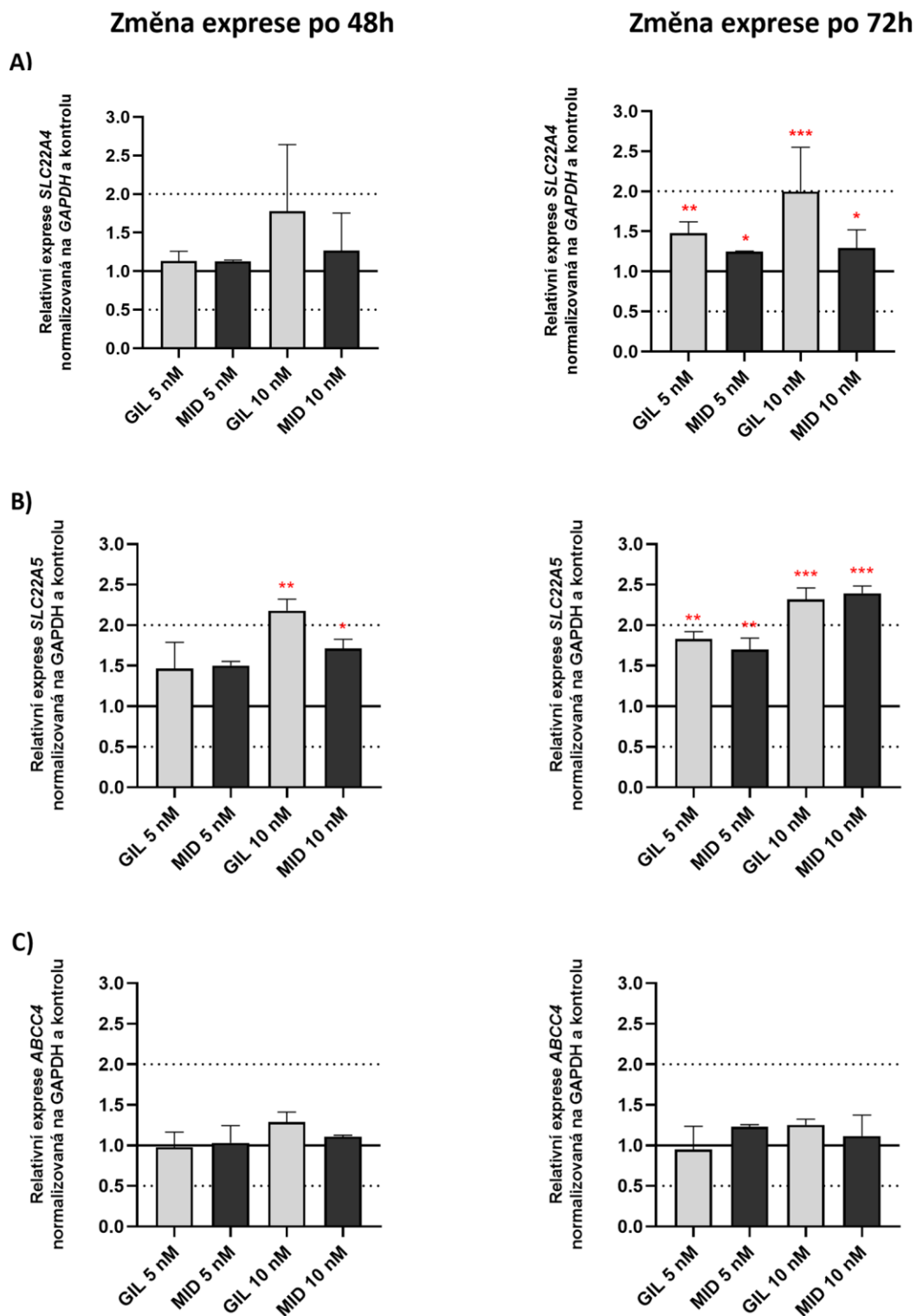
U OCTN1 a OCTN2 transportéru jsou rozdíly v mediánu exprese na základě statutu NPM1 minimální (Obr. 12 – A, B). Naopak rozdíl exprese ABCC4 transportéru je u pacientů z pohledu NPM1 mutace výraznější než u genů kódujících OCTN transportéry. Medián množství kopií u pacientů

s pozitivitou na NPM1 mutaci je 13,56 kopií na 1000 kopií *GAPDH*, kdežto u pacientů s negativitou je to 3,33krát méně. Vzhledem k podobnému rozsahu v obou populacích však nepozorujeme statistickou významnost. Zajímavé je i netypické rozdělení pacientů do dvou skupin – v jedné skupině pacienti s expresí v rámci jednotek a v druhé pacienti s expresí v rámci desítek až stovek (Obr 12 – C). U pozitivního prognostického markeru, NPM1 mutace, tedy nebyla v souvislosti s žádným transportérem nalezena signifikantní závislost (Obr. 12).

## **6.2. Změna genové exprese u MV4-11**

Na základě výsledku z RT-PCR metody jsme se rozhodli udělat experimenty zkoumající vliv selektivních inhibitorů FLT3 mutace a jejich možného ovlivnění OCTN1, OCTN2 a ABCC4 transportéru jak z hlediska exprese, tak i funkčnosti. Co se týče ABCC4 transportéru, tak jsme u něj nezaznamenali změny exprese po 48 ani po 72 hodinách expozice midostaurinu a gilteritinibu (Obr. 13 – C). Statisticky významné změny jsme dosáhli u OCTN1 transportéru po 72 hodinách, nicméně zvýšení exprese na úrovni mRNA zde nepřesáhlo dvojnásobek oproti kontrole (Obr. 13 – A). Nejvýraznější změny jsme pozorovali u OCTN2 transportéru, kde došlo k signifikantnímu zvýšení exprese už po 48 hodinách u 10 nM gilteritinibu. K více než dvojnásobnému zvýšení exprese pak došlo po 72 hodinové expozici oběma léčivům v 10 nM koncentraci (Obr. 13 -B).

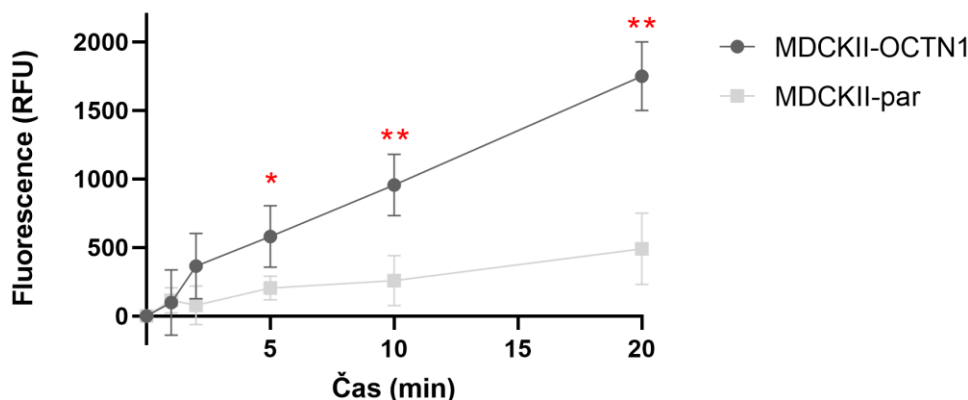




**Obrázek 13:** Změna exprese studovaných transportéru u MV4-11 buněk vystavených působení gilteritinibu (GIL) a midostaurinu (MID) po 48 a 72 hodin – OCTN1 (*SLC22A4*) – A, OCTN2 (*SLC22A5*) – B, ABCC4 (*ABCC4*) – C. Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka. Statistická analýza byla provedena pomocí ANOVA testu s Dunettovým post hoc testem, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 6.3. Kinetika akumulace ASP+

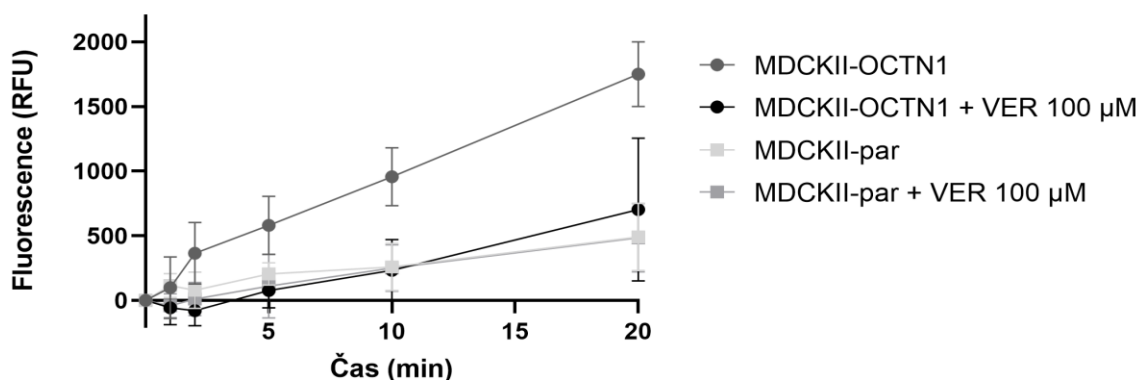
Z funkčního hlediska jsme využili akumulční studii s modelovým substrátem ASP+, nejdříve jsme si ale tuto metodu optimalizovali. To z toho důvodu, abychom se ujistili o prostupu modelového substrátu ASP+ do buněk přes OCTN1 transportér a znali i optimální čas, v kterém již akumulace vyznačuje signifikanci oproti kontrolní linii.



**Obrázek 14:** Akumulace modelového substrátu ASP+ v čase u MDCKII – OCTN1 buněk a v kontrolní linii (MDCKII – par). Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Signifikance u modelového substrátu byla zaznamenána od páté minuty akumulace dál u MDCKII–OCTN1 buněk. Postupná akumulace substrátu i u kontrolní linie je dána prostupem na základě transportérové výbavy ledvinných MDCKII buněk, proto hodnoty nejsou úplně nulové (Obr. 14).

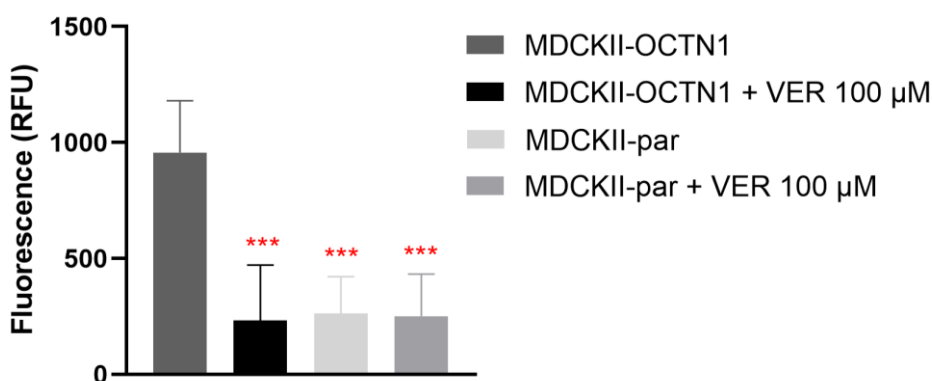
Jako modelový inhibitor jsme vybrali 100  $\mu\text{M}$  verapamil a otestovali jeho efekt u MDCKII – OCTN1 buněk, a i u kontrolní linie.



**Obrázek 15:** Akumulační studie v kombinaci s použitím modelového inhibitoru verapamilu pro zajištění negativní kontroly pokusu. Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka.

Negativní kontrola se u akumulční studie využívá z toho důvodu, abychom u MDCKII – OCTN1 buněk ověřili prostupnost substrátu převážně tímto transportérem. To se nám podařilo potvrdit, jelikož při kombinaci MDCKII – OCTN1 buněk s verapamilem došlo ke snížení akumulace na úroveň kontrolní linie. Při kombinaci kontrolní linie s verapamilem nedošlo k žádné změně – tím jsme ověřili, že verapamil inhibuje vstup ASP+ do buněk právě výhradně skrze lidský OCTN1 transportér (Obr. 15).

Detailnější znázornění změny množství akumulčního substrátu ASP+ v MDCKII-OCTN1 buňkách v porovnání s kontrolní linií v 10. minutě inkubace je vidět na obrázku níže (Obr. 16).



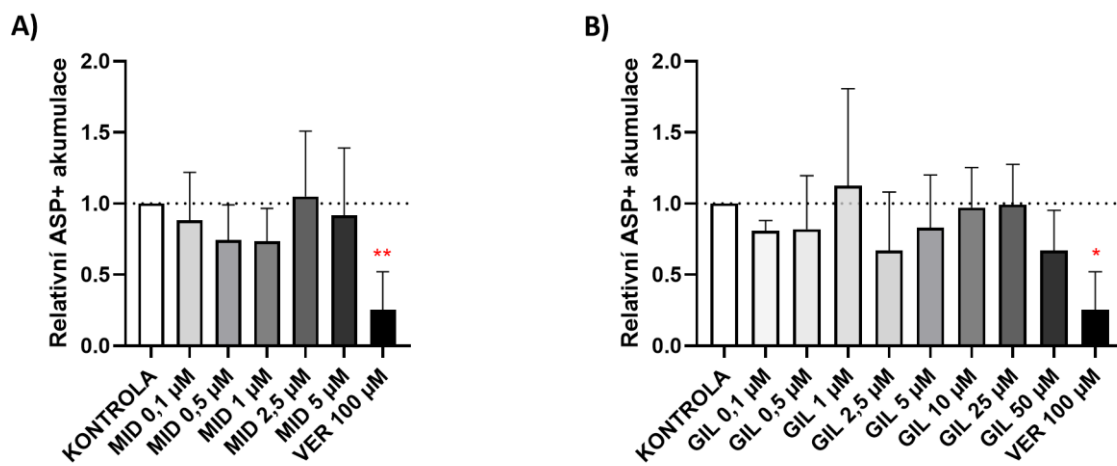
**Obrázek 16:** Změna fluorescence v 10. minutě akumulční studie u MDCKII – OCTN1 buněk a u kontrolní linie v kombinaci s verapamilem. Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka.

Statistická analýza byla provedena pomocí ANOVA testu s Dunettovým post hoc testem,

\*\*\* $p < 0,001$ .

Signifikantní změna množství detekované fluorescence byla zaznamenána u MDCKII – OCTN1 buněk v kombinaci s verapamilem, u kontrolní linie i u kontrolní linie v kombinaci s verapamilem ( $p < 0,001$ ). V MDCKII-OCTN1 buňkách došlo k 3,63krát násobnému zvýšení modelového fluorescenčního substrátu ASP+ oproti kontrolní linii (Obr. 16).

Pro následné vyhodnocování našeho pokusu ověření ovlivnění funkčnosti OCTN1 transportérů selektivními inhibitory FLT3 mutace jsme vybrali právě 10. minutu akumulace. Otestovali jsme koncentrační řadu midostaurinu a gilteritinibu. Ani u jednoho z léčiv nebyla zaznamenána významná změna akumulace množství modelového fluorescenčního substrátu ASP+. Ani jedno léčivo tedy neovlivňuje aktivitu OCTN1 transportéru (Obr. 17).



**Obrázek 17:** Akumulační studie inhibitorů FLT3 mutace u MDCKII – OCTN1 buněk. Koncentrační řada midostaurinu (MID) – A a gilteritinibu (GIL) – B. Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka. Statistická analýza byla provedena pomocí ANOVA testu s Dunnetovým post hoc testem, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 7. DISKUZE

Akutní myeloidní leukémie je známá již od druhé poloviny 19. století. I přes takto dlouhou dobu se jí stále mnohdy nedaří dostat plně pod kontrolu a pacienty zaléčit do kompletní remise – velmi častá je vysoká míra rezistence a relapsu onemocnění. Hlavní linie terapie se nezměnila od poloviny 20. století – i tento fakt hovoří za nedostatečnou znalost etiologie a patogeneze onemocnění. Valná většina pacientů dostává terapii známou jako „7+3“ – cytarabin v kombinaci s antracyklinem, nejčastěji daunorubicinem nebo idarubicinem. Výsledky terapie jsou nedostačující hlavně z důvodu rezistence na léčbu v souvislosti s vysokou heterogenitou onemocnění. Mutace, které se mohou objevit, včetně jejich vzájemné kombinace, zásadní měrou ovlivňují stav i léčbu pacienta. Mezi tu nejčastější s negativním dopadem patří FLT3 mutace vedoucí k nekontrolovatelné proliferaci nádorových buněk a k útlaku zdravého a funkčního imunitního systému. To je důvod, proč se začala vyvíjet cílená selektivní protinádorová léčiva s vidinou zlepšení terapeutických výsledků (Murphy and Yee, 2017).

Důležitou podmínkou pro účinnost terapie je vstup léčiva do nádorové buňky. Jelikož některá protinádorová léčiva jsou hydrofilní, případně ionizované molekuly, k prostupu využívají transportéry. Maligní buňky se od fyziologicky se vyskytujících buněk v organismu, ale i mezi jednotlivými pacienty navzájem, určitou měrou liší ve své transportérové výbavě. Cytarabin, jakožto základní léčivo indukční terapie po dlouhá desetiletí, řadíme do skupiny nukleosidových pyrimidinových analog. Léčivo tak do buňky vstupuje klasickou transportní cestou jako endogenní nukleosidy – všechny jsou totiž polární hydrofilní sloučeniny (Drenberg et al., 2017). Ty jsou přenášeny pomocí SLC transportérů z nukleosidové podrodiny (SLC28 a SLC29) – a to koncentrativní a ekvalibrativní nukleosidové přenašeče (CNT a ENT). CNT1 přenašeč je substrátově specifický pro pyrimidiny, CNT3 pro pyrimidiny i puriny (Yu Fukuda and John D. Schuetz, 2012). Z podrodiny ENT se ENT1 u pacientů s AML vyskytuje v nezralých myeloidních prekurzorech nejvíce a jedná se o hlavní přenašeč cytarabinu (Lu et al., 2002; Marin et al., 2016). Na druhou stranu se začínají objevovat i studie protichůdné, tvrdící, že cytarabin je tímto transportérem přenášen buď velmi málo nebo vůbec (Yoshio et al., 2007) a místo toho jeho transport obstarává OCTN1 přenašeč (Drenberg et al., 2017; Levin et al., 2021). Pro pozitivní výsledek z indukční terapie je nezbytné, aby došlo ke konverzi cytarabinu na jeho aktivní metabolit a mohl tak inhibovat DNA polymerázu – to se děje právě až po prostupu léčiva do myeloidního blastu (Murphy and Yee, 2017). Vysoká heterogenita onemocnění souvisí tak pravděpodobně i s vysokou námi potvrzenou interindividuální variabilitou u pacientů týkající se nejen transportérů a s tím související nedostatečnou odpovědí na terapii. Důležitost transportu tohoto cytotoxického léčiva potvrzují také naše Kaplan-Meierovy křivky přežití, ale i další studie s podobnými výsledky – vyšší exprese OCTN1 se ukazuje jako silně predikující faktor delšího přežití pacientů (Drenberg et al., 2017; Levin et al., 2021).

Pro zjištění detailnějšího vztahu mezi OCTN1 přenašečem a stavem/prognózou pacienta jsme vyhodnotili vzájemnou souvislost i u dalších klinických aspektů. Cytogenetické profily jednotlivých pacientů jsou velmi důležitou součástí při diagnostice, jelikož jsou určitými prognostickými faktory pro výstup terapie a zároveň pomáhají pacienta stratifikovat a usnadňují tak terapeutické rozhodování. Jedna z nejčastějších abnormalit s negativním dopadem vyskytující se u pacientů je FLT3 mutace. Negativita této mutace souvisí nejen s nekontrolovatelnou proliferací blastů, závažnějším stavem AML, kratším přežitím a nízkou odpovědí pacientů na terapii, ale také se sníženou hladinou počtu bílých krvinek, což má významný dopad na imunitní systém jedince (Kiyoi et al., 1999). Hrozba spočívá i v negativní souvislosti mezi FLT3 mutací a relapsem, kdy se u těchto pacientů buď objevila mutace poprvé nebo se stala dominantní mutací, což vedlo k významné progresi onemocnění negativním směrem (Daver et al., 2019b; Shih et al., 2002). Negativita této mutace ještě roste s faktem, že jsme v naší práci zaznamenali výrazné snížení OCTN1 transportéru u FLT3<sup>+</sup> pacientů. Pravděpodobně tak mutace zasahuje do signalizační dráhy OCTN1 transportéru. Tuto konkrétní souvislost jsme nenašli potvrzenou či vyvrácenou v žádné jiné publikaci, proto ji považujeme za velmi důležitou a je nutno ji dále více prozkoumat. Ale u jiného přenašeče pro nukleosidy, ENT1, byl tento kontext s down-regulací a FLT3 mutací již potvrzen (Jin et al., 2009), proto tuto úvahu předpokládáme jako důležitou pro další zkoumání. Nejen že tedy tato mutace sama o sobě má velmi negativní dopad, ale zároveň ještě velmi významným vlivem zasahuje do základní indukční chemoterapie, která je páteří léčby AML již po dlouhá desetiletí.

Vyvstává tak otázka míry důležitosti cílených léčiv na FLT3 mutaci. Postupné zavádění těchto inhibitorů do terapie s sebou přináší pozitivní výsledky týkající se jak stavu pacienta, tak i celkové délky přežití, a zároveň přinášejí i naději pro pacienty v horším stavu. Zkoumány jsou jak v monoterapiích, tak v kombinacích s jinými léčivy nebo jinými zavedenými postupy (Hassanein et al., 2016). Schváleny do terapeutických plánů byla zatím pouze jen dvě léčiva – a to midostaurin pro *de novo* diagnostikovanou AML s FLT3 mutací do kombinace s chemoterapií, a gilteritinib pro recidivující/refrakterní AML s FLT3 mutací (Daver et al., 2019b). Vzniká tak možná otázka propojení FLT3 mutace, její inhibice, a OCTN1 transportéru – jak z funkčního hlediska, tak i z hlediska změny exprese. Akumulační studie nám přinesly z hlediska možné kombinované terapie pozitivní výsledky, kdy dvě výše zmíněná léčiva funkčně neovlivňují OCTN1 transportér. V úvahu tak připadá začlenění těchto inhibitorů do schématu terapie a zároveň neovlivnění základní indukční chemoterapie obsahující cytarabin.

Při zjištění pravděpodobného zásahu mutace do signalizační dráhy exprese OCTN1 transportéru je stále neprobádanou otázkou, zda by při zablokování této vysoce negativní mutace došlo k obnovení míry exprese OCTN1 transportéru. Hypotézu jsme se proto pokusili experimentálně ověřit a zaznamenali signifikantní, i když méně než dvojnásobné zvýšení exprese OCTN1 transportéru při

vystavení buněk působení plazmatické koncentraci gilteritinibu po dobu 72 hodin. Pokud by se ale tato teoretická otázka potvrdila jako pravdivá, bylo by vhodné uvažovat o změně terapeutického schématu. A to tak, že FLT3 pozitivní pacienti by profitovali nejdříve z podání FLT3 inhibitoru, který by zároveň zvýšil množství OCTN1 transportéru, před, případně současně s, indukční cytarabinovou terapií a došlo by tím k zřetelně vyšší akumulaci nukleosidového analoga v myeloidních buňkách a následně k výraznější a pozitivnější odpovědi pacientů na terapii.

Hematopoetické kmenové buňky mají své jedinečné schopnosti – a to proliferaci, diferenciaci a schopnost sebeobnovy. Maligní kmenové buňky pravděpodobně vznikají z normálních kmenových buněk buď mutací nebo kumulací genetických a epigenetických transformací (Passequé et al., 2003). To napovídá tomu, že hematopoetické a leukemické kmenové buňky mají mnoho vlastností společných. Jeden z nich je například odolnost vůči apoptóze nebo rezistence vůči léčivům vlivem exprese několika druhů ABC transportérů. Ty rakovinné buňky exprimují ve velkém množství a proto je těžké proti nim bojovat léčivy (de Jonge-Peeters et al., 2007). Konkrétně ABCC4 transportér hraje podstatnou roli týkající se přežití anebo proliferace progenitorů – zejména při rozvoji leukémie, kdy množství výrazně stoupá (Pitre et al., 2017). Transportéru jsem se detailněji věnovali i z důvodu prokázání jeho role v lékové rezistenci na cytarabin *in vitro* (Adema et al., 2014), nicméně v námi získaných klinických datech, např. Kaplan-Meierových křivkách přežití, se tyto výsledky z buněčných linií neprokázaly jako relevantní. Zároveň ani vztah mezi efluxním ABCC4 transportérem a jednotlivými charakteristikami AML (ELN klasifikace, FLT3 a NPM1 mutace) nepřinesl žádné rozhodující výsledky.

Pro zajištění životaschopnosti a správné funkce buňky je nezbytný dostatek energie. Jako zdroj fungují mastné kyseliny (MK), které mají ale mimo to i jiné funkce – koexistují jako součást membránových lipidů nebo například pomáhají řídit signální dráhy. K tvorbě energie dochází pomocí biochemického cyklu nazývaného  $\beta$ -oxidace mastných kyselin probíhající v matrix mitochondrií. Aby mohly MK vstoupit do oxidace, musí nejprve dojít k jejich přeměně na koenzym A (CoA) deriváty (Longo et al., 2016). Ty jsou pak pomocí karnitinu transportovány do matrix mitochondrií. Karnitin, hydrofilní kvarterní amin, je nepostradatelnou součástí cytosolu buněk, neboť při jeho nedostatku dochází k hromadění CoA mastných derivátů v orgánech, což následně spěje ke vzniku zánětu nebo k apoptóze (např. kardiomyopatie) (Juraszek and Nałęcz, 2020). Jsou potvrzeny 3 transportéry pro karnitin umístěné na plazmatické membráně, pouze ale jeden z nich vykazuje vysokou afinitu a je hojně exprimován, a proto brán jako hlavní karnitinový přenašeč – OCTN2 (Pekala et al., 2011; Tamai et al., 1998). Expres tohoto receptoru je podnícena například prozánětlivými cytokiny, TNF $\alpha$ , zvýšenou fosforylací mTOR kinázy anebo aktivací faktoru STAT3 (Juraszek and Nałęcz, 2020). Při vzniku malignity v těle jedince dochází k charakteristickému pochodu v buňkách - a to k metabolickému přeprogramování, kde důležitou část hraje právě i oxidace mastných kyselin (Hanahan and Weinberg, 2011). Schopnost nádorové buňky adaptovat se na prostředí organismu ji dodává jedinečnou výhodu

– oxidace MK tak dle potřeby může buňce jednoduše produkovat ATP, NADPH, eliminovat toxické lipidy nebo poskytnout meziprodukty pro růst buněk, a tak jednoduchým způsobem podporovat zdatnost rakovinných buněk. Oxidace MK se proto ukazuje jako velice důležitý a nepostradatelný proces pro životaschopnost a statnost malignity (Carracedo et al., 2013). Důležitost OCTN2 přenašeče je tak naprosto jednoznačná. Při zjišťování konkrétnější souvislosti karnitinového transportéru s klinickými charakteristikami AML pacientů vyšel závěr potvrzující výše zmíněnou teorii ohledně zdatnosti a vitality nádorových buněk – a to ten, že pacienti zařazení do nepříznivé kategorie ELN klasifikace těchto transportérů mají významněji více. Současně se ale OCTN2 přenašeč neprokázal jako prediktivní marker v souvislosti s přežitím. Podobnost Kaplan-Meierových křivek přežití u tohoto transportéru s OCTN1 transportérem bude pravděpodobně spjata se signifikantní vzájemnou korelací těchto dvou SLC transportérů – odráží tedy spíše výše zmíněnou klíčovou roli OCTN1 pro účinek cytarabinu. Při pokusu vystavit buňky stresujícímu prostředí, fyziologickým koncentracím FLT3 inhibitorů, se jednoznačně prokázala jejich schopnost rychlé adaptability na prostředí a zahájení programovacích změn k pokusu o jejich co nejnižší poškození. Došlo ke zvýšení OCTN2 transportéru, čímž si buňky zajistily dostatečný přísun karnitinu, pravděpodobně tak zvýšili oxidaci MK a podpořili svou odolnost v boji proti nepříznivým podmínkám.



## 8. ZÁVĚR

Z periferní krve 28 *de novo* diagnostikovaných pacientů na AML bylo naším cílem v první řadě zjistit kvantitativní množství jednotlivých námi zvolených transportérů – OCTN1 a ABCC4 z důvodu interakce s cytarabinem, který je součástí páteřní terapie, a OCTN2 transportéru klíčového pro energetický metabolismus buněk. Z výsledku jsme u OCTN1 a ABCC4 transportéru na první pohled zaznamenali vysokou interindividuální variabilitu mezi pacienty, u OCTN2 byla variabilita nižší. Právě i na variabilitě přenašečů se potvrdila teze o velké heterogenitě onemocnění, která je jedním z důvodů nedostatečné odpovědi na terapii a nízké šance na přežití.

Ke zjištění důležitosti studovaných přenašečů na prognózu jsme využili Kaplan-Meierovy křivky přežití a potvrdili tak fakt pozorovaný ve dvou předchozích studiích – a to ten, že se OCTN1 transportér ukazuje jako prediktivní marker pro délku života s AML. Tento fakt může být vysvětlen tím, že slouží jako přenašeč pro nukleosidové chemoterapeutikum cytarabin, který je nasazován jako indukční terapie valné většině pacientů. Tím, že zajišťuje jeho vstup do buňky, může tak i nepřímo ovlivňovat jeho účinek jako nukleosidového analoga.

Svou roli v AML hrají i mnohé další faktory nevyjímaje vyšší věk, komorbidity, celkový psychický a fyzický stav a také klinické charakteristiky stavu pacienta. Pro zjednodušení určení stavu pacienta při diagnostice a zároveň jako pomoc při volbě terapie byla zavedena mezinárodní ELN klasifikace. Každá ze tří kategorií má své jednoznačné charakteristiky. Signifikantní souvislost se nám potvrdila pouze v případě nepříznivé kategorie související s OCTN2 transportérem. Tento fakt lze jednoduše zdůvodnit tím, že hlavní karnitinový transportér buňky potřebují zejména pro dostatečnou oxidaci mastných kyselin a tím k získání energie k odolnosti a životaschopnosti leukemických buněk.

Nejčastěji se vyskytující abnormalita s nepříznivým klinickým dopadem je mutace charakterizovaná jako interní tandemová duplikace genu kódujícího FLT3 (FLT3-ITD). Ta u pacientů způsobuje konstitutivní aktivaci FLT3 buněčného receptoru, a tím nekontrolovatelnou proliferaci a růst nádorových buněk. Zároveň jsme u ní objevili trend vykazující snížení množství OCTN1 přenašeče. Tím, že se tento transportér potvrdil jako vysoce prediktivní marker pro přežití pacientů, je zřejmé, že u FLT3 pozitivních pacientů dochází k nižší kumulaci léčiva v buňkách a lze tak vysvětlit horší odpověď těchto pacientů na standardní terapii. Tuto informaci je nadále třeba prozkoumat a potvrdit, jelikož se v žádné jiné publikaci prozatím neobjevila. U markeru pozitivní prognózy AML, NPM1 mutace, žádný takový trend zaznamenán nebyl.

Výzkum mutace FLT3 podnítil vývoj nových selektivních cílených léčiv. Do terapie jsou schváleny zatím pouze dvě, midostaurin a gilteritinib, ostatní z první i druhé generace procházejí klinickými testy. Při spojení souvislostí týkajících se OCTN1 transportéru a FLT3 mutace vyvstává otázka ohledně FLT3 inhibitorů a jejich vlivu na OCTN1 přenašeč. Z funkčního hlediska nedochází k ovlivnění, což podporuje

teorii možné kombinace s cytarabinovou terapií. Navíc jsme pozorovali mírné zvýšení exprese OCTN1 transportéru při zablokování FLT3 mutace. Nabízela by se tak možná úvaha o úpravě schématu terapie AML pacientů s FLT3 mutací – výrazně by profitovali z režimu, kdy by byl nejdříve podán selektivní FLT3 inhibitor, díky kterému by zároveň došlo ke zvýšení exprese OCTN1 transportéru, a při následném podání cytarabinu v rámci standardní indukční terapie by byl zvýšen influx tohoto léčiva do nádorové buňky, a tím i vyšší efektivita terapie. Při dostatečné účinnosti cytarabinu se nabízí i otázka snížení dávek případně úplné eliminace vysoce toxického antracyklinu.

U midostaurinu i gilteritinibu byl v souvislosti s OCTN2 transportérem zaznamenán nárůst exprese u FLT3 pozitivních buněk. Tento fakt si vysvětlujeme jako rychlou schopnost nádorových buněk přizpůsobit se vnějšímu prostředí, které pro ně v tomto experimentu znamenalo stres – obrana proti léčivům. Buňky si tak zajistily dostatečný přísun karnitinu pro následnou schopnost tvorby energie.

Výsledky této diplomové práce poukazují na fakt, že se v terapii AML jako důležitý faktor pro pozitivní odpověď na terapii uplatňuje prostup cytarabinu do buněk, kdy jeho transport je především zprostředkován pomocí OCTN1 transportéru. Velkou váhu v této práci hraje FLT3 mutace a její role spojená se sníženou expresí tohoto odpovědného transportéru. Možný teoretický dopad na úpravu terapie FLT3 pozitivních AML pacientů by bylo potřebné ověřit pomocí dalších *ex vivo* a následně *in vivo* studií, které by zohlednily i další možné faktory a vytvořily tak komplexnější závěry.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

A. Arber D, Orazi A. The Updated WHO Classification Of Hematological Malignancies: The 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood J* 2016;2:58–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.The.

Adema AD, Floor K, Smid K, Honeywell RJ, Scheffer GL, Jansen G, et al. Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine. *Springerplus* 2014;3:1–11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-732>.

Antar AI, Otrrock ZK, Jabbour E, Mohty M, Bazarbachi A. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia* 2020;34:682–96. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0694-3>.

Bass C, Nikou D, Vontas J, Donnelly MJ, Williamson MS, Field LM. The Vector Population Monitoring Tool (VPMT): High-Throughput DNA-Based Diagnostics for the Monitoring of Mosquito Vector Populations. *Malar Res Treat* 2010;2010:1–8. <https://doi.org/10.4061/2010/190434>.

Bechling. PCR Amplification Protocol for Ascochyta STMS 2022.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol* 1976;33:451–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>.

Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O’Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: From structure and function to disease development. *BMC Mol Biol* 2016;17:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12867-016-0073-9>.

Brecht K, Schäfer AM, Meyer Zu Schwabedissen HE. Uptake transporters of the SLC21, SLC22A, and SLC15A families in anticancer therapy— modulators of cellular entry or pharmacokinetics? *Cancers (Basel)* 2020;12:1–31. <https://doi.org/10.3390/cancers12082263>.

Cairolì R, Beghini A, Turrini M, Bertani G, Morra E. Prognostic markers in AML: focus on CBFL. *Leuk Suppl* 2012;1:S12–3. <https://doi.org/10.1038/leusup.2012.9>.

Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 2013;13:227–32. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>.

Chennamadhavuni A, Lyengar V, Shimanovsky A. Leukemia. *StatPearls*, StatPearls Publishing LLC; 2022.

Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* 2019a;33:299–312. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>.

Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* 2019b;33:299–312. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42:1007–17. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.

Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453–74. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>.

Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood* 2015;126:291–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621664>.

Doubek M, Mayer J. Léčebné postupy v hematologii. Brno: Česká hematologická společnost ČLS JEP; 2020.

Doubek M, Mayer J. Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekčních komplikací u dospělých pacientů. Doporučení České leukemické skupiny – pro život (CELL). Česka leukemická skupina – pro život; 2013.

Drenberg C, Hu S, Li L, Buelow D, Orwick S, Gibson A, et al. ABCC4 Is a Determinant of Cytarabine-Induced Cytotoxicity and Myelosuppression. *Clin Transl Sci* 2016;9:51–9. <https://doi.org/10.1111/cts.12366>.

Drenberg CD, Gibson AA, Pounds SB, Shi L, Rhinehart DP, Li L, et al. HHS Public Access 2018;77:2102–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2548.OCTN1>.

Drenberg CD, Gibson AA, Pounds SB, Shi L, Rhinehart DP, Li L, et al. OCTN1 is a high-affinity carrier of nucleoside analogues. *Cancer Res* 2017;77:2102–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2548>.

EMA. XOSPATA: SUMMARY OD PRODUCT CHARACTERISTICS 2019:183–226. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004166523.i-402.43>.

Fuchs O. Nukleofosmin s aktivitou stimulující proliferaci nebo naopak potlačující růst nádoru. *Klin Onkol* 2007;20:390–8.

Gaborik Z, Grindstaff K, Oosterhuis B. *The Transporter Book*. 2nd ed. Budaors: SOLVO Biotechnology; 2015.

Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment. *Oncol Rev* 2012;6:64–74. <https://doi.org/10.4081/oncol.2012.e8>.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hassanein M, Almahayni MH, Ahmed SO, Gaballa S, El Fakih R. FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 2016;16:543–9. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.06.002>.

James AJ, Smith CC, Litzow M, Perl AE, Altman JK, Shepard D, et al. Pharmacokinetic Profile of Gilteritinib: A Novel FLT-3 Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 2020;59:1273–90. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00888-w>.

Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, et al. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:1001–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.094>.

de Jonge-Peeters SDP, Kuipers F, de Vries EGE, Vellenga E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:214–26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.003>.

Juraszek B, Nałęcz KA. SLC22A5 (OCTN2) carnitine transporter-indispensable for cell metabolism, a jekyll and hyde of human cancer. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25010014>.

Kadia TM, Borthakur G, Takahashi K, DiNardo CD, Daver N, Pemmaraju N, et al. Phase II Study of CPX-351 Plus Venetoclax in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 2020;136:20–2. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-142074>.

Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3>.

Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, et al. Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res* 2010;27:832–40. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0076-z>.

Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* 2020;10:1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.612880>.

Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci* 2020;111:312–22. <https://doi.org/10.1111/cas.14274>.

Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074–80. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.9.3074>.

De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer J* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>.

Larrosa-Garcia M, Baer MR. FLT3 Inhibitors in acute myeloid leukemia: Current status & future directions. *Mol Cancer Ther* 2017;16:991–1001. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0876>.

Levin M, Stark M, Ofran Y, Assaraf YG. Deciphering molecular mechanisms underlying chemoresistance in relapsed AML patients: towards precision medicine overcoming drug resistance. *Cancer Cell Int* 2021;21:1–16. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01746-w>.

Levis M, Perl AE. Gilteritinib: Potent targeting of FLT3 mutations in AML. *Blood Adv* 2020;4:1178–91. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000174>.

Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:543–60. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>.

Liu B, Li LJ, Gong X, Zhang W, Zhang H, Zhao L. Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2018;15:6671–7. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8095>.

Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2016;1863:2422–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>.

Lu X, Gong S, Monks A, Zaharevitz D, Moscow JA. Correlation of nucleoside and nucleobase transporter gene expression with antimetabolite drug cytotoxicity. *J Exp Ther Oncol* 2002;2:200–12. <https://doi.org/10.1046/j.1359-4117.2002.01035.x>.

Marin JJG, Briz O, Rodríguez-Macias G, Díez-Martín JL, Macias RIR. Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2016;30:55–64. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.08.001>.

Molica M, Breccia M, Foa R, Jabbour E, Kadia TM. Maintenance therapy in AML: The past, the present and the future. *Am J Hematol* 2019;94:1254–65. <https://doi.org/10.1002/ajh.25620>.

Murphy T, Yee KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2017;18:1765–80. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1391216>.

Nicholls, G. et al. Drug transporters. Cambridge, Royal Society Of Chemistry; 2016.

NIH. Cancer Stat Facts: Leukemia — Acute Myeloid Leukemia (AML) 2021a. [https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html?fbclid=IwAR3mqgtkheHeSCiL7qUEdXG73G3UEOTj4a4hvrUIVb0vw\\_--kOtBlg3IRyM](https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html?fbclid=IwAR3mqgtkheHeSCiL7qUEdXG73G3UEOTj4a4hvrUIVb0vw_--kOtBlg3IRyM).

NIH. Acute Myeloid Leukemia. MedlinePlus 2021b. <https://medlineplus.gov/acutemyeloidleukemia.html>.

NIH. NPM1 gene. MedlinePlus 2020. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/npm1/#conditions>.

Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11842–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034201100>.

Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochynski S, et al. L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr Drug Metab* 2011;12:667–78. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>.

Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J (2013)* 2020;103:38–40.

Pitre A, Ge Y, Lin W, Wang Y, Fukuda Y, Temirov J, et al. An unexpected protein interaction promotes drug resistance in leukemia. *Nat Commun* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01678-y>.

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer 2019;18:452–64. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005->

## 8. Revisiting.

Šálek C. Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interni Med pro Praxi* 2012;14:366–72.

Samodelov SL, Kullak-Ublick GA, Gai Z, Visentin M. Organic cation transporters in human physiology, pharmacology, and toxicology. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21217890>.

Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: A comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002;100:2387–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0195>.

Song W, Li D, Tao L, Luo Q, Chen L. Solute carrier transporters: the metabolic gatekeepers of immune cells. *Acta Pharm Sin B* 2020;10:61–78. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.006>.

Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med* 2017;377:454–64. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1614359>.

Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219–34. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>.

Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008;13:379–93. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>.

Tamai I, Ohashi R, Nezu JI, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998;273:20378–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20378>.

Voso MT, Ottone T, Lavorgna S, Venditti A, Maurillo L, Lo-Coco F, et al. MRD in AML: The Role of New Techniques. *Front Oncol* 2019;9:1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00655>.

Wang ES. Incorporating FLT3 inhibitors in the frontline treatment of FLT3 mutant acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2019;32:154–62. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.006>.

Wang G, Zhao L, Jiang Q, Sun Y, Zhao D, Sun M, et al. Intestinal OCTN2- and MCT1-targeted drug delivery to improve oral bioavailability. *Asian J Pharm Sci* 2020;15:158–73. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.02.002>.

Yang X, Wang J. Precision therapy for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2018;11:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0543-7>.

Yoshio E, Obata T, Murata D, Ito M, Sakamoto K, Fukushima M, et al. Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer Sci* 2007;98:1633–7. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00581.x>.

Yu Fukuda and John D. Schuetz. ABC Transporters and their Role in Nucleoside and Nucleotide Drug Resistance. *Biochem Pharmacol* 2012.

