

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra farmakologie a toxikologie



**HODNOCENÍ VLIVU NOVÝCH FLT3 INHIBITORŮ NA AKUMULACI  
DAUNORUBICINU U ABCB1-EXPRIMUJÍCÍCH LEUKEMICKÝCH BUNĚK**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Simona Suchá

Hradec Králové 2021

Adéla Králová

**Prohlášení:**

„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.“

V Hradci Králové

Adéla Králová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za pomoc a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Mé poděkování též patří Mgr. Simoně Suché za trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu vypracování diplomové práce věnovala.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Adéla Králová

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

Konzultant: Mgr. Simona Suchá

Název diplomové práce: Hodnocení vlivu nových FLT3 inhibitorů na akumulaci daunorubicinu u ABCB1-exprimujících leukemických buněk

Inhibitory fms-podobné tyrosinkinázy 3 (FLT3) představují novou generaci léčiv v terapii akutní myeloidní leukémie (AML). Standardní léčba AML je zahájena indukční terapií zahrnující kombinaci cytarabinu s antracykliny. Její nevýhodou je vznikající rezistence často způsobená vlivem ABCB1 efluxního transportéru. Jako prospěšný přístup k terapii se proto jeví současná inhibice FLT3 a ABCB1, která byla prokázána u FLT3 inhibitorů midostaurinu a gilteritinibu používaných v klinické praxi. Jejich účinnost však klesá, proto je snaha vyvinout nové molekuly inhibující FLT3. Cílem naší práce bylo zjistit, zda dva nadějně nové FLT3 inhibitory (7225, 7596) budou inhibovat i ABCB1. Kromě promyelocytární buněčné linie se zvýšenou expresí *ABCB1* (HL60-ABCB1) a parentních HL60-par jsme pro hodnocení použili i AML buněčné linie (MOLM-13, THP-1, Kasumi-1). Akumulační studie na HL60-ABCB1 prokázaly silnou schopnost látek 7225 i 7596 inhibovat ABCB1-mediovaný eflux. Součástí této práce je i charakterizace leukemických linií ve smyslu genové exprese *ABCB1* a proteinové exprese u vybraných modelů. Exprese ABCB1 byla u HL60-ABCB1 potvrzena jak na úrovni mRNA, tak pomocí Western blottingu. Linie Kasumi-1 exprimovala *ABCB1* méně a funkční inhibice ABCB1 nebyla prokázána. Exprese *ABCB1* v liniích MOLM-13 a THP-1 byla zanedbatelná a tyto buňky tak nepředstavovaly vhodný model pro studium funkce ABCB1 a jejího ovlivnění. Závěrem tato práce odhalila dva nové inhibitory FLT3 se silným ABCB1 inhibičním potenciálem, čímž by mohly představovat léčiva s výhodným kombinačním účinkem v terapii rezistentní AML.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Adéla Králová

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

Consultant: Mgr. Simona Suchá

Title of Diploma thesis: Impact of new FLT3 inhibitors on daunorubicin accumulation in ABCB1-expressing leukemic cells

Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) inhibitors represent a new generation of drugs in the treatment of acute myeloid leukemia (AML). Standard therapeutic regimen of AML is initiated with induction therapy consisting of cytarabine and anthracyclines. The disadvantage of this combination is emerging resistance often caused by the ABCB1-mediated efflux. Therefore, simultaneous inhibition of FLT3 and ABCB1, which is inhibited by FLT3 inhibitors used in clinical practice, appears to be a beneficial approach to therapy. However, their effectiveness is declining hence the effort to develop new FLT3-inhibiting molecules. The aim of our work was to evaluate whether our two promising new FLT3-inhibiting compounds would inhibit ABCB1 as well. Promyelocyte cells overexpressing ABCB1 (HL60-ABCB1) and parent HL60-par were used in this study alongside AML-derived cell lines (MOLM-13, THP-1, Kasumi-1). Employing accumulation studies on HL60-ABCB1, strong inhibitory effect towards ABCB1 was demonstrated for both studied compounds. This work includes characterization of cell lines in terms of *ABCB1* gene expression and protein expression. *ABCB1* expression was confirmed in HL60-ABCB1 both at the mRNA level and protein level (using Western Blotting). Kasumi-1 expressed *ABCB1* very weakly and inhibition of ABCB1 function was not observed. In MOLM-13 and THP-1, *ABCB1* expression was negligible and thus these cells did not represent suitable models for studying ABCB1 function. In conclusion, this study has revealed two novel FLT3 inhibitors as potent inhibitors of ABCB1, which could represent novel compounds with a beneficial combination effect in the treatment of resistant AML.

## Obsah

1	Seznam zkratek.....	7
2	Úvod.....	8
3	Teoretická část.....	10
3.1	Charakteristika AML .....	10
3.1.1	FLT3 inhibitory.....	11
3.2	ABC transportéry .....	11
3.2.1	Obecná charakteristika.....	11
3.2.2	Funkce.....	12
3.2.3	Struktura a mechanismus .....	12
3.2.4	Lokalizace.....	14
3.2.5	Mnohočetná léková rezistence.....	14
3.2.6	ABCB1.....	15
4	Cíl práce.....	18
5	Experimentální část .....	19
5.1	Materiály a metody .....	19
5.1.1	Chemikálie.....	19
5.1.2	Přístroje.....	20
5.1.3	Buněčné linie .....	21
5.1.4	Analýza genové exprese .....	21
5.1.5	Stanovení proteinů .....	24
5.1.6	Akumulační studie .....	27
5.1.7	Statistické zpracování .....	29
6	Výsledky.....	30
6.1	PCR.....	30
6.2	Western Blotting .....	31
6.3	Akumulační studie .....	32
7	Diskuze.....	34
8	Závěr.....	37
9	Zdroje .....	38

## 1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	„ATP-binding cassette“, ATP-vázající membránový transportér
ABCB1	ABCB1 membránový protein, P-glykoprotein, P-gp
ABCC1	ABCC1 membránový protein, „multidrug resistance protein-1“, MRP1
ABCG2	ABCG2 membránový protein, breast cancer resistance protein, BCRP
ADP	adenosindifosfát
AML	akutní myeloidní leukémie
API	voda pro injekci
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CDK	cyklin-dependentní kináza
DAU	daunorubicin
FLT3	fms-podobná tyrosinkináza 3
HEB	hematoencefalická bariéra
HL60-par	parentní buněčná linie HL60
HL60-ABCB1	buněčná linie HL60 s exprimovaným ABCB1 transportérem
LY 335979	LY, zosuquidar, modelový inhibitor pro ABCB1
MDR	mnohočetná léková rezistence
MQ	Milli-Q voda
NBD	cytoplasmatická doména vázající nukleosid
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
TBS-T	Tris Buffered Saline + Tween-20
TEMED	tetramethylethylendiamin
TMD	transmembránová doména

## 2 ÚVOD

I přes použití intenzivní konvenční chemoterapie a transplantace krvetvorných kmenových buněk, zůstává akutní myeloidní leukemie (AML) stále obtížně léčitelným maligním onemocněním krve. Většina pacientů zemře přímo v souvislosti s vlastním onemocněním, nemalá část však i vlivem komplikací způsobených poměrně agresivní protinádorovou léčbou. Potřeba nových chemoterapeutik, které jsou efektivní a zároveň dobře tolerovaná, je nezpochybnitelná převážně u starších a křehčích pacientů. Pro AML je charakteristická heterogenita onemocnění, díky které se odpověď na léčbu u jednotlivých pacientů velmi liší. Bylo identifikováno několik prognostických ukazatelů souvisejících s charakteristikami pacienta a jeho zdravotním stavem, fenotypovým zařazením majoritní populace jeho leukemických buněk a dále jejich cytogenetickými vlastnostmi a odchylkami (Popat, 2011). U pacientů s AML často dochází ke genetickým mutacím, přičemž mutace fms-podobné tyrosinkinázy 3 (FLT3) patří mezi jednu z nejčastějších. Při FLT3 mutaci dochází ke stálé aktivaci FLT3 receptoru, což má za následek nekontrolovanou proliferaci buněk. Přítomnost FLT3 mutace je spojena se špatnou prognózou AML, a proto je kladen důraz na vývoj FLT3 inhibitorů (Daver, Schlenk, Russell, & Levis, 2019).

Kromě mutací je úspěšnost konvenční chemoterapie často ohrožena taktéž vznikem mnohočetné lékové rezistence (MDR), kdy se nádorové buňky stávají rezistentní vůči velkému množství chemoterapeutických látek, které mohou být odlišné ve funkci i struktuře. Jedním z hlavních mechanismů ve vzniku MDR fenoménu zejména při léčbě antracykliny, které stále tvoří esenciální složku indukční chemoterapie AML, jsou efluxní membránové transportéry schopné přenášet řadu substrátů proti koncentračnímu gradientu, a tak snižovat intracelulární kumulaci léčiva (Borowski, Bontemps-Gracz, & Piwkowska, 2005). Identifikace transportérů podílejících se na MDR může zvýšit šanci léčby AML. Inhibicí ABCB1, nejvíce prozkoumaného ATP-vázajícího kazetového (ABC) transportéru, může dojít k výraznému zlepšení výsledků konvenční cytotoxické terapie (Mahadevan & List, 2004). Schopnost inhibice ABCB1 pomocí nového FLT3 inhibitoru midostaurinu byla prokázána nedávno naší skupinou, jak u buněčných modelů, tak mononukleárních buněk AML pacientů, kde midostaurin výrazně zvyšoval vnitrobuněčnou koncentraci, a tím i efektivitu terapie antracykliny. Kombinovaná inhibice FLT3 a ABCB1 se tak jeví jako



potenciálně prospěšný přístup ke zvýšené účinnosti anti-AML chemoterapeutik. Tato práce se proto tímto tématem dále zabývala. Pro účel hodnocení nových FLT3 inhibitorů byly v laboratoři nově zavedeny buněčné linie odvozené od AML, u nichž byla nejprve hodnocena genová a proteinová exprese ABCB1. Následně byla zkoumána schopnost inhibice tohoto transportéru dvěma experimentálními FLT3 inhibitory označenými pracovními kódy 7225 a 7596.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Charakteristika AML

AML je hematologické maligní onemocnění charakteristické klonální expanzí myeloidních blastů v periferní krvi, kostní dřeni a jiných tkáních. Jedná se o nejčastější formu akutní leukémie u dospělých pacientů (O'Donnell et al., 2012). V dnešní době je AML léčitelná u 35-40 % pacientů mladších 60 let a pouze u 5-10 % pacientů starších 60 let (Wang, 2014). Úspěšnost terapie udávaná jako pětiletá doba přežití je 30,5 % (NIH, 2022a). U starších pacientů, kteří nejsou schopni dostávat intenzivní chemoterapii, je výsledek terapie velmi nepříznivý s mediánem přežití pouze 5 až 10 měsíců. Pro AML je typická heterogenita, nízká doba přežití a vysoké riziko relapsu. Prognózu zhoršuje i fakt, že AML pacienti bývají často rezistentní ke standardní léčbě (Dohner, Weisdorf, & Bloomfield, 2015).

Standardní terapeutický režim, známý jako 3+7, se skládá z daunorubicinu podávaného po dobu 3 dnů a kontinuálního podání cytarabinu po dobu 7 dnů. U pacientů s vysokým rizikem relapsu je dále využívána konsolidační terapie, včetně alogenní transplantace kmenových buněk. I přesto, že tento režim má důležité postavení v terapii AML již mnoho let, může být špatně tolerován, především u pacientů s komorbiditami, horším zdravotním stavem nebo vyšším věkem. Kromě toho, neuspokojivá odpověď na léčbu byla zaznamenána také u pacientů s přítomnými vysoko-rizikovými cytogenetickými změnami nebo molekulárními mutacemi (Daver et al., 2020).

Mutace FLT3 je přítomna přibližně u 1/3 pacientů s AML. Jedná se o jednu z nejčastějších mutací v souvislosti s AML, která predikuje špatnou prognózu onemocnění, dřívější relapsy u pacientů a kratší dobu celkového přežití (Daver et al., 2019). V současnosti se proto zjišťuje přítomnost FLT3 mutace prostřednictvím diagnostických vyšetření, aby se optimalizovala terapie jednotlivě u každého pacienta. Receptorová tyrosinkináza FLT3 exprimovaná na krvetvorných progenitorových a dendritických buňkách je zodpovědná za proliferaci, diferenciaci a regulaci těchto buněk. Stálá aktivace tyrosinkinázy FLT3 způsobuje potlačení apoptózy a diferenciaci leukemických buněk, včetně deregulace proliferace leukemických buněk. Cílem léčby je tedy zabránit nadměrné aktivitě FLT3 její inhibicí (M. Wu, Li, & Zhu, 2018).

### **3.1.1 FLT3 inhibitory**

Kvůli zvýšené frekvenci výskytu mutace FLT3 a její nepříznivé prognóze u AML pacientů je snaha vyvinout inhibitory cílící na tuto tyrosinkinázu. Mechanismus FLT3 inhibitorů spočívá v kompetitivní inhibici vazebných míst ATP na FLT3 receptoru, která vede k zástavě buněčného cyklu a diferenciaci (Cerchione et al., 2021).

Nyní jsou v klinické praxi registrovány pouze dva FLT3 inhibitory, midostaurin a gilteritinib, díky kterým došlo k výraznému zvýšení úspěšnosti léčby AML (M. Wu et al., 2018). Midostaurin byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu AML s detekovanou mutací FLT3. V 3. fázi randomizované multicentrické studie RATIFY vzrostla čtyřletá doba přežití u pacientů léčených kombinací „3+7“ s midostaurinem z 44,3 % na 51,4 % a medián doby přežití byl u pacientů léčených kombinací „3+7“ roven 74,7 měsícům oproti 25,6 měsícům u pacientů s placebem. Gilteritinib byl schválen FDA pro léčbu refrakterní AML s FLT3 mutací a léčbu relabující AML. Třetí fáze multicentrické klinické studie ADMIRAL prokázala jeho účinnost, když 34 % pacientů léčených gilteritinibem dosáhlo kompletní remise, zatímco ve skupině pacientů bez užití gilteritinibu bylo dosaženo kompletní remise pouze u 15,3 % pacientů (Cerchione et al., 2021; Perl et al., 2019). Další FLT3 inhibitory jako např. quizartinib a crenolanib jsou zatím v pokročilém stádiu klinického vývoje (Daver et al., 2020).

Experimentální léčiva 7225 a 7596 použitá v této práci se jeví jako efektivní inhibitory FLT3 a zároveň cyklin-dependentních kináz 2 a 4 (CDK2, CDK4). Cyklin-dependentní kinázy hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripce a opravy DNA a představují terapeutický cíl u mnoha nádorů (Lee & Zeidner, 2019). Nerovnováha v aktivitě CDK2 a CDK4 může vést ke zvýšené proliferaci buněk (Murphy & Dickler, 2015). Kombinovaný inhibiční účinek FLT3 a CDK2/4 se proto jeví jako prospěšný v terapii pacienta s AML.

## **3.2 ABC transportéry**

### **3.2.1 Obecná charakteristika**

ABC transportéry patří mezi membránové proteiny, které aktivně přenášejí ligandy přes biologické membrány pomocí ATP hydrolyzy. ABC transportéry jsou přítomny u všech

živočišných druhů a u člověka bylo doposud zaznamenáno dohromady 48 ABC transportérů (Linton, 2007). Jedná se o jednu z největších skupin transmembránových proteinů, která je rozdělena do 7 podrodin, označovaných písmeny A-G (ABCA-G) (Begicevic & Falasca, 2017). Jejich role je významná z klinického hlediska, neboť efluxním mechanismem některých ABC transportérů může docházet k mnohočetné lékové rezistenci. Naopak v důsledku mutací těchto transportérů dochází k jejich dysfunkci, což vede k rozvoji genetických nemocí včetně poruchy krvácení, onemocnění jater a očí (Linton, 2007).

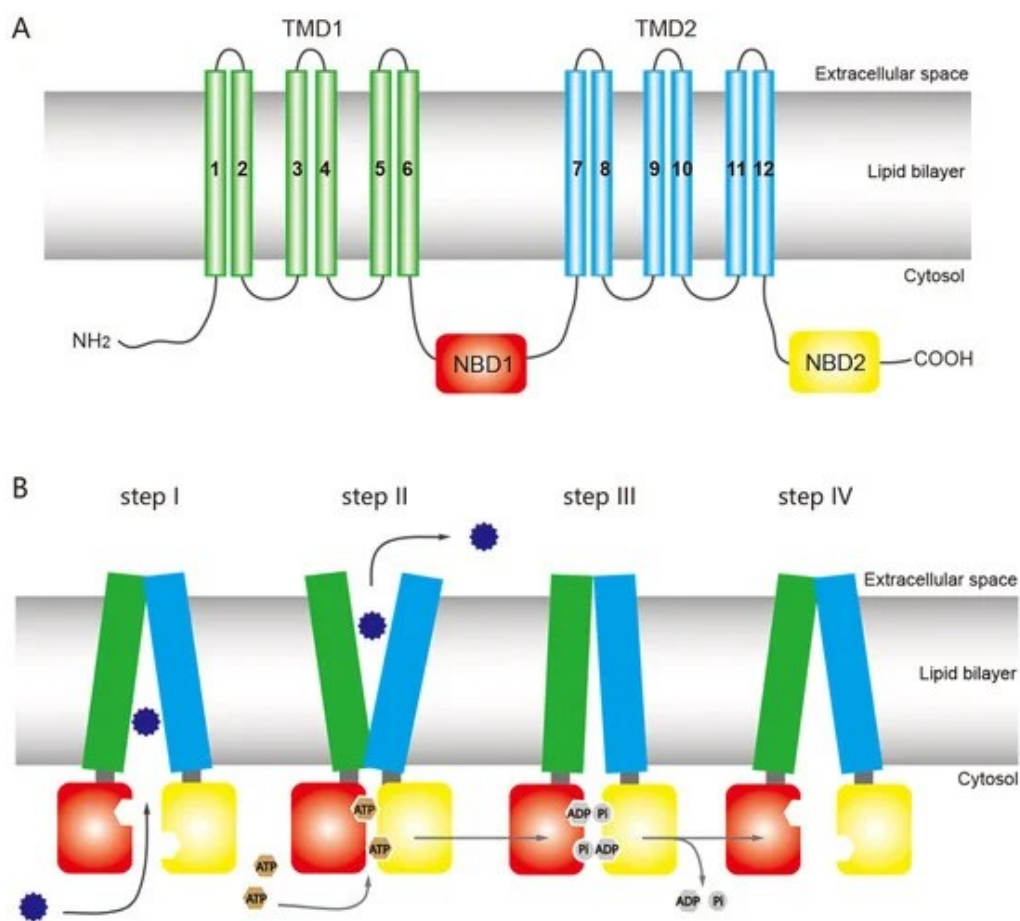
### **3.2.2 Funkce**

Fyziologická funkce ABC transportérů spočívá v transportu živin do buněk, regulaci pohybu sloučenin přes membrány, sekreci proteinů, regulaci syntézy proteinů, prezentaci antigenů a mnoho dalších. Podle směru aktivního transportu se ABC transportéry dělí na importéry a exportéry. Importéry jsou zodpovědné především za příjem živin do buněk bakterií, zatímco exportéry za eflux látek ve směru ven z buněk, včetně buněk živočišných. Vlivem efluxu látek dochází v buňkách také ke snížené dostupnosti některých chemoterapeutik, kterých intracelulární akumulace je vázána na tyto transportéry, a tedy k selhávání terapie (George, 2016).

### **3.2.3 Struktura a mechanismus**

ABC importéry i exportéry jsou složeny minimálně ze 4 domén – 2 transmembránových domén (TMD) a 2 cytoplazmatických domén vázajících nukleotid (NBD), které pohánějí transport hydrolýzou ATP. Obě jednotky NBD (NBD1 a NBD2) tvoří symetrický dimer se 2 jednotkami ATP, které jsou vloženy na rozhraní dimeru díky vazbám s fosfátovou smyčkou a charakteristické sekvenci „LSGGQ“. TMD obsahují několik transmembránových šroubovic, které společně vytvářejí transmembránový pór. Po navázání substrátu na TMD dochází k hydrolýze ATP na adenosindifosfát (ADP) v NBD, která vede ke změně konformace v TMD, což umožní transport z vně a vnitřku buňky přes lipidovou dvojvrstvu (Obr. 1). ABC transportéry umožňují transport přes membránu širokému spektru substrátů – od nukleosidů, aminokyselin, vitamínů až po polysacharidy, peptidy a lipidové molekuly.

Většina ABC transportérů je u eukaryot tvořena jediným polypeptidem, který obsahuje všechny 4 domény. Existuje pár výjimek, které jsou sestaveny z polovičního množství domén a společně tvoří homodimer nebo heterodimer. Společným prvkem pro všechny ABC transportéry je přítomnost smyčky vázající fosfát a sekvence “LSGGQ” v NBD, která se podílí na vazbě nukleotidů (Wilkens, 2015).



### Obr. 1 Obecná struktura a mechanismus transportu látek přes ABC transportéry

(A) Charakteristická struktura ABC transportéru složeného ze 2 transmembránových domén (TMD1 a TMD2) a 2 cytoplazmatických domén vázajících nukleotid (NBD1 a NBD2). Každá TMD je navíc složena z několika transmembránových šroubovic.

(B) Mechanismus transportu látek je složen ze 4 kroků: (I) navázání substrátu na TMD, (II) změna konformace TMD způsobená hydrolýzou 2 ATP na ADP v NBD a uvolnění substrátu

*v intracelulárním prostoru, (III) uvolnění ADP a inorganického fosfátu (Pi), (IV) obnovení původní konfigurace ABC transportéru.*

*Převzato z: (C. Wu, Chakrabarty, Jin, Liu, & Xiao, 2019)*

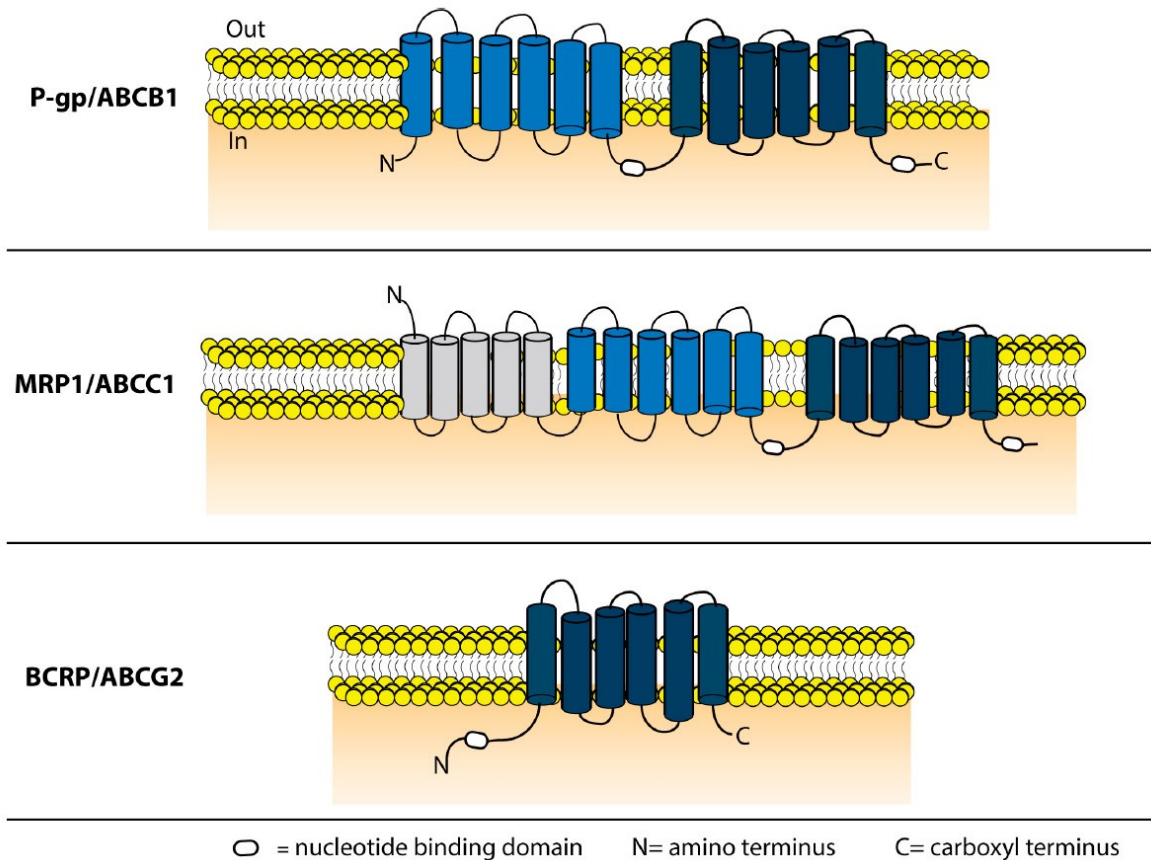
### **3.2.4 Lokalizace**

ABC transportéry se vyskytují ve většině zdravých tkání. V placentě, játrech a hematoencefalické bariéře (HEB) se například podílejí na detoxikaci od organických hydrofobních molekul (Wilkens, 2015). Avšak některé ABC transportéry mohou být více exprimovány také v nádorových buňkách (Begicevic & Falasca, 2017). Patří mezi ně ABCB1, ABCC1 a ABCG2, které svou přítomností v tumorových buňkách mohou vést k jejich ochraně a přispívat tak k nízké efektivitě léčby (Wilkens, 2015).

### **3.2.5 Mnohočetná léková rezistence**

Častým problémem při léčbě rakoviny je rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR) (Robey et al., 2018). MDR fenomén nastává, když nádorová buňka vystavená jedné chemoterapeutické látce, vykazuje rezistenci také k jiným chemoterapeutickým látkám odlišné struktury a funkce (Choi, 2005).

Rezistence může být způsobena řadou mechanismů v nádorových buňkách. Mezi tyto mechanismy patří aktivace enzymů metabolizujících léky (např. CYP450), aktivace mechanismů opravy DNA, narušení signálních cest ovlivňujících apoptózu, snížení influxu léčiv a zvýšená aktivita efluxních pump (Jaramillo, 2018). Mezi nejvíce zkoumané mechanismy vedoucí k MDR se známou klinickou významností patří transportéry, které zprostředkovávají eflux cytotoxických látek z buněk (Choi, 2005). V současnosti se předpokládá, že přinejmenším 15 ABC transportérů přispívá k rezistenci na chemoterapeutika, přičemž mezi nejdůležitější patří ABCB1, ABCC1 a ABCG2. Overexprese těchto transportérů je spojována se špatným výsledkem terapie u pacientů (Jaramillo, 2018). Jejich struktury jsou zobrazené na Obr. 2.



**Obr. 2** Znárodnění struktury ABC transportérů spojovaných s MDR

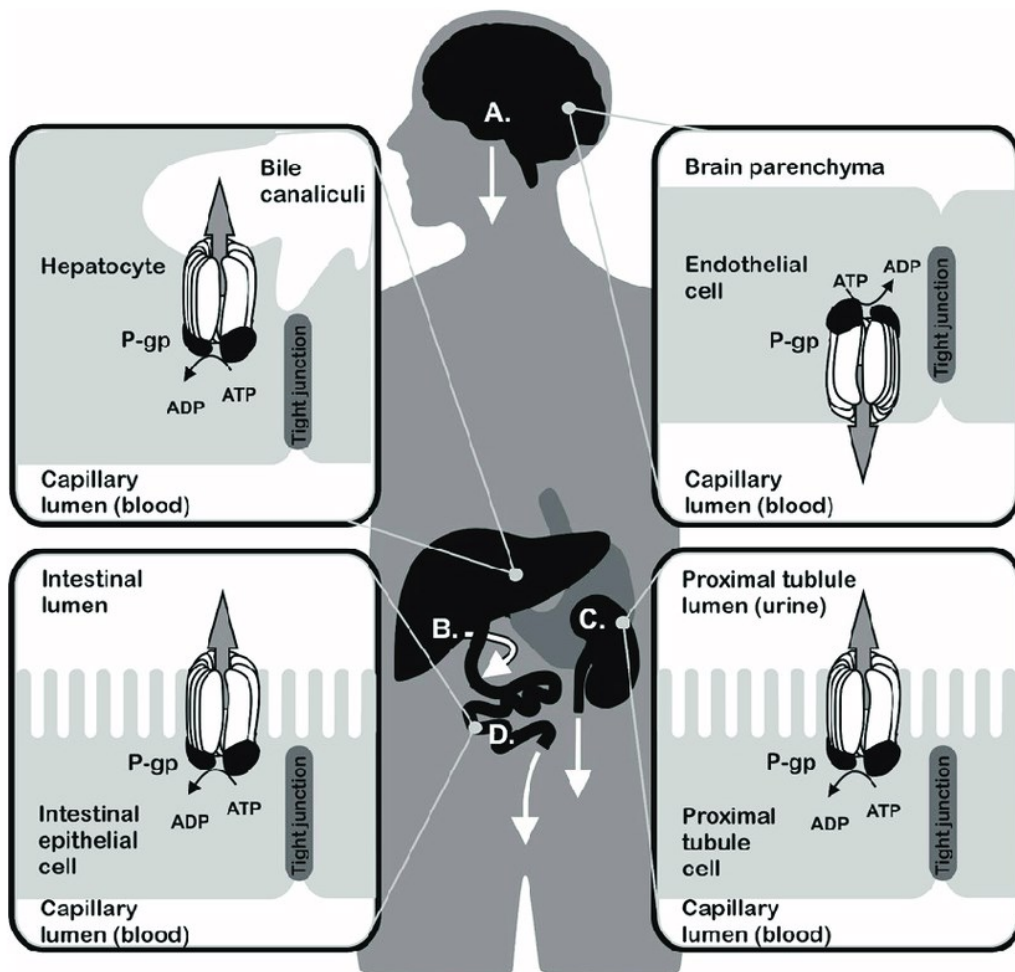
*Schéma znázorňuje strukturu nejvýznamnějších ABC transportérů způsobujících mnohočetnou lékovou rezistenci: (A) P-gp/ABCB1 transportér, (B) MRP1/ABCC1 transportér, (C) BCRP/ABCG2 transportér.*

*Převzato z: (Jaramillo, 2018)*

### 3.2.6 ABCB1

ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp) je jedním z prvních objevených a nejvíce prozkoumaných efluxních transportérů. Jedná se o ABC transportér, který hraje významnou roli v rezistenci k cytotoxickým látkám. Je složen z 1280 aminokyselin, které jsou kódovány jako jeden polypeptid. Transmembránová doména je složena ze 12 šroubovic a jeho molekulová hmotnost činí 140 kDa (George, 2016). Hlavní funkcí ABCB1 transportéru je ochrana těla před toxickými látkami a xenobiotiky jejich vylučováním do žluči a moči a zamezením jejich vstupu do plodu, mozku a varlat (Jaramillo, 2018). ABCB1 umožňuje transport širokého

spektra léčiv a xenobiotik z intracelulárního prostoru do extracelulárního v mnoha tkáních, jako například ve střevech, játrech, ledvinách a HEB. Jeho lokalizace je znázorněna na Obr. 3.



**Obr. 3 Lokalizace ABCB1 transportéru**

*ABCB1 transportér je lokalizovaný v mnoha tkáních, kde zaujímá několik klíčových funkčních rolí. (A) ABCB1 jako jedna ze složek HEB ochraňuje mozkovou tkáň před vniknutím xenobiotik přes endotel. (B) Podporuje vylučování jater transportem látek s omezenou rozpustností ve vodě. (C) Zajišťuje vylučování ve vodě rozpustných látek močí v proximálních tubulech nefronů. (D) Brání absorpci patogenů a toxinů ze stravy.*

*Převzato z: (Hano et al., 2018)*



Mezi substráty ABCB1 transportéru patří mnoho chemoterapeutik, např. docetaxel, paklitaxel, irinotekan, vinkristin, doxorubicin, vinblastin, mitoxantron, teniposid, topotekan, etoposid, imatinib, sunitinib, ale i léčiv z jiných farmakodynamických skupin (např. digoxin, antivirotika maravirok, ritonavir ad). Vysoké hladiny exprese ABCB1 vedou ke snížení intracelulární koncentrace léčiv, což vede k rozvoji buněčné rezistence na protirakovinná léčiva (Ankathil, 2017).

### **3.2.6.1 ABCB1 ve spojitosti s AML**

Jeho zvýšená aktivita je považována za špatný prognostický faktor AML (Boyer et al., 2019). Ve studii Boyera a kol. zahrnující 150 nově diagnostikovaných pacientů byly blastové buňky s expresí ABCB1 přítomny u 71 z nich. U těchto ABCB1-pozitivních pacientů byla zaznamenána kratší doba remise a výrazně snížená šance na kompletní remisi. ABCB1 může vyvolat rezistenci na antracykliny, které patří mezi léky 1. linie v terapii AML. Zjištění ABCB1 exprese u pacienta může sloužit jako užitečná informace k optimalizaci výběru chemoterapie.

## 4 CÍL PRÁCE

Tato experimentální práce měla dva základní cíle. Prvním bylo ověřit expresi ABCB1 transportéru ve 3 leukemických buněčných liniích – MOLM-13, Kasumi-1 a THP-1. Buněčná linie HL60-par a HL60-ABCB1, její rezistentní varianta s exprimovaným ABCB1 transportérem, byly použity jako kontrolní linie. Exprese byla nejprve stanovena na úrovni genové, pak na úrovni proteinové. Druhým dílčím cílem bylo hodnocení dvou nových experimentálních FLT3 inhibitorů pro jejich schopnost inhibice ABCB1 transportéru, a to s využitím právě výše uvedených buněčných linií.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiály a metody

#### 5.1.1 Chemikálie

- TRI Reagent, Molecular Research Center (Cincinnati, OH, USA)
- Chloroform, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Isopropanol, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Ethanol absolutní, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Voda pro injekci (API), B. Braun (Praha, Česká republika)
- Oligo(dT)18 primer, Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika)
- Protoscript® II RT kit, New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
- TaqMan™ Universal Master Mix II, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- RIPA pufr, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Inhibitory proteáz mix M, Serva (Heidelberg, Německo)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Fosfátový pufr (PBS), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Peroxodisíran amonný (APS), Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED), Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Tween-20, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Opti-MEM, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Inhibitory 7225 a 7596- Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého (Olomouc, Česká republika)
- Daunorubicin (DAU), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- LY335979 (LY), Toronto Research Chemicals (North York, ON, Kanada)
- Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI-1640), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)

- Fetální bovinní sérum (FBS), Diagnostum (Ebsdorfergrund, Germany)
- 30% akrylamid/bisakrylamid, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Glycin, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Methanol, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Trans-Blot Turbo 5x transferový pufr, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Blotto nízkotučné sušené mlíko, Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
- Primární protilátka anti-ABCB1, C219 (#903701, BioLegend, CA, USA)
- Primární protilátka anti-beta aktin (#8226, Abcam, Velká Británie)
- Sekundární protilátka anti-mouse (#405306, BioLegend, CA, USA)
- 2-mercaptoethanol, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)

### 5.1.2 Přístroje

- Centrifuga Hettich Universal 32R (A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
- Centrifuga Hettich Mikro 22R (A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
- NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systém (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- RT-PCR termální cyklér (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Hidex Sense Beta Plus 425-311 Microplate Reader (Hidex, Finsko)
- ChemiDoc MP Imaging Systém (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Trans-Blot Turbo Transfer Systém (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- SONY spektrální analyzátor SA3800 (SONY Biotechnology, San Jose, CA, USA)
- Laboratorní váhy Radwag (Radwag, Radom, Polsko)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)

### 5.1.3 Buněčné linie

V experimentech této diplomové práce bylo použito celkem 5 leukemických buněčných linií - 2 promyelocytární a 3 myeloidní. Promyelocytární linie HL60-par a HL60 s exprimovaným ABCB1 transportérem (HL60-ABCB1) byly izolovány z periferní krve ženy s akutní promyelocytární leukémií. Poskytnuty byly Dr. Balaszom Sarkadim působícím na akademii věd „Hungarian Academy of Sciences“ sídlící v Budapešti, Maďarsku. Myeloidní linie MOLM-13, THP-1 a Kasumi-1 byly izolovány z periferních krví pacientů s AML a pochází z „Leibniz Institute DSMZ“ v Braunschweigu, Německu. Všechny buněčné linie byly kultivovány v RPMI s 10% FBS s výjimkou Kasumi-1, u kterých bylo použito RPMI obohacené o 20% FBS. Do experimentů byly použity buněčné linie v rozsahu 5.-20. pasáže. Obsah DMSO v buněčných médiích nikdy nepřekročil doporučený limit 0,5%.

### 5.1.4 Analýza genové exprese

Hladina exprese *ABCB1* genu v námi studovaných leukemických buněčných liniích byla analyzována v tříkrokovém procesu. Nejprve bylo nutné izolovat RNA, pak pomocí reverzní transkriptázy převést mRNA na cDNA a poté stanovit genovou expresi pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v jednotlivých buněčných liniích.

#### 5.1.4.1 Izolace RNA

Prvním krokem bylo přidání TRI Reagentu k buňkám (1 ml/1 milión buněk). Vzorek se nechal stát 5 min při pokojové teplotě. Ke vzorku se přidalo 200 µl chloroformu, který byl vzápětí protřepán po dobu 15 s a nechal se stát 10 min při pokojové teplotě. Po této době byl obsah zkumavky centrifugován 15 min při 12 000 g při teplotě 4 °C. Vzorek se rozdělil na 3 fáze. RNA obsažená v horní bezbarvé vodné fázi se přenesla do nové zkumavky společně s 500 µl isopropanolu. Poté se tyto složky silně protřepaly, nechaly stát 10 min při pokojové teplotě a centrifugovaly 8 min při 12 000 g při teplotě 4 °C. Na dně zkumavky se vytvořila peleta, která byla po odsátí supernatantu dvakrát promyta 1 ml 75% ethanolu. Vzorky se opět centrifugovaly při 12 000 g při teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Ethanol se odsál, peleta se

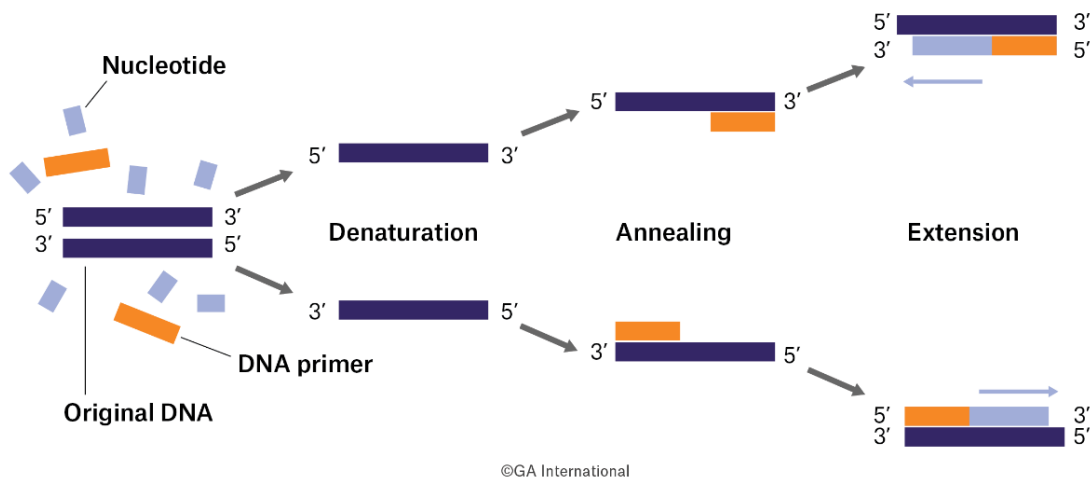
sušila 1-2 minuty za pokojové teploty a rozpustila se v 20  $\mu$ l API. Pomocí NanoDropu ND-1000 se změřila koncentrace a čistota RNA.

#### **5.1.4.2 Reverzní transkripce**

V druhém kroku analýzy genové exprese byla izolována mRNA přepsána do cDNA prostřednictvím reverzní transkripce. Byla připravena směs skládající se z 0,1 mM oligo(dT), námi izolované mRNA odpovídající 1000 ng mRNA a API. Tato směs se promíchala a vložila do termocykléru na 5 min za teploty 65 °C. Mezitím se za pomoci Protoscript II RT kitu připravila směs skládající se z reakčního pufru, dithiothreitolu, deoxyribonukleotidů a reverzní transkriptázy. Po skončení prvního kroku reverzní transkripce se vzorky umístili na led, přidalo se k nim 7,5  $\mu$ l připravené směsi a zahájil se druhý krok reverzní transkripce s následovnými podmínkami: 50 min při teplotě 42 °C a poté 20 min při teplotě 65 °C.

#### **5.1.4.3 qRT-PCR**

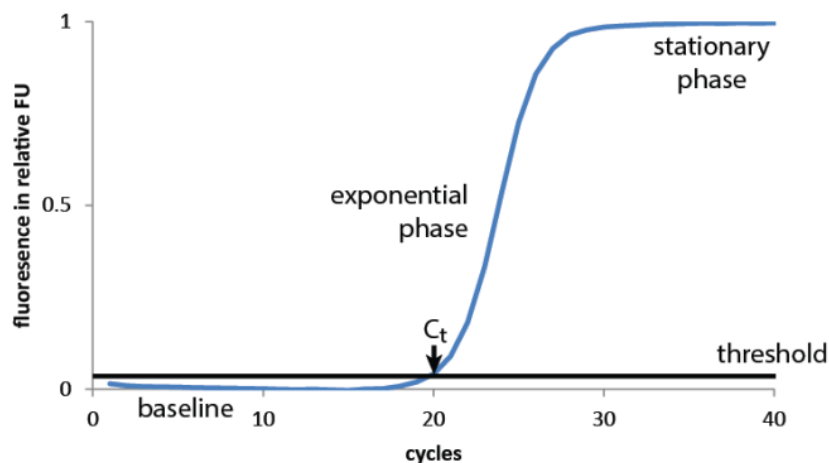
Genová exprese *ABCB1* byla nakonec stanovena pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR). PCR je biochemický proces, při kterém lze kopírovat a amplifikovat DNA za použití tepelně stabilní DNA polymerázy. Na rozdíl od klasické PCR, u kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) jsou produkty měřeny v průběhu reakce a fluorescence je měřena u každého vzorku během jednotlivých cyklů amplifikace. Reakce probíhá ve 3 krocích: denaturace, hybridizace a elongace. Během denaturace dochází k rozpletení dvoušroubovice DNA na dvě vlákna DNA, na které v dalším kroku nasedají primery pro DNA polymerázu. Posledním krokem je syntéza nových řetězců komplementárních k templátu pomocí DNA polymerázy. Po každém cyklu dojde ke zdvojnásobení produktu reakce, a tak množství vznikajících řetězců roste exponenciálně. Stěžejní je nastavení teplot během každého kroku reakce blíže popsáno níže (Freeman, 2012). Průběh reakce je znázorněn na Obr. 4.



#### Obr. 4 Průběh PCR

*Amplifikace DNA skládající se ze 3 základních kroků: denaturace, hybridizace a elongace.  
Převzato z: (Goldberg, 2019)*

Zásadní je hodnota prahového cyklu ( $C_t$ ) definovaná jako počet cyklů, kdy fluorescence dosáhne prahové hodnoty k detekci (Scheffe, Lehmann, Buschmann, Unger, & Funke-Kaiser, 2006). Obecně lze říci, čím menší  $C_t$  hodnota, tím větší je pravděpodobnost exprese daného genu. Grafické znázornění  $C_t$  hodnoty je uvedeno na Obr. 5.



#### Obr. 5 Znázornění $C_t$ hodnoty

*Grafické znázornění real-time PCR skládající se z exponenciální a stacionární fáze. Bod, kdy fluorescenční signál přesáhne prahovou hodnotu je označován jako  $C_t$ .*

*Převzato z blogu: (Compendium)*

Kromě *ABCBI* byly měřeny také referenční tzv. „housekeeping“ (referenční) geny – *B2M*, *HPRT1* a *GAPDH*. Housekeeping geny slouží jako kontroly k normalizaci množství mRNA mezi odlišnými vzorky (Silver, Best, Jiang, & Thein, 2006).

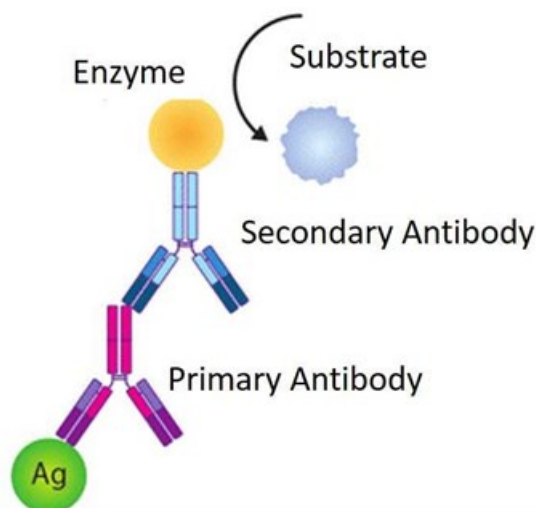
V této práci se sledovala exprese 4 genů, z nichž 3 sloužily jako housekeeping geny. Do každé jamky bylo přidáno 4,5  $\mu$ l směsi (MasterMix, API a příslušný gen). Poté byly napipetovány vzorky o koncentraci 25 ng/ $\mu$ l (HL60-par, HL60-ABCBI, MOLM-13, THP-1, Kasumi-1) v objemu 0,5  $\mu$ l vždy v triplicátu stejně jako kontrola. Mikrotitrační destička se přikryla folií, zamíchala a bylo změřeno počet cyklů, při nichž dojde k hraniční detekci fluorescence, tedy Ct hodnota (teplotní profil: 10 min při 95 °C, poté 40 cyklů 15 sec při 95 °C a 40 cyklů 1 min při 60 °C).

Cílem metody bylo získat Ct hodnotu pro *ABCBI* v jednotlivých liniích, při čemž jako nejstabilnější referenční gen byl vyhodnocen *GAPDH*. Proto byla Ct hodnota pro *ABCBI* normalizovaná v následujících výpočtech výlučně na *GAPDH*. Výsledná data byla vztažena k *ABCBI* expresi v HL60-par.

### 5.1.5 Stanovení proteinů

Proteiny ve vzorcích byli detekované pomocí metody western blottingu, kdy elektroforetickou separací dojde k rozdělení proteinů podle velikosti. Po přenesení proteinů na membránu dojde k jejich detekci správným výběrem primární a sekundární protilátky. Primární protilátka se naváže na protein, v našem případě na ABCBI protein, která je dále rozpoznána protilátkou sekundární. Sekundární protilátka s konjugovaným enzymem umožňuje po inkubaci s vhodným substrátem detekovat světelný signál, který je v důsledku chemické reakce enzym-substrát vysílán (Obr. 6). Náš ABCBI protein odpovídá velikosti 130-180 kDa.





**Obr. 6 Princip detekce proteinu pomocí metody western blotting**

*Schématické znázornění principu detekce spočívající v navázání primární a sekundární protilátky na protein, přičemž sekundární protilátka společně s konjugovaným enzymem umožňuje chemiluminiscenční detekci.*

*Převzato z webové stránky: (Biolabs)*

**5.1.5.1 Příprava vzorků**

Nejprve je nutné proteiny z buňky uvolnit pomocí lyzační metody. Buňky jsou přemístěny na led, centrifugovány, supernatant je poté odsán a nahrazen vychlazeným PBS. Znovu jsou centrifugovány, PBS je odsáno a nahrazeno vychlazeným lyzačním pufrům RIPA s inhibitory proteáz (0,5 ml/5x10<sup>6</sup> buněk) a 1% Tritonem. Buňky byly v tomhle pufru přemístěny do chladu o teplotě -80 °C, následně se nechají rozehrát v teplotě 37 °C a jsou přemístěny na led po dobu 30 min. Nakonec se centrifugují při teplotě 4 °C a 12 000 g po dobu 5 min, přemístí se na led a supernatant se okamžitě použije na další analýzu nebo je zamražen v -80 °C pro pozdější použití.

**5.1.5.2 BCA metoda**

Po lyzační metodě je nutné stanovit koncentraci proteinů v lyzátu, k čemuž slouží BCA metoda. Jedná se o kolorimetrickou metodu založenou na redukci mědi proteinem v alkalickém prostředí a následné tvorbě chelátu s bicinchoninovou kyselinou. Chelát je absorbován při 562 nm. Nejprve byl naředěn albuminový standard BSA na následující

koncentrace – 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 a 1500  $\mu\text{l/ml}$ , které sloužili na vytvoření kalibrační křivky. Poté jsme připravily BCA činidlo skládající se z BCA reagentu A a BCA reagentu B v poměru 50:1. Na destičku bylo napipetováno 25  $\mu\text{l}$  BSA ve všech koncentracích a 25  $\mu\text{l}$  z každého vzorku v triplikátech. Následně bylo do všech jamek přidáno 200  $\mu\text{l}$  předpřipraveného BCA činidla. Poté se vše promíchalo a nechalo inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 562 nm na přístroji Hidex Sense Beta Plus 425-311.

### 5.1.5.3 Western Blotting

Po stanovení koncentrace proteinů následovala metoda western blotting, která nám pomohla odhalit, jestli naše zvolené buněčné linie disponují funkčním ABCB1 také na proteinové úrovni. Aparatura byla umyta, vysušena a správně sestavena. Poté byly připraveny 2 gely – „stacking“ a rozdělovací gel. 7,5% rozdělovací gel byl připraven z 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 30% akrylamid/bisakrylamidu (37,5:1), 8% SDS, 10% APS a temedu. Gel byl napipetován mezi skla aparatury a převrstven hladinou isopropanolu. Po asi 30 min, kdy gel zpolymerizoval byl isopropanol odstraněn, gel byl několikrát omytý vodou a následně usušen. 4% „stacking“ gel ve složení 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 30% akrylamid/bisakrylamid (37,5:1), 10% APS, 8% SDS a temed byl napipetován na rozdělovací gel mezi skla. Ihned se do něj vložil desetijamkový hřeben a gel se nechal dalších 30 minut polymerizovat.

V mezičase se připravily vzorky, které se nejdříve nařídily na příslušnou koncentraci. Ke každému vzorku byl přidán předem připravený pufr skládající se z laemmlie roztoku a 2-mercaptoethanolu (v poměru 9:1). Připravený pufr byl ke vzorkům přidán v poměru 1:3 – tedy 1 díl pufru na 3 díly vzorku. Vzorky byly zahřáty na 37 °C po dobu 10 min a následně schlazeny na ledu.

Zpolymerizované gely se umístili do elektroforetické komory naplněné ledovým 1X running pufr (25 mM Tris base, 190 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). Z gelu byly vyjmuty hřebeny a 10  $\mu\text{g}$  jednotlivých vzorků společně s proteinovým markerem „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) byly napipetovány do příslušných jamek. Po napipetování byla spuštěna elektroforéza při 80 V prvních 20 min, pak bylo napětí zvýšeno na 100 V. Elektroforéza byla ukončena po viditelné migraci vzorků na spodní část gelu.

Po ukončení následovalo tzv. blotování, kdy dochází k přenosu proteinů z gelu na membránu za pomoci „sendviče“, který je vytvořen postupným vrstvením filtračních papírů, aktivované polyvinyllové (PVDF) membrány, gelu a další vrstvy filtračních papírů. Všechny vrstvy byly nejdříve navlhčeny v transferovém pufru (1X TurboBlot, 20% methanol, pH 8,3), aby se zabezpečilo mokré prostředí. Membrána byla aktivována ponořením do methanolu na 1 min a následně omyta v transferovém pufru. Pro blotování byl použit přednastavený protokol systému Trans-Blot Turbo Transfer pro proteiny o velikosti větší než 150 kDa.

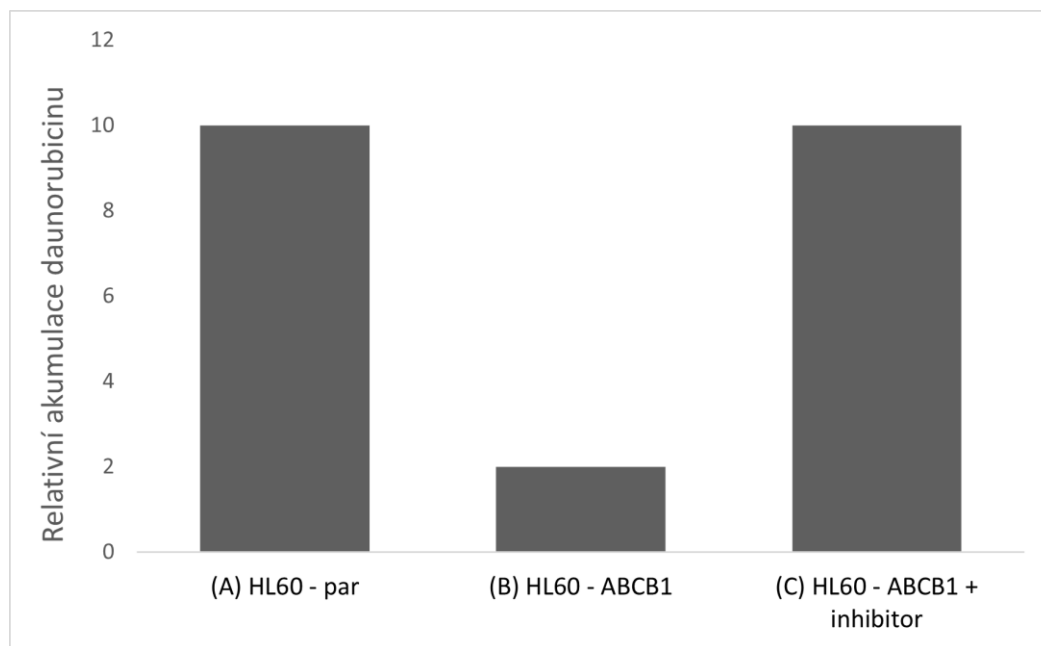
Pro zablokování nespecifického vázání protilátek na povrch membrány byla membrána inkubována v blokovacím roztoku 5% sušeného mléka po dobu 1 hod za konstantního lehkého třepání. Pro zvýšení čistoty signálu se membrána třikrát promyla promývacím roztokem TBS-T (25 mM Tris base, NaCl, pH 7,6, s přídavkem 0,1% Tween-20 jako detergentu). Membrána byla následně inkubována v přítomnosti primárních protilátek anti-ABCB1 (C219) v ředění 1:100 v 5% sušeném mléku nebo anti-beta aktin v ředění 1:2000 v 5% BSA přes noc při teplotě 4 °C. Poté byla membrána 6x promyta roztokem TBS-T a inkubována v přítomnosti sekundární protilátky goat anti-mouse IgG-HRP v ředění 1:5000 v 1% sušeném mléku po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Poté, co byla membrána opětovně 6x promyta roztokem TBS-T se k ní přidalo detekční činidlo SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate a proteiny byly detekovány ChemiDoc MP Imaging systémem.

### **5.1.6 Akumulační studie**

Funkce ABCB1 byla poté stanovena pomocí průtokové cytometrie, která je založena na fluorescenční detekci. Tato metoda sloužila k vyhodnocení akumulace DAU, který je známým substrátem ABCB1.

Funkcí ABCB1 transportéru je odčerpávání látek proti koncentračnímu gradientu z buňky a zabránění tak vniknutí cizorodých látek do intracelulárního prostoru (Choudhuri & Klaassen, 2006). V naší práci jsme použili DAU jako substrát ABCB1 a sledovali jeho kumulaci v buňkách. Za předpokladu přítomnosti ABCB1 v buněčné linii dochází k efluxu DAU z buněk. Za použití inhibitorů ABCB1 naopak dochází ke kumulaci DAU uvnitř buněk

vlivem odstavení transportéru z funkce a zabránění transportu substrátu ven z buněk. Tento princip je patrný z modelové situace na Obr. 7 znázorňující relativní akumulaci DAU u HL60-par, HL60-ABCB1 a HL60-ABCB1 v přítomnosti inhibitoru.



**Obr. 7 Modelová situace znázorňující akumulaci DAU**

*(A) parentní HL60, (B) HL60 s exprimovaným ABCB1, (C) HL60 s exprimovaným ABCB1 v přítomnosti ABCB1-inhibitoru.*

Nejprve byly spočítány buňky v kultivační nádobě. Množství buněk potřebné na experiment se přeneslo do zkumavky (150 000 buněk/vzorek) a nechalo centrifugovat po dobu 5 min při 200 g. Dané množství bylo poté rozsuspendováno v opti-MEM o denzitě 1 000 000 buněk/ml. Poté se připravily koncentrační řady roztoků experimentálních inhibitorů 7225 a 7596 ve dvojnásobné koncentraci. Jako pozitivní kontrola byl použit modelový inhibitor LY o koncentraci 1  $\mu$ M. Jako negativní kontrola sloužila buněčná suspenze v opti-MEM. Do zkumavek bylo přidáno 150  $\mu$ l buněk a 150  $\mu$ l příslušného inhibitoru. Následovala preinkubace při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> na 10 min. Po preinkubaci byl do příslušných zkumavek přidán DAU a všechny zkumavky byly inkubovány 1 hod při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Poté byly umístěny na led, promyty 200  $\mu$ l ledového PBS a centrifugovány při 200 g, 4 °C na 5 minut.

Vzorky byly resuspendovány v 400  $\mu$ l ledového PBS a změřeny na SONY Spectral Analyzer SA3800.

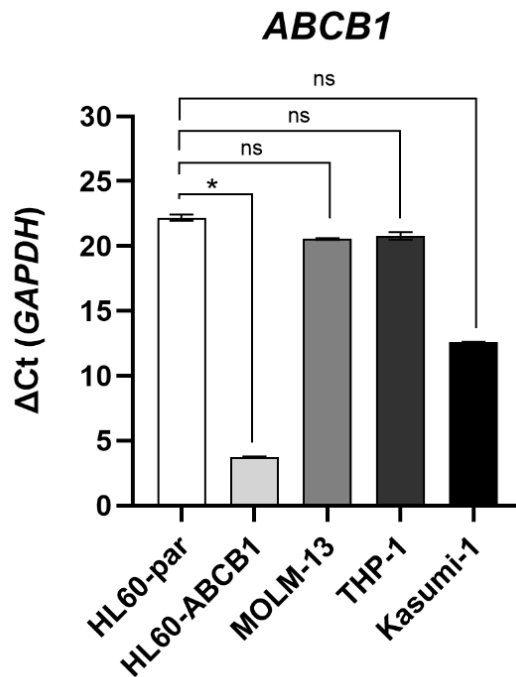
### **5.1.7 Statistické zpracování**

Pro statistickou analýzu a grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistická významnost byla v případě expresních i akumulačních studií stanovena pomocí one-way ANOVA s následným Dunnettovým post hoc testem. Presentována data vyjadřují průměr 3 měření  $\pm$  směrodatná odchylka, v případě PCR průměr 2 měření  $\pm$  směrodatná odchylka. Hodnoty statisticky signifikantní byly vyjádřeny následovně –  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)).

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 PCR

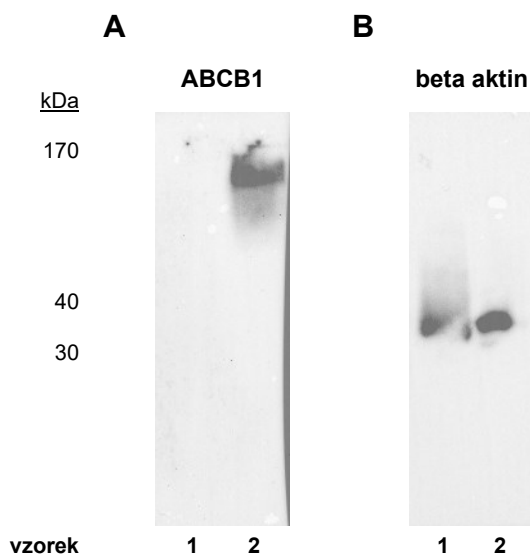
Jak již bylo zmíněno dříve, genová exprese byla hodnocena u 5 buněčných linií – HL60-ABCB1, HL60-par, MOLM-13, THP-1 a Kasumi-1. K normalizaci množství mRNA byl použit referenční gen *GAPDH*, jehož hodnota Ct byla odečtena od Ct hodnoty cílového genu *ABCB1* v jednotlivých buněčných liniích. Exprese *ABCB1* genu byla vztahována k parentním buňkám HL60-par, u nichž exprese *ABCB1* byla nejmenší a rozdíl delta Ct oproti housekeepingovému genu byl roven 22,1. Pro PCR obecně platí, že menší hodnota Ct odpovídá většímu množství DNA vstupující do reakce. Ct hodnota u některých jamek vzorku parentních buněk nebyla ani v rámci hodnocených cyklů PCR identifikována, u některých se blížila hodnotě Ct 40. Z Obr. 8 níže tedy vyplývá, že největší exprese *ABCB1* byla pozorována u rezistentní buněčné linie HL60 s exprimovaným *ABCB1* transportérem, kdy rozdíl delta Ct oproti housekeepingovému genu činil 3,7. Ze zbylých tří leukemických linií byla exprese *ABCB1* pozorována jedině v případě buněčné linie Kasumi-1 s rozdílem delta Ct hodnotou 12,6. Exprese tohoto genu byla u MOLM-13 i THP-1 buněk zanedbatelná, s rozdílem delta Ct blížící se hodnotám HL60-par a s průměrnou Ct hodnotou 38,5, respektive 38,2 pro MOLM-13 a THP-1, což jsou hodnoty na hraně detekční citlivosti (exprese s Ct nad 35 cyklů odpovídá zcela zanedbatelnému počtu templátů genu ve vzorku a je proto považována za téměř nulovou).



**Obr. 8** Grafické znázornění Ct hodnoty *ABCB1* genu u 5 různých leukemických buněčných linií. Ct hodnoty *ABCB1* jsou normalizovány na Ct hodnotu referenčního genu *GAPDH*. Uvedená data jsou vztažena na expresi *ABCB1* v *HL60-par* a prezentována jako průměr 2 nezávislých měření  $\pm$  směrodatná odchylka; ns, nesignifikantní.

## 6.2 Western Blotting

Na proteinové úrovni byly pozorovány 2 buněčné linie – *HL60-par* a *HL60-ABCB1* z důvodu optimalizace metody pro budoucí studie zahrnující vzorky pacientů. V obou liniích byla kromě *ABCB1* proteinu sledována také přítomnost beta aktinu. Beta aktin je používán jako kontrolní protein ve western blottingu nakolik je exprimovaný ve všech eukaryotických buňkách a jeho exprese zůstává neovlivněná i vlivem různých buněčných experimentů. Díky rozdílným velikostem *ABCB1* proteinu (130-180 kDa) a beta aktinu (42 kDa) je snadné je od sebe při detekci rozeznat. Jak je patrné z Obr. 9, *ABCB1* byl v našem případě detekován pouze u *HL60-ABCB1* (Obr. 9A), zatímco detekce beta aktinu byla prokázána u obou buněčných linií (Obr. 9B). *Kasumi-1* nebyly do tohoto experimentu zařazeny z časových důvodů.



**Obr. 9** Reprezentativní western blotting analýza. **(A)** ABCB1 protein byl detekován u HL60-ABCB1 (vzorek 2), zatímco **(B)** kontrolní protein beta aktin byl detekován u obou buněčných liniích, HL60-par (vzorek 1) a HL60-ABCB1 (vzorek 2).

### 6.3 Akumulační studie

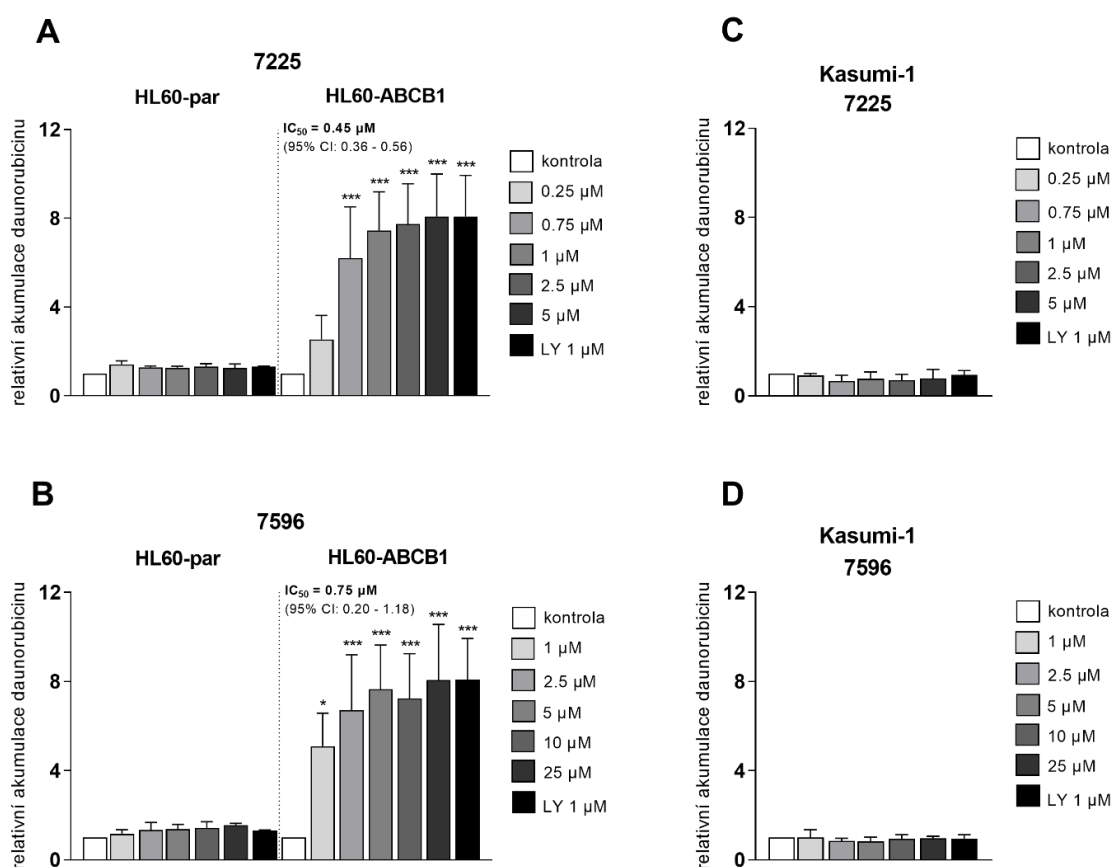
Vzhledem k pozorované expresi *ABCB1* genu u 2 buněčných linií – HL60-ABCB1 a Kasumi-1 – byly tyto zvoleny a použity také pro funkční studie s experimentálními inhibitory 7225 a 7596. Cílem bylo zjistit, zda tyto látky vykazují inhibiční účinek vůči ABCB1 transportéru. U buněčné linie HL60-ABCB1 byla pozorována zvýšená relativní intracelulární akumulace DAU v závislosti na rostoucí koncentraci experimentálního inhibitoru 7225, kdy  $IC_{50}$  činila  $0,45 \mu\text{M}$  (Obr. 10A). V případě inhibitoru 7596 byl taktéž zaznamenán signifikantní nárůst relativní akumulace DAU v závislosti na zvyšující se koncentraci inhibitoru, přičemž jeho  $IC_{50}$  odpovídala  $0,75 \mu\text{M}$  (Obr. 10B). V případě kontrolních buněk HL60-par nebyla pozorována žádná signifikantní změna v akumulaci DAU jako přímý následek inhibitorů. Z grafů na Obr. 10C, D je zřejmé, že u buněčné linie Kasumi-1 nedošlo k zvýšení akumulace DAU ani v přítomnosti experimentálního inhibitoru 7225, ani v přítomnosti 7596. Pro výpočet  $IC_{50}$  se jako 100% inhibiční kontrola použil modelový inhibitor LY 335979 a hodnoty relativní akumulace DAU dosaženy v jeho přítomnosti. Jednotlivé hodnoty  $IC_{50}$  jsou uvedeny v Tab. 1.



**Tab. 1** Hodnoty  $IC_{50}$  a 95% rozmezí intervalu spolehlivosti (95% CI) pro inhibitory 7225 a 7596 u buněčných linií HL60-ABCB1 a Kasumi-1.

	HL60-ABCB1		Kasumi-1	
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	95% CI ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	95% CI ( $\mu\text{M}$ )
<b>7225</b>	0,45	0,36-0,56	nd	nd
<b>7596</b>	0,75	0,20-1,18	nd	nd

Zkratky: nd, nedetekováno.



**Obr. 10** Grafické vyjádření relativní akumulace daunorubicinu v (A, B) HL60-par, HL60-ABCB1 a (C, D) Kasumi-1 v důsledku přítomnosti rostoucích koncentrací inhibitorů 7225 a 7596 a modelového inhibitoru LY. Obrázek také zahrnuje  $IC_{50}$  a 95% rozmezí intervalu spolehlivosti (CI) uvedených inhibitorů. Jednotlivá data jsou prezentována jako průměr 3 měření  $\pm$  směrodatná odchylka.

## 7 DISKUZE

AML je heterogenní onemocnění charakterizované abnormálně diferencovanými buňkami hematopoetického systému (Dohner et al., 2015). Leukemické buňky pacientů diagnostikovaných s AML často exprimují větší množství efluxních transportérů, které mohou být velkou překážkou úspěšné chemoterapie (Shaffer et al., 2012). Mezi klinicky nejvýznamnější patří efluxní transportér ABCB1 neboli P-glykoprotein, který aktivně snižuje koncentraci chemoterapeutik v nádorových buňkách, a to zejména antracyklinů používaných ve standardním terapeutickém režimu AML. U AML pacientů léčených standardní terapií a současnou vysokou expresí ABCB1 byla pozorována nižší odpověď na iniciační léčbu, nižší úspěšnost této léčby, zkrácení intervalu bez symptomů nemoci a kratší doba přežití (Boyer et al., 2019). Nadměrná exprese ABCB1 je proto považována za významný negativní prognostický faktor AML, který představuje jeden z cílů vhodných k optimalizaci chemoterapie a zvýšení šance na kompletní remisi (Hirsch et al., 2012). Rezistenci na chemoterapii přispívají kromě ABCB1 i jiné transportéry z ABC skupiny, nejčastěji ABCC1 a ABCG2. Jedním z možných přístupů pro zvýšení efektivity léčby chemoterapeutiky je inhibovat tyto efluxní transportéry, čím se zvýší intracelulární koncentrace jejich cytotoxických substrátů a tím i jejich antiproliferační účinek. Nedávné studie potvrdili inhibiční účinek vůči ABCB1 u některých FLT3 inhibitorů tvořících nezbytnou součást nynější terapie AML.

FLT3 mutace je považována, rovněž jako ABCB1, za marker špatné prognózy. Jedná se o jednu z nejčastějších mutací u AML, přičemž její výskyt je spojen se špatnou prognózou. Při mutaci FLT3 dochází k stálé aktivaci FLT3 kinázy, co vede ke zvýšené proliferaci a prožívání leukemických buněk, s čím souvisí i zvýšené riziko relapsů (Sakaguchi et al., 2018). V současné době jsou k dispozici v klinické praxi pouze dva inhibitory FLT3 schválené FDA – midostaurin a gilteritinib. Jelikož postupem času jejich účinnost klesá, je kladen důraz na vývoj nových léčiv inhibujících FLT3 (de Jonge et al., 2011).

V této diplomové práci byly zkoumány dvě experimentální léčiva označována číslem 7225 a 7596 s dokázaným inhibičním účinkem právě vůči FLT3 a také CDK2/4. CDK2/4 přitom představují častý cíl mnoha nových léčiv s perspektivou využití v terapii nádorových

onemocnění. Naším hlavním cílem bylo ověřit, zda námi zkoumané FLT3 inhibitory vykazují inhibici i vůči ABCB1. Nejprve byla stanovena genová a proteinová exprese ABCB1 v promyelocytárních a myeloidních liniích, a poté byl ověřen inhibiční potenciál 7225 a 7596 vůči ABCB1 prostřednictvím akumulčních studií. Jako kontrolní linie byli použity promyelocytární buněčné modely, a to HL60-par jako negativní a HL60-ABCB1 jako pozitivní kontrola. Kromě promyelocytárních linií byly použity také leukemické buňky odvozené od AML, a to konkrétně MOLM-13, THP-1 a Kasumi-1. Výsledky akumulční studie prokázali silnou inhibici ABCB1 oběma experimentálními léčivými, kdy  $IC_{50}$  pro 7225 dosáhla  $0,45 \mu\text{M}$  a pro 7596  $0,75 \mu\text{M}$ . Tento inhibiční účinek byl pozorován u buněčné linie HL60-ABCB1. Z pohledu ABCB1 a FLT3 inhibice tak představují velmi slibné molekuly pro další studie.

ABCB1 inhibice byla pozorována jako prospěšný vedlejší mechanismus účinku FLT3 inhibitorů aktuálně používaných v klinické praxi a to midostaurinu a gilteritinibu, kdy vlivem těchto inhibitorů došlo ke zvýšené akumulaci substrátů ABCB1 (Hsiao et al., 2019; Ji et al., 2019; Sucha et al., 2022). Kromě kombinovaného účinku na FLT3 a ABCB1 je známý i kombinovaný účinek na CDK a ABCB1. CDK tvoří důležitou skupinu enzymů podílejících se na regulaci buněčného cyklu, proto nová cílená protinádorová léčiva mnohokrát působí právě na ně. Mezi CDK4/6 inhibitory schválené především na léčbu prsních nádorů patří např. palbociclib, ribociclib nebo abemaciclib (Bosacki et al., 2021), u kterých byla popsána zvýšená akumulace daunorubicinu (ABCB1 substrát) v akumulčních studiích vykonaných na buněčné linii HL60-ABCB1 (Sorf et al., 2020). Voruciclib, léčivo ze skupiny CDK4/6 inhibitorů, také zvýšil intracelulární akumulaci chemoterapeutik snížením jejich efluxu u ABCB1- a ABCG2-exprimujících buněk (Gupta et al., 2018). V současnosti je v první fázi klinického vývoje pro vícero hematologických malignit včetně AML (NIH, 2022b). V nedávné době byla popsána i sloučenina AMG 925 umožňující kombinační inhibiční účinek jak na CDK4/6, tak FLT3 (Uras, Sexl, & Kollmann, 2020). Všechna tato léčiva představují svým duálním účinkem zajímavý přístup vedoucí k zefektivnění terapie pacientů trpících různými typy nádorových onemocnění. Námi zkoumána experimentální léčiva 7225 a 7596 se od výše zmíněných léčiv liší svým jedinečným trojitým účinkem na FLT3, CDK2/4 a ABCB1, který nebyl nikde v literatuře doposud popsán. Nabízejí se tedy jako zajímavé

kandidátní molekuly pro další studie, s vidinou potenciálního využití v léčbě rezistentní AML.

Funkční analýze předcházelo hodnocení bazální exprese *ABCB1* u buněčných linií odvozených od AML (MOLM-13, THP-1, Kasumi-1), a rovněž tak u kontrolních promyelocytárních linií (HL60-par, HL60-ABCB1). Vzhledem k tomu, že Kasumi-1 jako jediná AML buněčná linie vykazovala expresi *ABCB1* genu, byla tato linie zahrnuta do akumulčních studií se studovanými léčivými, přestože již exprese na úrovni mRNA naznačovala pravděpodobně velmi nízkou hladinu na úrovni proteinu. V případě Kasumi-1 opravdu nedošlo k žádnému zvýšení akumulace DAU v přítomnosti léčiv 7225 a 7596 a ani v přítomnosti kontrolního inhibitoru LY 335979. Z toho lze odvodit, že i přes určitou expresi *ABCB1* genu zde ABCB1 protein nebyl exprimován, neboť jeho aktivita nebyla prokázána akumulčními studiemi. U většiny AML pacientů je přítom v době diagnózy exprese ABCB1 relativně vysoká. Ve studii zahrnující 321 pacientů s nově diagnostikovanou AML byla aktivita ABCB1 pozorována u 58 % pacientů (Boyer et al., 2019). Jako vysvětlení se nabízí, že leukemický buněčný model Kasumi-1 odvozený od AML byl odebrán z buněk pacienta s méně exprimovaným ABCB1. Pro potvrzení inhibičního efektu našich látek vůči ABCB1 na modelu relevantním pro AML, by tak bylo vhodné využít jiný buněčný model, ideálně přímo mononukleární buňky izolované z periferní krve či kostní dřeně AML pacientů s prokázanou expresí ABCB1.

## 8 ZÁVĚR

Účinnost standardního terapeutického režimu stále klesá, a to především kvůli vznikající rezistenci, která bývá často výsledkem efluxního účinku ABCB1. V poslední době se do terapie dostávají nová léčiva cílící na jednu z nejčastějších mutací – FLT3 inhibitory. Některé z nich prokázaly svůj vedlejší účinek právě i jako inhibitory ABCB1 transportéru.

Tato diplomová práce se zabývala hodnocením dvou experimentálních látek 7225 a 7596 a jejich možného inhibičního účinku vůči ABCB1. K tomuto hodnocení jsme nejprve ověřovali expresi *ABCB1* ve 3 buněčných liniích odvozených od AML – MOLM-13, THP-1, Kasumi-1. U námi zvolených leukemických buněčných linií byla genová exprese *ABCB1* detekovatelná pouze u Kasumi-1, avšak v akumulární studii funkce ABCB1 nebyla prokázána. Z tohoto důvodu tyto leukemické buněčné linie nepředstavují vhodný buněčný model pro experimenty hodnotící expresi ABCB1. Dále se tedy pokračovalo jenom s promyelocytárními liniemi HL60-par a HL60-ABCB1 s nadměrně exprimovaným ABCB1 transportérem.

U kontrolní linie s exprimovaným ABCB1 (HL60-ABCB1) jsme pozorovali signifikantně zvýšenou akumulaci DAU v závislosti na rostoucí koncentraci 7225 i 7596. Můžeme tak potvrdit, že obě léčiva 7225 a 7596 se chovají jako silné inhibitory ABCB1. Zároveň se jedná o inhibitory FLT3 a CDK2/4, přičemž svým kombinovaným účinkem představují zajímavou možnost terapie AML. V rámci práce se nám podařilo zavést model detekce ABCB1 pomocí western blottingu, který bude možné využít v dalších studiích, zejména zahrnujících hodnocení exprese ABCB1 přímo u vzorků buněk získaných od pacientů s diagnostikovanou AML.

Tato práce poskytuje informace o dokázaném ABCB1-inhibičním účinku nových FLT3 inhibitorů 7225 a 7596, a může tak sloužit jako podklad k dalším studiím těchto slibných anti-AML chemoterapeutik, které by mohly být v budoucnu využity pro svůj trojnásobný účinek.

## 9 ZDROJE

- Ankathil, R. (2017). ABCB1 genetic variants in leukemias: current insights into treatment outcomes. *Pharmgenomics Pers Med*, 10, 169-181. doi:10.2147/PGPM.S105208
- Begicevic, R. R., & Falasca, M. (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*, 18(11). doi:10.3390/ijms18112362
- Biolabs, C. Second Antibodies & Isotype Controls. Retrieved from <https://www.antibody-creativebiolabs.com/category/second-antibodies-isotype-controls-6.htm>
- Borowski, E., Bontemps-Gracz, M. M., & Piwkowska, A. (2005). Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol*, 52(3), 609-627. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175236>
- Bosacki, C., Boulefour, W., Sotton, S., Vallard, A., Daguene, E., Ouaz, H., . . . Magne, N. (2021). CDK 4/6 inhibitors combined with radiotherapy: A review of literature. *Clin Transl Radiat Oncol*, 26, 79-85. doi:10.1016/j.ctro.2020.11.010
- Boyer, T., Gonzales, F., Barthelemy, A., Marceau-Renaut, A., Peyrouze, P., Guihard, S., . . . Cheok, M. (2019). Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers (Basel)*, 11(9). doi:10.3390/cancers11091323
- Cerchione, C., Peleteiro Raindo, A., Mosquera Orgueira, A., Mosquera Torre, A., Bao Perez, L., Marconi, G., . . . Martinelli, G. (2021). Safety of FLT3 inhibitors in patients with acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*, 14(9), 851-865. doi:10.1080/17474086.2021.1969911
- Choi, C. H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*, 5, 30. doi:10.1186/1475-2867-5-30
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol*, 25(4), 231-259. doi:10.1080/10915810600746023
- Compendium, P. Real-time PCR. Retrieved from <https://pcrcompendium.wordpress.com/realtimempcr/>
- Daver, N., Schlenk, R. F., Russell, N. H., & Levis, M. J. (2019). Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, 33(2), 299-312. doi:10.1038/s41375-018-0357-9
- Daver, N., Wei, A. H., Pollyea, D. A., Fathi, A. T., Vyas, P., & DiNardo, C. D. (2020). New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer J*, 10(10), 107. doi:10.1038/s41408-020-00376-1
- de Jonge, H. J., Valk, P. J., de Bont, E. S., Schuringa, J. J., Ossenkoppele, G., Vellenga, E., & Huls, G. (2011). Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica*, 96(9), 1310-1317. doi:10.3324/haematol.2011.040592
- Dohner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 373(12), 1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184
- Freeman, M. D., et al. (2012). *Veterinary PCR Diagnostics*: Bentham Science Publishers.
- George, M. A. (2016). *ABC Transporters - 40 Years on* (1st ed. 2016 edition ed.): Springer.

- Goldberg, A. (2019). A Brief History of PCR and Its Derivatives. Retrieved from <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>
- Gupta, P., Zhang, Y. K., Zhang, X. Y., Wang, Y. J., Lu, K. W., Hall, T., . . . Chen, Z. S. (2018). Voruciclib, a Potent CDK4/6 Inhibitor, Antagonizes ABCB1 and ABCG2-Mediated Multi-Drug Resistance in Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, *45*(4), 1515-1528. doi:10.1159/000487578
- Hano, M., Tomasova, L., Seres, M., Pavlikova, L., Breier, A., & Sulova, Z. (2018). Interplay between P-Glycoprotein Expression and Resistance to Endoplasmic Reticulum Stressors. *Molecules*, *23*(2). doi:10.3390/molecules23020337
- Hirsch, P., Tang, R., Marzac, C., Perrot, J. Y., Fava, F., Bernard, C., . . . Legrand, O. (2012). Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica*, *97*(2), 241-245. doi:10.3324/haematol.2010.034447
- Hsiao, S. H., Lusvardi, S., Huang, Y. H., Ambudkar, S. V., Hsu, S. C., & Wu, C. P. (2019). The FLT3 inhibitor midostaurin selectively resensitizes ABCB1-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*, *445*, 34-44. doi:10.1016/j.canlet.2019.01.001
- Jaramillo, A. C. (2018). How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resist*(1:6-29). doi:<https://doi.org/10.20517/cdr.2018.02>
- Ji, N., Yang, Y., Cai, C. Y., Wang, J. Q., Lei, Z. N., Wu, Z. X., . . . Kong, D. (2019). Midostaurin Reverses ABCB1-Mediated Multidrug Resistance, an in vitro Study. *Front Oncol*, *9*, 514. doi:10.3389/fonc.2019.00514
- Lee, D. J., & Zeidner, J. F. (2019). Cyclin-dependent kinase (CDK) 9 and 4/6 inhibitors in acute myeloid leukemia (AML): a promising therapeutic approach. *Expert Opin Investig Drugs*, *28*(11), 989-1001. doi:10.1080/13543784.2019.1678583
- Linton, K. J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, *22*, 122-130. doi:10.1152/physiol.00046.2006
- Mahadevan, D., & List, A. F. (2004). Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood*, *104*(7), 1940-1951. doi:10.1182/blood-2003-07-2490
- Murphy, C. G., & Dickler, M. N. (2015). The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer. *Oncologist*, *20*(5), 483-490. doi:10.1634/theoncologist.2014-0443
- NIH. (2022a). Cancer Stat Facts: Leukemia - Acute Myeloid Leukemia (AML). Retrieved from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
- NIH. (2022b). A Phase 1 Study of Voruciclib in Subjects With B-Cell Malignancies or AML. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03547115>
- O'Donnell, M. R., Abboud, C. N., Altman, J., Appelbaum, F. R., Arber, D. A., Attar, E., . . . Gregory, K. M. (2012). NCCN Clinical Practice Guidelines Acute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*, *10*(8), 984-1021. doi:10.6004/jncn.2012.0103
- Perl, A. E., Martinelli, G., Cortes, J. E., Neubauer, A., Berman, E., Paolini, S., . . . Levis, M. J. (2019). Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*, *381*(18), 1728-1740. doi:10.1056/NEJMoa1902688
- Popat, U. e. a. (2011). *Leukemia* (1st ed.): Demos Medical.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*, *18*(7), 452-464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8

- Sakaguchi, M., Yamaguchi, H., Najima, Y., Usuki, K., Ueki, T., Oh, I., . . . Inokuchi, K. (2018). Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2(20), 2744-2754. doi:10.1182/bloodadvances.2018020305
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84(11), 901-910. doi:10.1007/s00109-006-0097-6
- Shaffer, B. C., Gillet, J. P., Patel, C., Baer, M. R., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2012). Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat*, 15(1-2), 62-69. doi:10.1016/j.drug.2012.02.001
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 7, 33. doi:10.1186/1471-2199-7-33
- Sorf, A., Sucha, S., Morell, A., Novotna, E., Staud, F., Zavrelova, A., . . . Ceckova, M. (2020). Targeting Pharmacokinetic Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells with CDK4/6 Inhibitors. *Cancers (Basel)*, 12(6). doi:10.3390/cancers12061596
- Sucha, S., Sorf, A., Svoren, M., Vagiannis, D., Ahmed, F., Visek, B., & Ceckova, M. (2022). ABCB1 as a potential beneficial target of midostaurin in acute myeloid leukemia. *Biomed Pharmacother*, 150, 112962. doi:10.1016/j.biopha.2022.112962
- Uras, I. Z., Sexl, V., & Kollmann, K. (2020). CDK6 Inhibition: A Novel Approach in AML Management. *Int J Mol Sci*, 21(7). doi:10.3390/ijms21072528
- Wang, E. S. (2014). Treating acute myeloid leukemia in older adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014(1), 14-20. doi:10.1182/asheducation-2014.1.14
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14. doi:10.12703/P7-14
- Wu, C., Chakrabarty, S., Jin, M., Liu, K., & Xiao, Y. (2019). Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity. *Int J Mol Sci*, 20(11). doi:10.3390/ijms20112829
- Wu, M., Li, C., & Zhu, X. (2018). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 11(1), 133. doi:10.1186/s13045-018-0675-4