

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetik eukaryot



Bc. Lenka Březinová

Inhibitory Mdm2 a p53 v buňkách akutní myeloidní leukemie
Mdm2/p53 inhibitors in acute myeloid leukemia

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Brodská, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Tereza Hrdinová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.7.2024

.....

Bc. Lenka Březinová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Báře Brodské, Ph.D. za ochotu, cenné rady, podporu, trpělivost a čas, které mi věnovala při tvorbě a psaní této práce. Dále děkuji Mgr. Ing. Katce Wolfové za její vstřícný přístup, podporu, čas a pomoc při osvojení si laboratorních metod. Děkuji RNDr. Aleši Holoubkovi, Ph.D. za poskytnutí plazmidu, provedení transfekce HEK-293T buněk a za čas, který mi věnoval. Děkuji RNDr. Terce Hrdinové, Ph.D. za možnost navázat na její disertační práci a za vstřícnost, ochotu a čas, který mi při psaní této práce věnovala. Děkuji Mgr. Petře Otevřelové za ochotu a pomoc s osvojením některých laboratorních přístupů. Dále děkuji všem členům Oddělení proteomiky ÚHKT za vytvoření přátelského prostředí, kterého jsem mohla být součástí. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Akutní myeloidní leukemie (AML) je vážné hematologické onemocnění, jehož léčba je velmi obtížná a pro mnohé pacienty stále neexistuje vhodný léčebný přístup. Jednou z možných terapií se zabývá tato diplomová práce, která se soustředí na inhibici interakce mezi proteiny p53 a Mdm2 pomocí malých molekul RITA a RG7112. Zvolené inhibitory cílí každý na jeden z interakčních partnerů: zatímco RG7112 se váže k Mdm2 ve vazebném místě pro p53, RITA interaguje s p53 v oblasti vazebné domény pro Mdm2. Byl vyšetřen vliv těchto inhibitorů na proliferaci a viabilitu různých AML linií a z nich byly vybrány dvě linie s opačnou citlivostí, MOLM-13 a MV4-11. Podrobnější analýzou byla potvrzena stresová reakce senzitivních linií a různé stupně změn proteinů souvisejících s apoptózou. Vedle buněčných linií byly analyzovány také vzorky primárních AML buněk. Dalším cílem bylo zavést metodu izolace a značení exosomů a vyšetřit typ interakce exosomů s buněčnou membránou. Pomocí konfokálního mikroskopu bylo zjištěno, že způsob interakce mezi buňkou a exosomy závisí na cílové buňce, nikoliv na druhu mateřské buňky. U AML linií dochází k těsnému kontaktu mezi buňkou a exosomy, zatímco linie K562 a HS-5 exosomy internalizují. Dále jsme zaznamenali odlišně exprimované exosomové markery (CD9, CD63, CD81) u exosomů z různých AML linií a primárních patientských vzorků, a též rozdílný obsah jadérekových a apoptotických proteinů. Poslední část práce spojuje předchozí dva dílčí cíle a testuje vliv přítomnosti exosomů na efekt zkoumaných inhibitorů. Nepozorovali jsme žádný vliv koinkubace s exosomy na přenos senzitivity či rezistence vůči RG7112 či RITA ani na úrovni buněčné proliferace a viability, ani z pohledu změn hladin proteinů.

Klíčová slova: AML, RITA, RG7112, p53-Mdm2 interakce, exosomy, inhibitory p53-Mdm2 interakce

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a severe hematologic disorder, which is difficult-to-treat and for some of its subtypes does not exist suitable treatment so far. This diploma thesis is focused on one of these novel approaches targeting an interaction between proteins p53 and Mdm2 by small molecules RITA and RG7112. Each of the selected inhibitors targets one of the interaction partners: while RG7112 binds into Mdm2-binding site of p53, RITA interacts with p53 in the binding domain of Mdm2. An effect of these inhibitors on proliferation and viability of AML cell lines was investigated and two of them, MOLM-13 and MV4-11, were selected as displaying opposite sensitivity. More detailed analysis confirmed stress reaction and changes of apoptosis-related proteins in the sensitive lines. In addition to the cell lines, primary AML cells were also examined. Second aim of this thesis was to validate a method of isolation and labeling of exosomes and to investigate the type of exosome interaction with cell membrane. Confocal microscope monitoring revealed that the type of interaction between a target cell and an exosome depends on the recipient cell type: tight contact is observed between AML cells and exosomes, while K562 and HS-5 cell lines internalize exosomes, regardless their origin. Furthermore, we detected differentially expressed exosome markers (CD9, CD63, CD81) in exosomes obtained from different AML lines or primary patients samples. Simultaneously, variability of nucleolar and apoptotic protein content in exosome samples has been found. The last part of the thesis combines the two previous approaches and tests an impact of exosome coincubation on the drugs effects. However, we didn't observe any effect on the sensitivity or resistance to RG7112 and RITA, neither at the level of cell proliferation and viability, nor in changes in protein levels.

Key words: AML, RITA, RG7112, p53-Mdm2 interaction, exosomes, inhibitors of p53-Mdm2 interaction

Seznam použitých zkratek

Akt	protein kináza B
ALIX	ALG-2 interagující protein X
AML	akutní myeloidní leukemie
ASXL1	z angl. additional sex comb-like 1
CML	chronická myeloidní leukemie
Bak	Bcl-2 homologní antagonist
Bax	Bcl-2-asociovaný protein X
<i>BBC3</i>	Bcl-2 vazebná složka 3, gen pro protein Puma
Bcl-2	z angl. B-cell lymphoma 2
<i>BCL2L1</i>	z angl. Bcl-2-like protein 1, gen pro protein Bcl-xL
Bcl-xL	z angl. B-cell lymphoma-extra large
<i>BCR-ABL</i>	z angl. „breakpoint cluster region“-„Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“
CARTs	T-buňky s chimerickým antigenním receptorem
CEBPA	CCAAT/enhancer vazebný protein alfa
<i>CDKN1A</i>	inhibitor cyklin dependentní kinázy 1A, gen pro protein p21
Chk2	z angl. checkpoint kinase 2
CML	chronická myeloidní leukemie
<i>C-MYC</i>	z angl. Cellular myelocytomatosis oncogene
DC-SIGN	lektinový receptor typu C
<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferasa 3A
ESCRT	endosomální třídící komplex nezbytný pro transport
Fas	povrchový buněčný receptor Fas
Fas-L	ligand povrchového buněčného receptoru Fas
FBL	fibrilarin
FBS	fetální bovinní sérum
FLT3	tyrosin kináza Fms 3
FLT3-ITD	tyrosin kináza Fms3 s vnitřní tandemovou duplikací
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GSK3-β	glykogen syntéza kináza-3 β
GTP	guanosin trifosfát
HMA	hypometylační léky, z angl. Hypomethylating agents
hnRNP K	heterogenní jaderný ribonukleoprotein K

HSC	hematopoetické kmenové buňky
Hsp	proteiny teplotního šoku
HSCP	hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula 1
IDH	isocytrát dehydrogenáza
IFN- γ	interferon γ
<i>IGF-IR</i>	transkripty receptoru inzulinového růstového faktoru I
IL-17	interleukin 17
ILVs	intraluminální váčky
LFA-1	antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů
MCL1	z angl. Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
Mdm2	z angl. Mouse double minute 2 homolog
Mdmx	z angl. Murine double minute X
MET	z angl. Mesenchymal Epithelial Transition
miRNA	microRNA
MRP1	z angl. multidrug resistance protein
MTOC	organizační centrum mikrotubulů
MVBs	multivesikulární tělíska
NCL	nukleolin
NKG2D	z angl. Natural killer group 2 member D
NMR	nukleární magnetické rezonance
Notch1	z angl. Neurogenic locus notch homolog protein 1
<i>NPM1</i>	nukleofosmin 1
Parc	ubikvitin ligáza podobná Parkinu
PARP	poly-ADP-riboza polymeráza
p21	cyklin-dependenční kinázový inhibitor 1
p53-wt	nemutovaný p53, protein p53-wild type
PD-1	protein programované buněčné smrti 1
PD-L1	ligand proteinu programované buněčné smrti 1
<i>PMAIP1</i>	z angl. Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, gen pro protein NOXA
<i>PPM1D</i>	proteinová fosfatáza 1D
Puma	p53-upregulovaný modulátor apoptózy
RING	z angl. Really Interesting New Gene
RITA	reaktivátor p53 a induktor apoptózy nádorových buněk

RSR	naděje na relativní přežití, z angl. Relative survival rate
Sp1	protein specificity 1
TET2	z angl. ten-eleven translocation 2
TGF-beta1	transformující růstový faktor beta 1
<i>TP53</i>	gen nádorového proteinu p53, gen proteinu p53
TP53BP1	p53 protein vázající protein 1
<i>TP53I3</i>	protein 3 indukovatelný nádorovým proteinem p53
TSG101	protein genu 101 citlivý k nádoru
WHO	Světová zdravotnická organizace

Obsah

1	ÚVOD	1
2	PŘEHLED LITERATURY	2
2.1	Akutní myeloidní leukemie	2
2.1.1	Charakteristika onemocnění	2
2.1.2	Výskyt AML a její léčba.....	3
2.2	Interakce proteinů Mdm2 a p53	4
2.2.1	Inhibitory potlačující interakci Mdm2 a p53	6
2.3	Exosomy	15
2.3.1	Charakteristika exosomů	15
2.3.2	Formování exosomů	15
2.3.3	Interakce exosomů s buněčnou membránou.....	17
2.3.4	Exosomy jako terapeutické váčky	20
2.3.5	Role exosomů a extracelulárních váček u AML	22
3	CÍLE.....	24
4	MATERIÁL A METODY	25
4.1	Materiál.	25
4.1.1	Chemikálie a roztoky.....	25
4.1.2	Buněčné linie a primární AML buňky.....	32
4.1.3	Protilátky	33
4.1.4	Primery	36
4.1.5	Inhibitory	36
4.1.6	Laboratorní přístroje	37
4.2	Metody.....	38
4.2.1	Kultivace buněčných linií	38
4.2.2	Měření proliferace a viability buněčných linií.....	38
4.2.3	Měření proliferace a viability buněčných linií kokultivovaných s exosomy	38
4.2.4	Izolace primárních buněk	39
4.2.5	Příprava bezexosomového média	39
4.2.6	Nasazení buněk pro produkci a izolaci exosomů.....	39
4.2.7	Izolace exosomů	40
4.2.8	Filtrace exosomů.....	41
4.2.9	Sklizeň buněk na qPCR, izolace RNA, reverzní transkripce a qPCR	42
4.2.10	Elektroforéza DNA (produktů qPCR reakce)	43
4.2.11	Příprava lyzátů a western blot	43
4.2.12	Imunoprecipitace.....	45

4.2.13	Průtoková cytometrie	45
4.2.14	Barvení vzorků a konfokální mikroskopie	46
5	VÝSLEDKY	48
5.1	Charakteristika účinku inhibitorů p53-Mdm2 na buňky AML	48
5.1.1	Vyšetření vlivu inhibitorů na proliferaci a viabilitu AML linií	48
5.1.2	Vliv inhibitorů na transkripci v AML liniích a primárních vzorcích.....	50
5.1.3	Hladina proteinů u AML linií a primárních AML buněk	57
5.1.4	Vliv inhibitorů na buněčný cyklus u AML linií (MV4-11, MOLM-13)	65
5.2	Vyšetření exosomových markerů a typu interakce exosomů s cílovými buňkami.....	67
5.2.1	Detekce exosomových markerů a proteinů v exosomových lyzátech a jejich mateřských buňkách..	67
5.2.2	Exosomy z buněk ošetřených RG7112 nebo RITA.....	70
5.2.3	Typy interakce exosomů s buněčnou membránou.....	72
5.3	Vliv přítomnosti exosomů na účinek inhibitorů v AML liniích	90
6	DISKUZE.....	97
6.1	Účinek inhibitorů interakce p53-Mdm2 u AML linií.....	97
6.2	Vyšetření exosomálních proteinů a typu interakce exosomů s cílovými buňkami	100
6.3	Vliv přítomnosti exosomů na účinek inhibitorů u AML linií.....	102
7	SOUHRN	104
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	105

1 ÚVOD

Akutní myeloidní leukemie (AML) je heterogenní onemocnění krvetvorby, které postihuje různá stádia vývoje buněk myeloidní krevní řady. Vyskytuje se především u dospělých pacientů a u nemocných starších 65 let často není možná intenzivní chemoterapeutická léčba (De Kouchkovsky a Abdul-Hay 2016). U velké části pacientů navíc dochází k relapsům, a proto se stále hledají nové léčebné přístupy. Jednou z možných léčebných metod se zabývá tato diplomová práce, která studuje malé molekuly RG7112 (Vu et al. 2013) a RITA (Issaeva et al. 2004) cílící na potlačení interakce mezi proteiny Mdm2 a p53. Zatímco RG7112 je modifikovaná sloučenina nutlinů (Vu et al. 2013) a váže se do vazebné kapsy proteinu Mdm2, RITA se naopak váže na N-koncovou část proteinu p53 (Issaeva et al. 2004). Protein p53 je důležitý tumor supresor regulující buněčný cyklus a apoptózu a jako transkripční faktor ovlivňuje další geny zodpovědné za reakci buněk na stres. Mdm2 je ubikvitin ligáza, která polyubikvitinylací označuje své cílové proteiny pro degradaci v proteasomu. Nejdůležitějším cílem Mdm2 je právě p53, který zároveň zpětně ovlivňuje transkripci Mdm2 (Kubbutat et al. 1997; Fang et al. 2000; Wang et al. 2011). Přestože mutace v genu pro p53 nejsou u AML příliš časté, chybná regulace p53 ke vzniku AML přispívá, a proto se v těchto terapiích cílí na obnovení její správné funkce (Selivanova 2014). Nově je u nádorových onemocnění studován také vliv mezibuněčné komunikace a s tím související možné terapeutické využití exosomů. Ty se řadí mezi extracelulární váčky, dosahují velikosti 30 – 150 nm (Schageman et al. 2013) a dokáží různým způsobem interagovat s okolními buňkami. Exosomy přenášejí různé signální molekuly mezi buňkami, a tím mohou ovlivnit jejich signální dráhy. U chronické myeloidní leukemie (CML) dokáží exosomy přenést rezistenci na používané léčivo (Min et al. 2018; Hrdinova et al. 2021). U AML je jejich vliv méně prozkoumán a součástí této diplomové práce je proto charakterizace exosomů získaných z buněk AML, analýza interakce těchto exosomů s cílovými buňkami a studium efektu přítomnosti exosomů na účinek RG7112 a RITA.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Akutní myeloidní leukemie

2.1.1 Charakteristika onemocnění

Akutní myeloidní leukemie (AML) je nádorové hematologické onemocnění krevních buněk myeloidní řady, zejména granulocytů a monocytů, případně erytrocytů, charakterizované nadprodukcí nezralých buněčných forem s poruchou diferenciací (tj. blastů). Dochází k abnormální proliferaci blastů v kostní dřeni, což utlačuje normální krvetvorbu. Zároveň se blasty hromadí i v periferní krvi a potlačují tak normální krvetvorbu, způsobují tedy snížení počtu zdravých krevních elementů. V blastech se často nacházejí specifické genové mutace, které dané buňce zajišťují proliferační výhodu, méně časté jsou chromosomální abnormality, jako je translokace či inverze chromozomů. Nejčastěji se mutace typické pro AML objevují v genech pro nukleofosmin 1 (*NPM1*), DNA-methyltransferázu 3A (*DNMT3A*), tyrosin kinázu Fms 3 (*FLT3*), CCAAT/enhancer vazebný protein alfa (*CEBPA*). Dalšími typickými mutacemi jsou mutace v genech pro isocitrát dehydrogenázu 1 a 2 (*IDH1/2*), genu pro ten-eleven translocation 2 (*TET2*), genu pro additional sex comb-like 1 (*ASXL1*) a další (Saultz a Garzon 2016). U 5-18% pacientů jsou nalézány mutace v genu pro tumor-supresor p53 (*TP53*) (Fenaux et al. 1992; Nakano et al. 2000; Kadia et al. 2016). Mutace v konkrétním genu často souvisí s prognózou léčby pacienta, důležitým prognostickým faktorem jsou také změny karyotypu (Lindsley et al. 2015; Saultz a Garzon 2016).

AML může vznikat *de novo*, sekundárně z předchozího hematologického onemocnění (nejčastěji z myelodysplastického syndromu) či reakcí na léčbu jiného nádorového onemocnění (tzv. therapy-related AML) (De Kouchkovsky a Abdul-Hay 2016). Původní klasifikace podle Světové zdravotnické organizace (WHO) (Arber et al. 2016) byla nedávno pozměněna a nyní jsou pacienti s AML diagnostikováni především hierarchicky dle konkrétních mutací a přítomnosti komplexního karyotypu. Při diagnostice dále záleží na procentu blastů v kostní dřeni, kdy pro diagnózu AML je podmínkou více než 10 % blastů (děleno dále na 2 kategorie 10-19 % blastů, ≥ 20 % blastů), s výjimkou kategorie s opakujícími se genetickými abnormalitami (translokace či inverze částí chromozomů) (Döhner et al. 2022). AML může souviset i s dalšími nádorovými onemocněními, např. relapsem AML může dojít ke vzniku myeloidního sarkomu (Arber et al. 2016).

2.1.2 Výskyt AML a její léčba

AML se vyskytuje převážně u dospělých pacientů, incidence narůstá s věkem a prudce se zvyšuje u pacientů starších 65 let (National Cancer Institute 2023; Bower et al. 2016). Se zvyšujícím věkem pacienta se u AML snižuje očekávaná délka života (Bower et al. 2016). Pacientům se v kostní dřeni, periferní krvi, a případně i v dalších orgánech hromadí blasty, což se projevuje leukocytózou, anémií, či trombocytopenií, doprovázenými často únavou, ztrátou hmotnosti a dalšími příznaky. Pokud se nezačíná včasná léčba, pacient obvykle umírá do několika měsíců, často na následky spojené se sekundární infekcí či krvácením (De Kouchkovsky a Abdul-Hay 2016). Důležitým faktorem pro stanovení způsobu léčby je celkový zdravotní stav pacienta. U mladších pacientů se obvykle využívá intenzivní chemoterapie spočívající v podávání kombinace vysokých dávek cytarabinu (cytosinarabinosid) s antracyklinovými antibiotiky (idarubicin, případně daunorubicin). Pacienti starší 65 let často trpí dalšími komorbiditami a jejich zdravotní stav nedovoluje použití vysokodávkové chemoterapie. V takových případech se používají buď nižší dávky cytarabinu nebo hypometylační léky (hypomethylating agens, HMA) využívané též u léčby myelodysplastických syndromů, jako je decitabin a azacitidin (De Kouchkovsky a Abdul-Hay 2016; Döhner et al. 2022). V posledních letech se HMA kombinují s inhibítorem proteinu Bcl-2 (z angl. B-cell lymphoma 2), Venetoclaxem (Döhner et al. 2022).

Cílem první, tzv. indukční, fáze léčby je dosažení remise, po níž následuje konsolidační fáze (obvykle nižší dávky chemoterapeutik) (Döhner et al. 2022) nebo alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSC) (Saultz a Garzon 2016). Při volbě vhodné léčby se vždy zvažuje cytogenetický profil pacienta, což spolu s genetickými odchylkami tvoří základ pro určení prognózy léčby (De Kouchkovsky a Abdul-Hay 2016). V průběhu let došlo u mladších AML pacientů do věku 50 let ke zvýšení naděje na relativní přežití (relative survival rate, RSR), u pacientů starších 65 let dochází k mírnému zvýšení naděje na RSR (Bower et al. 2016). Pokud pacient přežije 5 let po diagnóze, naděje na přežití se zvyšuje, avšak mladší pacienti přesto ztratí více roků života ve srovnání se staršími (Bower et al. 2016). Pokud dojde k relapsu onemocnění, pouze malá část pacientů znovu dosáhne kompletní remise (Saultz a Garzon 2016).

AML je velmi komplexní onemocnění, základní léčebné schéma se používá již desítky let, ale vzhledem k intenzitě léčby není pro velké procento pacientů vhodné. Navíc se u velké části pacientů objevují relapsy, jejichž léčba je ještě složitější. Proto se stále vyvíjejí nové léčebné přístupy, zaměřené na konkrétní subtypy AML. Jedním z těchto léčiv jsou inhibitory

FLT3 kinázy, konkrétně midostaurin, který se využívá v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky pro léčbu pacientů s mutací v tyrosin kináze Fms3 s vnitřní tandemovou duplikací (*FLT3-ITD*) (Döhner et al. 2022). V klinických studiích byly testovány i další FLT3 inhibitory, s rozdílnými výsledky, je tedy potřeba dalšího výzkumu (Saultz a Garzon 2016). Další specifické inhibitory cílí například na mutace IDH, jaderný exportér CRM1 (Saultz a Garzon 2016) nebo molekuly ovlivňující imunitní reakce pacienta (nejčastěji dráhu proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-1) a jeho ligandu (PD-L1) (Jimbu et al. 2021)). Individualizovanou léčbu slibuje nový přístup využívající upravené T-buňky s chimerickým antigenním receptorem (CARTs) (Saultz a Garzon 2016).

Jedním z cílených léčebných přístupů se zabývá tato diplomová práce, která se soustředí na inhibici interakce mezi proteiny p53 a Mdm2 (z angl. Mouse double minute 2 homolog) pomocí malých molekul RG7112 (analog dříve používaných nutlinů) (Vu et al. 2013) nebo RITA (Reaktivátor p53 a induktor apoptózy nádorových buněk) (Issaeva et al. 2004). Tyto inhibitory byly zkoumány již u jiných typů nádorů (Enge et al. 2009; Grinkevich et al. 2009; Tovar et al. 2013), ale i u pacientů s AML (Andreeff et al. 2016; Hoffmann-La Roche 2016b). Podrobněji je vliv těchto molekul na interakci Mdm2-p53 popsán v následující kapitole.

2.2 Interakce proteinů Mdm2 a p53

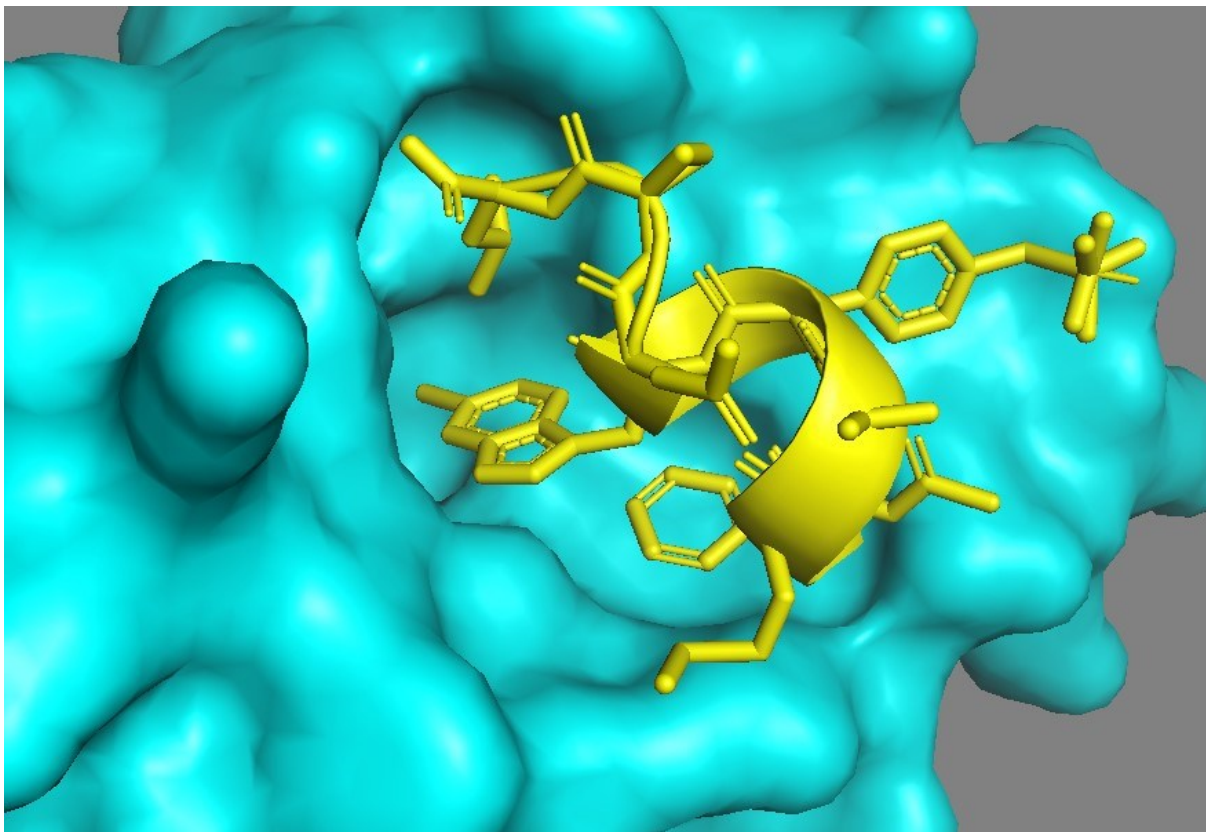
Protein p53, tumor-supresor kódovaný genem *TP53*, je důležitý při kontrole buněčného cyklu a apoptóze, reguluje procesy stárnutí buněk a opravy DNA (Chen et al. 1996; Mihara et al. 2003). Je jedním z hlavních faktorů řídících odpověď buňky na stres vyvolaný různými léčivy: jako transkripční faktor ovlivňuje expresi řady genů zodpovědných za stresové reakce a díky interakci s dalšími proteiny (například s proteiny rodiny Bcl-2 na mitochondriální membráně) řídí signalizaci vnitřní apoptotické dráhy (Mihara et al. 2003). Ve zdravých buňkách je jeho hladina udržována na nízké úrovni interakcí s ubikvitin-ligázou Mdm2, která p53 ubikvitinyluje pomocí své RING (z angl. Really Interesting New Gene) domény (Kubbutat et al. 1997; Fang et al. 2000; Wang et al. 2011) a označuje ho tak pro degradaci v proteasomu (Kubbutat et al. 1997). Tento mechanismus je dále posilován ještě autoregulační smyčkou, kdy protein p53 jako transkripční faktor aktivuje expresi genu *MDM2*, a tím zajišťuje dostatečnou úroveň Mdm2 proteinu pro snížení své aktivity (Wu et al. 1993). Ve zdravých buňkách má proto p53 velmi krátký poločas rozpadu (přibližně 5-20 minut) (Giaccia a Kastan 1998). Pokud je p53 mutovaný tak, že není schopen aktivovat transkripci *Mdm2*, dochází k akumulaci proteinu p53 v buňkách (Kubbutat et al. 1997). V takových případech je ale často narušena také

funkčnost proteinu p53 (Giaccia a Kastan 1998). Interakce proteinu p53 a Mdm2 je znázorněna na obrázku 1.

Pro interakci p53 a Mdm2 jsou důležité jednotlivé domény proteinů, a sice N-koncová transaktivační doména proteinu p53 a N-koncová doména Mdm2 (Kubbutat et al. 1997). Interakce těchto proteinů a následná degradace p53 jsou děje od sebe oddělitelné (Kubbutat et al. 1998). Pro ubikvitinylační aktivitu Mdm2 je důležitá interakce nejen přes N-koncové domény, ale též interakce mezi centrální doménou (kyselou oblastí) Mdm2 a částí DNA vázající domény proteinu p53 (Wallace et al. 2006; Ma et al. 2006). Ubikvitinylační aktivita Mdm2 je zajištěna RING doménou, zejména její C-koncovou částí (Fang et al. 2000; Poyurovsky et al. 2007). Mdm2 v závislosti na své koncentraci může způsobit monoubikvitinylaci a s tím spojený jaderný export, či polyubikvitinylaci jako signál pro degradaci proteinu p53 (Li et al. 2003). Při polyubikvitinylaci p53 pomocí Mdm2 je důležitá přítomnost Mdmx (Wang et al. 2011), polyubikvitinylovaný protein p53 je pak v proteasomu degradován (Li et al. 2003). Naopak pokud má být protein p53 přesunut do cytoplazmy, je potřeba odkryt jeho jadernou exportní sekvenci. To se děje pravděpodobně v několika krocích, kdy je nejprve p53 monoubikvitinylován pomocí Mdm2, následně může být C-konec p53 dále modifikován (sumoylace), Mdm2 se disociuje od p53 a ten je přesunut z jádra do cytoplazmy (Li et al. 2003; Carter et al. 2007).

Důležitým regulátorem této interakce je protein Mdmx (z angl. Murine double minute X), strukturální analog Mdm2, který se váže na N-koncovou část proteinu p53 (Shvarts et al. 1996). Mdmx sice nemá ubikvitinylační aktivitu (Linares et al. 2003; Wang et al. 2011), ale spolu s proteinem Mdm2 tvoří přes RING domény komplex indukující zvýšenou degradaci p53 pomocí Mdm2 (Gu et al. 2002; Linares et al. 2003; Wang et al. 2011). Mdmx tedy degradaci p53 napomáhá tím, že zvyšuje stabilitu Mdm2 (Gu et al. 2002).

Interakce Mdm2-p53 může být blokována specifickou fosforylací obou proteinů (Shieh et al. 1997; Mayo et al. 1997). Při poškození DNA dojde k aktivaci DNA-dependentní protein kinázy, fosforylaci p53 na serinu 15 (Shieh et al. 1997) a fosforylaci Mdm2 na serinu 17 (Mayo et al. 1997), což způsobí inhibici jejich interakce, a tumor-supresor p53 tak může zastavit buněčný cyklus (Mayo et al. 1997). Stejný efekt je pozorován i u fosforylace transaktivační domény proteinu p53, kdy je ovlivněna nejen interakce, ale i potlačení negativní regulace pomocí Mdm2 (Shieh et al. 1997; Lai et al. 2000). Funkce fosforylace vždy závisí na typu modifikované aminokyseliny (Kruse a Gu 2009).



Obrázek 1- Detail vazebné kapsy proteinu Mdm2 (modře) a vázající se peptid p53 (žlutě). Zdroj: molekula 2GV2 (krystalová struktura) stažena z Protein Data Bank (Sakurai et al. 2006) a následně upravena v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC).

2.2.1 Inhibitory potlačující interakci Mdm2 a p53

Protein p53 je důležitým regulátorem reakcí buňky na poškození a v nádorových onemocněních je často jeho funkce potlačena. Jeden z terapeutických přístupů tedy cílí na jeho stabilizaci a aktivaci. K tomuto účelu lze cílit na inhibici více proteinů, léčiva se mohou vázat přímo na protein p53, do kapsy proteinu Mdm2 (zabránění navázání p53 či blokace E3 ubikvitinylací aktivity), do vazebného místa proteinu Mdmx, či na proteiny Mdm2 a Mdmx současně a způsobit tak jejich duální inhibici (Selivanova 2014). V této diplomové práci se zabývám malými molekulami vázajícími se na protein p53 (RITA) a inhibitory vázajícími se do kapsy proteinu Mdm2 (nutliny-RG7112) (Vu et al. 2013; Tovar et al. 2013). Inhibice interakce p53 s proteinem Mdm2 způsobí akumulaci tumor supresoru p53, což má za následek zastavení buněčného cyklu a apoptózu buněk a tím potlačení růstu nádoru (Vassilev et al. 2004). Aktivovaný protein p53 svoji vazbou na promotor přímo ovlivňuje transkripci genů, genová exprese ale může být ovlivněna též kooperací p53 s dalšími transkripčními faktory (Nikulenkov et al. 2012). Léčba pomocí nutlinů může být účinná zejména u onemocnění

s nemutovaným p53 (p53-wild type, p53-wt), v nichž regulací hladiny p53 podporuje jeho funkci (Vassilev et al. 2004; Issaeva et al. 2004; Kojima et al. 2005).

Tento možný typ léčby se zkoumá i u onemocnění AML, v klinických studiích byly inhibitory využity v kombinaci s již používanými chemoterapeutiky (Yee et al. 2013). Výskyt mutací v genu *TP53* je v AML relativně nízký (u nově diagnostikovaných pacientů obvykle 5-18%) a často je spojen s dalšími genetickými abnormalitami (Fenaux et al. 1992; Nakano et al. 2000; Kadia et al. 2016). Nicméně deregulace p53 signální dráhy je v AML pozorována i u pacientů s p53-wt, často je spojená např. s nižší expresí genu pro protein p21 (cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1), a proto by stabilizace proteinu p53 prostřednictvím inhibitorů mohla tuto signální dráhu obnovit (Quintás-Cardama et al. 2017). Navíc právě u leukémií (i AML) je často popisovaná zvýšená exprese *MDM2* (Bueso-Ramos et al. 1993) a jeho proteinu, zejména u pacientů bez mutace *TP53* (Quintás-Cardama et al. 2017), což může přispívat k účinku nutlinů na spuštění apoptózy v různých nádorových buňkách *in vitro* (Kojima et al. 2005) i *in vivo* (Tovar et al. 2013). U AML pacientů může být dále zvýšena hladina proteinu Mdmx, v tomto případě ale nebyla prokázána souvislost s lepší odpovědí na léčbu nutlinem (Quintás-Cardama et al. 2017). U některých pacientů jsou silně aktivovány dráhy PI3K/Akt a STAT 1/3/5 (Quintás-Cardama et al. 2017). Potlačení PI3K/Akt dráhy a následně snížení exprese onkogenu *C-MYC* (z angl. Cellular myelocytomatosis oncogene) je u některých nádorových onemocnění pozorováno také při použití RITA (Grinkevich et al. 2009).

2.2.1.1 Nutliny

Nutliny jsou cis-imidazolinové sloučeniny, které se váží se do kapsy proteinu Mdm2, v oblasti vazebné domény pro p53 (Vassilev et al. 2004). Vassilev se spoluautory také uvádějí, že nutliny primárně působí na nádorové tkáně, v zásadní míře však neovlivní zdravé buňky (Vassilev et al. 2004). Nádorové tkáně spuštěním signalizace reagují na poškození DNA (např. zvýšený p53 protein vázající protein 1, TP53BP1) a tím může být způsobena specifita nutlinu-3 pro nádorové tkáně (Brummelkamp et al. 2006). Nejúčinnější variantou z původní řady nutlinů je nutlin-3, konkrétně jeho enantiomer a (nutlin-3a) (Vassilev et al. 2004). Studie autorů Ma et al. (Ma et al. 2006) ukazuje, že vazbou nutlinu-3a dojde k aktivaci p53 a transkripční aktivaci dalších genů. Jedná se tedy o spuštění apoptózy transkripčně závisící na p53. Avšak v některých dalších pracích (týkajících se AML nebo chronické lymfocytární leukemie) byla pozorována apoptóza nezávisící na transkripční aktivitě p53, ale doprovázená translokací p53 do mitochondrií a jejich následnou permeabilizací (Kojima et al. 2005; 2006a). Pro účinnou

léčbu nutlinem-3a je pravděpodobně nezbytná nenarušená p53 signální dráha (Tovar et al. 2006).

Po ošetření buněk nádorových linií nutlinem-3a se zvýší hladina genové exprese *BBC3* (Bcl-2 vazebná složka 3, gen pro protein Puma) (Nikulenkov et al. 2012) a *CDKN1A* (inhibitor cyklin dependentní kinázy 1A, gen pro protein p21) (Tovar et al. 2006). Je zvýšena i hladina proteinu p21 (Vassilev et al. 2004). Naopak je snížena hladina onkoproteinu c-Myc a antiapoptotického proteinu survivinu u senzitivních buněčných linií (Grinkevich et al. 2009). Tento inhibitor u rakovinných buněk působí efektivně na proteiny signální dráhy p53 *in vitro* i *in vivo* (Tovar et al. 2006).

Významný účinek nutlinu-3a způsobující apoptózu byl pozorován i u AML buněčných linií (OCI-AML3, MOLM-13), které mají nemutovaný p53 protein (Kojima et al. 2005). Při působení nutlinu-3a byla ve dvou studiích pozorována zvýšená hladina proteinů p53 a Mdm2 (Kojima et al. 2005; Strachotová et al. 2023) a zeslabená interakce mezi těmito proteiny (Strachotová et al. 2023). Dále byla popsána zvýšená hladina proteinů p21, NOXA a štěpení kaspáz-3, -8, -9 v různých časových intervalech, naopak hladiny proteinů p53-upregulovaný modulátor apoptózy (Puma), Bcl-2-asociovaný protein X (Bax) a Bcl-2 homologní antagonist (Bak) zůstaly nezměněné (Kojima et al. 2005). Následkem aktivované signální dráhy p53 došlo také ke snížení hladiny antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Kojima et al. 2006b). U některých buněčných linií byla po ošetření nutlinem-3a pozorována zpětná regulace apoptózy p53-řízenou indukcí Notch 1 (z angl. Neurogenic locus notch homolog protein 1) na transkripční i proteinové úrovni (Secchiero et al. 2009). Tento výsledek podtrhuje důležitost zvážení všech aspektů při volbě vhodné léčby.

Vliv nutlinu-3a byl zkoumán i u primárních AML buněk. Ve většině těchto buněk byla pozorována apoptóza, která nesouvisela se stadiem AML, avšak opět byla podmíněna přítomností p53-wt (Kojima et al. 2005). Heterogenita AML onemocnění a s ní související odlišná reakce primárních buněk na nutlin-3 je pozorována i v jiné studii (Long et al. 2010). Byla potvrzena vyšší senzitivita k nutlinu-3a u rakovinných buněk s vyšší expresí genu *MDM2* (Tovar et al. 2006). Také zvýšená hladina proteinu Mdm2 u primárních AML buněk přispěla k vyšší míře apoptózy (Kojima et al. 2005). Tato účinnější odpověď související s vyšší hladinou Mdm2 byla potvrzena i v klinické studii I zabývající se modifikovanou sloučeninou nutlinu (RG7388, idasanutlin) u AML pacientů (Reis et al. 2016). Vliv nutlinu-3a na hladiny proapoptotických proteinů se mezi primárními AML buňkami lišil (Kojima et al. 2005).

Nadějně jsou výsledky studií kombinujících použití nutlinu-3a s dalšími terapeutiky. U AML buněk byla pozorována zvýšená apoptóza v kombinaci s léčivými standardně používanými pro léčbu AML (cytarabin, antracyklin) (Kojima et al. 2005).

2.2.1.2 RG7112

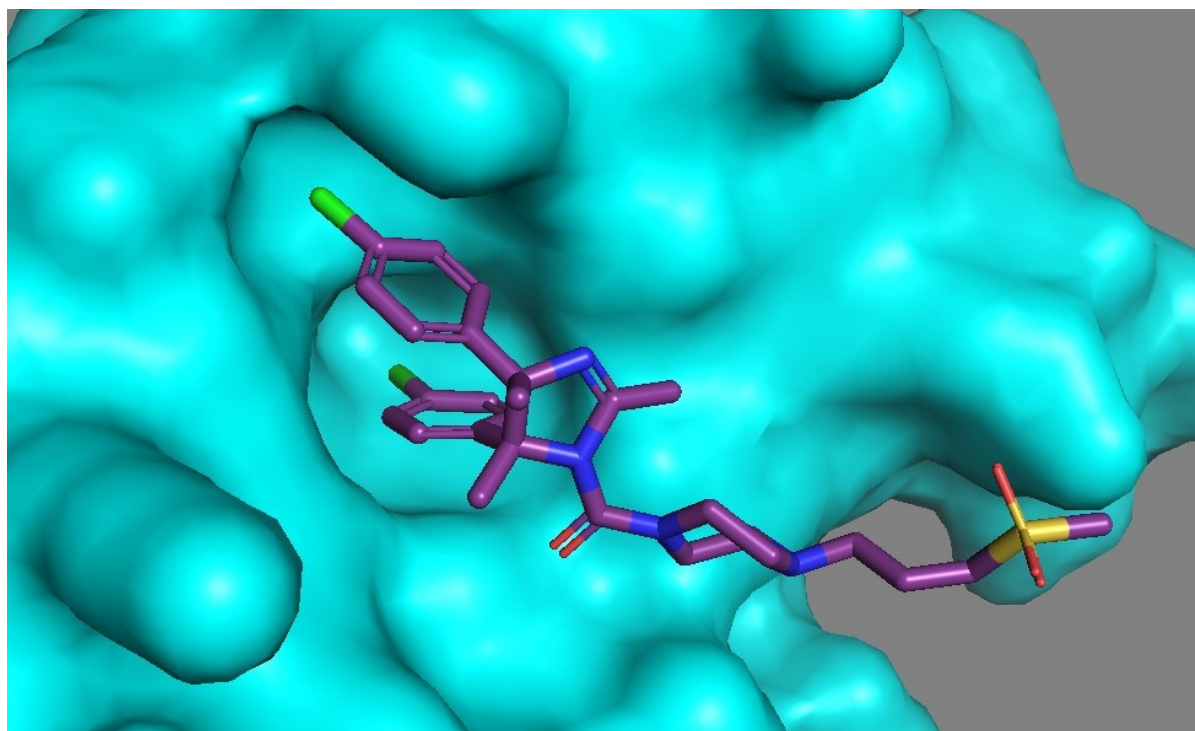
RG7112 se řadí do rodiny nutlinů, ale má oproti nutlinu-3a vyšší účinnost (Vu et al. 2013). RG7112 je modifikovaná sloučenina nutlinu-3a, která byla vyvinuta jako molekula s optimalizovanými vlastnostmi původního inhibitoru (Vu et al. 2013). V této diplomové práci byla použita jako zástupce rodiny nutlinů při zkoumání jejich vlivu na buněčné linie pocházející z AML a na primární AML buňky. RG7112 má podobné vlastnosti jako nutlin-3a, tedy jedná se o Mdm2 inhibitor, který se zvyšující se koncentrací způsobí akumulaci p53-wt a jeho transkripčních cílů p21, Mdm2 na mRNA i proteinové úrovni (Tovar et al. 2013), indukuje rovněž zvýšení genové exprese *BBC3* (Zhong et al. 2015). Následkem toho dojde k zastavení buněčné proliferace, buněčného cyklu v G1 fázi a apoptóze nádorových buněk *in vitro* i *in vivo* (Tovar et al. 2013). Apoptóza indukovaná molekulou RG7112 může být na kaspázách závislá či nezávislá. Po inhibici kaspáz je pozorována nekrotická apoptóza, kdy RG7112 může být využit i u nádorů s malým množstvím kaspáz (Tovar et al. 2013). Stejně jako k nutlinu-3a, jsou i k RG7112 nejvíce senzitivní buněčné linie se zvýšenou hladinou genu *MDM2* (Tovar et al. 2013; Zhong et al. 2015).

Při designu molekuly RG7112 byla využita schopnost nutlinu-3a vázat se do kapsy proteinu Mdm2, konkrétně napodobení vázání aminokyselin proteinu p53 (Leu26, Trp23, Phe19) do vazebné domény Mdm2. Její chemické složení je: 4-chlorofenylové kruhy (kapsa pro Leu26 a Trp23) a ethoxyskupina (kapsa pro Phe19). RG7112 je ale bezpečnější a její účinná dávka je minimálně 4x nižší než u nutlinu-3a (Vu et al. 2013). Interakce molekuly RG7112 s proteinem Mdm2 je zobrazena na obrázku 2.

Sloučenina RG7112 byla zařazena do klinických studií fáze I, kdy byl zkoumán její efekt na různé typy rakoviny, jako jsou hematologické malignity (leukemie) a solidní nádory (Hoffmann-La Roche 2016a; 2016b). Klinická studie zabývající se účinkem pouze samotného léčiva RG7112 (tzv. monoterapie) měla u pacientů s různými typy leukémií rozporuplné výsledky (Andreeff et al. 2016). Zejména pacienti s AML často odpovídali na léčbu maximální tolerovanou dávkou, avšak velká většina léčených pacientů měla zároveň nežádoucí účinky stupně 3 či 4. U AML pacientů ve studii pokračujících byla pozorována odlišná odpověď na vystavení maximální tolerované dávce a u těch odpovídajících na léčbu byla zvýšena genová exprese proteinů p21, Mdm2, Puma, Bax a dalších, indukovaná p53. U malé části AML

pacientů došlo ke kompletní remisi onemocnění. Závěrem klinické studie je konstatování, že u vybraných pacientů lze cílit na inhibici interakce Mdm2-p53 a spustit tak signální dráhu proteinu p53 (Andreeff et al. 2016). Pro efektivní aktivaci této dráhy a účinnou léčbu RG7112 je důležitá neporušená p53 signální dráha (Tovar et al. 2013). V současné době je molekula RG7112 používána pouze pro výzkumné účely.

Mezi nutliny lze zařadit i idasanutlin, který se při léčbě AML v kombinaci s cytarabinem dostal do fáze III klinické studie. Tato studie byla ukončena z důvodu malé účinnosti. Doba přežití bez negativních událostí (z angl. Event-Free Survival) byla u těchto pacientů vypočtena na 4,36 týdnů a u pacientů přijímajících placebo s cytarabinem na 6,29 týdnů, celková míra přežití (z angl. Overall Survival) je u pacientů přijímajících placebo s cytarabinem 9,13 měsíců a idasanutlin v kombinaci s cytarabinem 8,28 měsíců. Také míra celkové remise (z angl. Rate of Overall Remission) byla o několik procent vyšší u pacientů přijímajících pouze cytarabin (Hoffmann-La Roche 2021).



Obrázek 2 – Interakce E3-ubikvitin ligázy Mdm2 (světle modře) a jejího inhibitoru RG7112 (uhlíky – fialově, dusíky – modře, síra – oranžově, kyslíky – červeně, chlor – zeleně). Na obrázku je detailní navázání inhibitoru RG7112 do kapsy proteinu Mdm2, tím dochází k napodobení vazby proteinu p53 a k inhibici interakce Mdm2-p53. Zdroj: molekula 4IPF (krystalová struktura) stažena z Protein Data Bank (Sakurai et al. 2006) a následně upravena v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC).

2.2.1.3 RITA

Již výše bylo zmíněno, že RITA byla jako molekula vázající se na N-koncovou část proteinu p53 zařazena mezi inhibitory interakce p53-Mdm2 *in vitro* i *in vivo*. Po vazbě RITA

pravděpodobně dojde ke konformační změně proteinu p53, a tím i ke změně vazby některých interakčních partnerů (inhibitor proteinu stimulujícího apoptózu p53, ubikvitin ligáza podobná Parkinu (Parc), p300). RITA však neinhibuje interakci mezi p53 a antiapoptotickým proteinem Bcl-xL (z angl. B-cell lymphoma-extra large) (Issaeva et al. 2004). V jiné studii bylo pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) zjištěno, že RITA pravděpodobně neinhibuje komplex p53-Mdm2 *in vitro* (Krajewski et al. 2005). Ošetření buněk RITA má za následek sníženou ubikvitinylaci tumor-supresoru p53, jeho buněčnou akumulaci a aktivaci p53 signální dráhy v nádorových buňkách (Issaeva et al. 2004). Dokonce dojde k rozrušení komplexu p53 a Mdmx, jehož negativní regulace p53 je popsána výše (Burmakin et al. 2013). Účinek RITA byl zkoumán u buněčných linií karcinomu tlustého střeva, osteosarkomu, (Issaeva et al. 2004; Enge et al. 2009), karcinomu plic, ledvin (Enge et al. 2009), prsu (Enge et al. 2009; Zhao et al. 2010), B-lymfoblastoidní linie, dlaždicobuněčného karcinomu (Zhao et al. 2010), neuroblastomu (Burmakin et al. 2013), AML (Wolfová et al. 2023), ale také u zdravých fibroblastů (Issaeva et al. 2004) a mononukleárních buněk periferní krve (Wolfová et al. 2023).

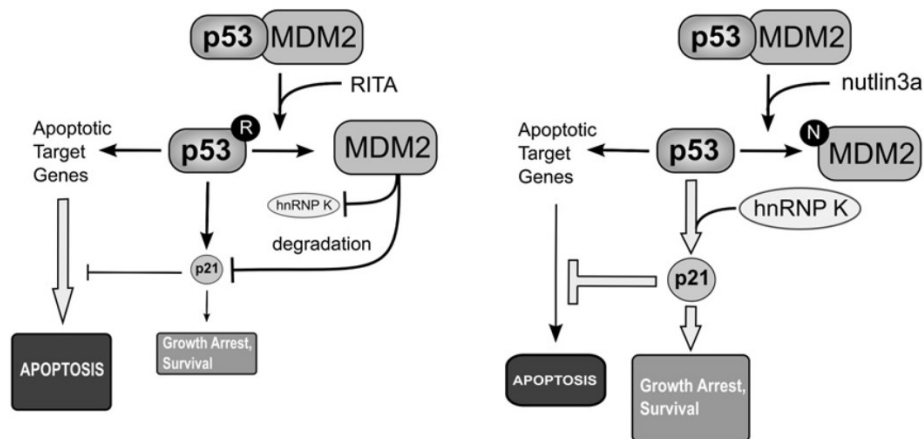
Změna genové exprese řízené p53 je po ošetření RITA pozorována u nádorových buněk s p53-wt (Enge et al. 2009). Konkrétně dojde ke zvýšení produkce proapoptotických genů *BAX*, *TP53I3* (protein 3 indukovatelný nádorovým proteinem p53), *FAS* (povrchový buněčný receptor Fas), *PMAIP1* (z angl. Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, gen pro protein NOXA) a *BBC3*, dále genů zastavujících buněčný cyklus *CDKN1A* (gen pro protein p21), *PPM1D* (proteinová fosfatáza 1D) a dalších (Issaeva et al. 2004; Enge et al. 2009). Byla zaznamenána také zvýšená genová exprese *MDM2* a zvýšená hladina proteinů Mdm2, Puma (Issaeva et al. 2004), NOXA (Grinkevich et al. 2009) a Bax (Burmakin et al. 2013). V jiné studii zabývající se neuroblastomy byla hladina proteinu Mdm2 po RITA snížena (Burmakin et al. 2013). Dále bylo zjištěno, že hladina proteinu Mdm2 souvisí s dobou působení RITA (Spinnler et al. 2011). Prostřednictvím p53 je naopak transkripčně potlačena genová exprese antiapoptotického genu *BCL2*, onkogenu *C-MYC* (z angl. Cellular myelocytomatosis oncogene) (Grinkevich et al. 2009; Zhao et al. 2010), *MCL1* (z angl. Induced myeloid leukemia cell differentiation protein), nebo *BIRC-5* (gen pro survivin) (Grinkevich et al. 2009). Sníženy jsou i hladiny příslušných proteinů, tedy Bcl-2 (Burmakin et al. 2013), Mcl-1, survivinu a onkoproteinu c-Myc, *in vitro* i *in vivo* (Grinkevich et al. 2009). Při léčbě RITA je prostřednictvím p53 ovlivněna a inhibována signalizační dráha PI3K/Akt, což má za následek potlačení translace c-Myc (Grinkevich et al. 2009). Podle Grinkevich et al. je pro účinnou apoptózu prostřednictvím p53 důležitá aktivace proapoptotických genů stejně jako represe

onkogenů (Grinkevich et al. 2009). Naopak ve zdravých fibroblastech není po ošetření RITA pozorována zvyšující se hladina proteinu p53 (Issaeva et al. 2004; Grinkevich et al. 2009), ani nejsou ovlivněny onkoproteiny (Grinkevich et al. 2009). Stejně tak RITA neměla zásadní vliv na mononukleární buňky periferní krve od zdravých dárců, tedy nezpůsobila v nich DNA poškození (Wolfová et al. 2023). Zvýšená hladina p53 odpovídá zvýšeným hladinám proteinů Puma a survivin po 48 hod, beze změny jsou hladiny proteinů Mcl-1 a c-Myc a nedochází ani k výraznému štěpení poly-ADP-ribózy polymerázy (PARP) a kaspázy-3 (Wolfová et al. 2023).

U neuroblastomů je pozorována snížená interakce p53 a Mdmx po léčbě RITA (Burmakin et al. 2013). Snížená hladina proteinu Mdmx po RITA je potvrzena i v jiné studii zabývající se buňkami karcinomu tlustého střeva, prsu, plic a ledvin (Spinnler et al. 2011). Navíc právě snížení Mdmx v těchto buněčných liniích souvisí se senzitivitou k RITA. Degradace Mdmx koreluje se sníženou hladinou protein fosfatázy 1D, která aktivuje kinázu ATM fosforylující a inhibující Mdmx. Je indukována apoptóza prostřednictvím p53 signální dráhy (Spinnler et al. 2011). Ne vždy se ale výsledky různých autorů shodují, příkladem může být exprese genu *PPM1D* pro výše zmíněnou protein fosfatázu. Pro stejnou buněčnou linii karcinomu tlustého střeva je v jedné studii analýzou diferenciální genové exprese zjištěn gen jako zvýšený (Enge et al. 2009), naopak v jiné studii byl snížen na genové i proteinové úrovni (Spinnler et al. 2011). Tyto rozdílné výsledky by mohly být způsobené odlišnou dobou působení RITA, kdy genová exprese byla u Spinnler et al. měřena po 8 hod, naopak u studie Enge et al. po 12 hod. Koncentrace RITA byla v těchto experimentech stejná, tedy 1 μ M.

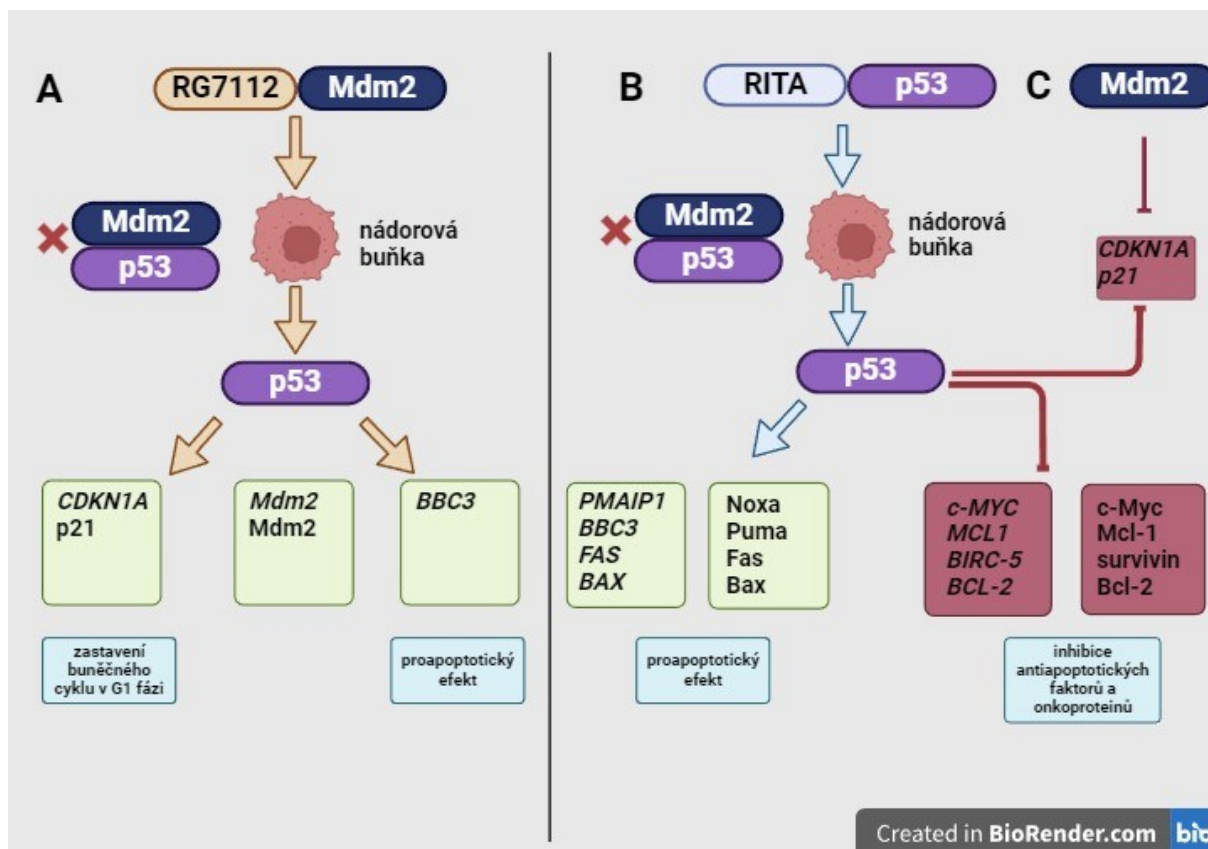
Na rozdíl od efektu nutlinu-3a, po ošetření buněk RITA většinou nedochází k nárůstu hladiny proteinu p21, protože ten je proteasomálně degradován prostřednictvím Mdm2. Ve studii Enge et al. (Enge et al. 2009) je dokonce u buněk karcinomu tlustého střeva pozorována mírně snížená exprese genu pro protein p21 po 8 hodinách působení RITA ve srovnání s účinkem RITA po 4 hod, vůči kontrole je ale zvýšen. Tento efekt dle autorů souvisí se sníženou hladinou transkripčního koaktivátoru p53 hnRNP K (heterogenní jaderný ribonukleoprotein K) ovlivněného ubikvitinylační aktivitou Mdm2 (Obrázek 3). Snížený hnRNP K pak nemůže interagovat s p53 a způsobit transkripční aktivaci p21. Působením RITA je tedy negativně ovlivněna hladina p21 na genové i proteinové úrovni (Enge et al. 2009). Toto zjištění nepodporuje studie Burmakin et al., kteří zjistili mírně zvýšenou hladinu proteinu p21 po 24 hodinách působení RITA u buněčných linií neuroblastomů (Burmakin et al. 2013). Ačkoliv výše zmíněné studie používaly stejnou koncentraci (1 μ M) RITA, liší se právě typem

zkoumaného nádoru (buněčná linie karcinomu tlustého střeva a neuroblastom). U většiny AML patientských vzorků senzitivních k 2 μ M RITA je po jejich ošetření pozorována snížená hladina proteinu p21 (Wolfová et al. 2023). Výjimkou je vzorek jednoho pacienta, kdy je dočasně (po 8 hod působení RITA) pozorována zvýšená hladina p21, a po 24 hod a 48 hod dochází ke snížení jeho hladiny (Wolfová et al. 2023). Studii Enge et al. s pozorovanou sníženou hladinou p21 potvrzuje i výzkum částečně senzitivních a rezistentních AML linií k RITA, kdy u senzitivnější linie MV4-11 je hladina p21 po 24 hod snižena, a naopak je zvýšená u rezistentnějších AML linií (MOLM-13, OCI-AML2, OCI-AML3). Hladina p21 by spolu s dalšími faktory (Puma, survivin, fosforylované formy NPM) mohla indikovat senzitivitu k RITA (Wolfová et al. 2023).



Obrázek 3 – Rozdíl mezi vlivem inhibitorů RITA a nutlin-3a na funkci proteinu Mdm2, p21, hnRNP K a následných buněčných dějů. Při léčbě RITA vázající se na p53 není ovlivněna funkce Mdm2 a tento protein označuje hnRNP K pro degradaci v proteasomu. Tento transkripční koaktivátor neinteraguje s p53 a nedojde k aktivaci genu pro protein p21. K degradaci proteinu p21 též přispívá Mdm2. V pravé části obrázku je vysvětlen mechanismus působení nutlinu-3a na transkripční a proteinovou hladinu p21. Jelikož se na Mdm2 váže nutlin-3a, nedojde k inhibici hnRNP K a tento transkripční koaktivátor interaguje s p53 a indukuje aktivaci transkripce p21. Převzato z (Enge et al. 2009)

Při porovnávání vlivu nutlinu-3a a RITA na signální dráhu p53 u nádorové linie karcinomu prsu bylo zjištěno, že oběma léčivými indukovaná exprese p53 ovlivňuje z více než poloviny stejné geny (Nikulenkov et al. 2012). Vlivem RITA i nutlinu-3a je stabilizovaný protein p53, což způsobí sníženou expresi Aurora kinázy A na genové i proteinové úrovni. Potlačeným genem je u nutlinu-3a i onkogen *STAT3*, který též reguluje gen pro Aurora kinázu A. Protein p53 kooperuje s mnoha transkripčními faktory, např. E2F, a následně pak dojde k represi dalších genů. Jedním z důležitých transkripčních faktorů po ošetření buněk je protein specificity 1 (Sp1), který zejména vlivem RITA reguluje cílové geny signální dráhy p53. Sp1 je tedy důležitým regulátorem p53 závislé apoptózy po RITA a při umlčení Sp1 pomocí shRNA je pozorováno zvýšení *MDM2*, *NOTCH* a pro-proliferáčnických genů (Nikulenkov et al. 2012).



Obrázek 4 – Shrnutí vlivu inhibitorů RG7112 (A) a RITA (B, C) na transkripční cíle p53 a jejich proteinů u nádorových buněk. Část A tohoto obrázku znázorňuje mechanismus RG7112 vážícího se na Mdm2, což následně inhibuje interakci Mdm2-p53 a dojde k aktivaci p53 u nádorových buněk. Je zvýšena genová hladina CDKN1A a jeho proteinu p21 a dojde k zastavení buněčného cyklu, dále je ovlivněn gen BBC3 a dochází k proapoptotickému efektu. Jsou též pozorovány zvýšené hladiny Mdm2 na genové i proteinové úrovni. Naopak v části B tohoto obrázku je zobrazen účinek molekuly RITA vážící se na protein p53, který je touto vazbou chráněn před degradací v proteasomu. Stabilizovaný protein ovlivní geny související s proapoptotickým efektem (PMAIP1, BBC3, FAS, BAX) a jejich proteinové produkty (NOXA, Puma, Fas). Účinkem RITA a aktivací p53 jsou inhibovány antiapoptotické proteiny a onkoproteiny na genové (C-MYC, MCL-1, BIRC-5, BCL-2) i proteinové úrovni (c-Myc, Mcl-1, survivin). V části C tohoto obrázku lze vidět inhibici proteinu p21 a jeho genu působením RITA, prostřednictvím proteinu Mdm2. Detailní mechanismus vysvětlen na Obrázku 3. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

RITA snižuje životaschopnost a indukuje p53-závislou apoptózu u nádorových buněk s p53-wt (Enge et al. 2009), ale na rozdíl od nutlinů má efekt i u buněk s mutovaným p53 (Zhao et al. 2010; Burmakin et al. 2013). U nádorových linií s mutovaným p53 je navzdory mutaci pozorována převážně apoptóza transkripčně závislá na p53, štěpení PARP a aktivace exekutivních kaspáz (Zhao et al. 2010; Burmakin et al. 2013). Mutovaný p53 je pravděpodobně reaktivován, studie Burmakin et al. navrhuje možnou změnu konformace proteinu p53 po ošetření RITA (Burmakin et al. 2013), možná konformační změna p53 byla navrhována i v počáteční studii Issaeva et al. 2004 (Issaeva et al. 2004). Na transkripční úrovni je zvýšená hladina genů *CKDN1A*, *BAX*, *PMAIP1*, *BBC3* lišící se u jednotlivých nádorových linií s odlišnými mutacemi p53 (Zhao et al. 2010). Na proteinové úrovni je opět zvýšená hladina Puma (Zhao et al. 2010), Bax a NOXA (Burmakin et al. 2013). Naopak snižená je genová hladina *BIRC-5*, *BCL2*, *C-MYC*, *MCL1*, po čase související se sníženou hladinou proteinů

c-Myc a Mcl-1 (Zhao et al. 2010) a Bcl-2 (Burmakin et al. 2013). Nádorové linie s mutovaným p53 se též liší dobou odezvy na ošetření RITA (Zhao et al. 2010).

Ovlivnění interakce mezi Mdm2 a p53 tedy spouští celou kaskádu změn v buněčné signalizaci a zejména u buněk s p53-wt může snižovat agresivitu nádoru reaktivací apoptotické dráhy závislé na p53.

2.3 Exosomy

2.3.1 Charakteristika exosomů

Exosomy jsou extracelulární váčky ohraničené fosfolipidovou dvouvrstvou a jejich velikost je v rozmezí 30 –150 nm (Schageman et al. 2013). Už v roce 1983 byly tyto vesikuly objeveny při internalizaci transferinového receptoru retikulocyty, z nichž se poté opět uvolňovaly do extracelulárního prostředí (Harding et al. 1983). Později byly popsány různé způsoby jejich interakce s buňkami. Exosomy ovlivňují cílové buňky pomocí signalizačních povrchových molekul nebo svým obsahem, který do buněk uvolňují (Gurung et al. 2021). Tyto váčky vytvářejí shluky (Tkach et al. 2017). Exosomy lze najít v moči, krvi a dalších tělních tekutinách (Pisitkun et al. 2004; Kang et al. 2020). Proto se mohou využívat i jako citlivý biomarker k detekci určitých onemocnění (Kang et al. 2020).

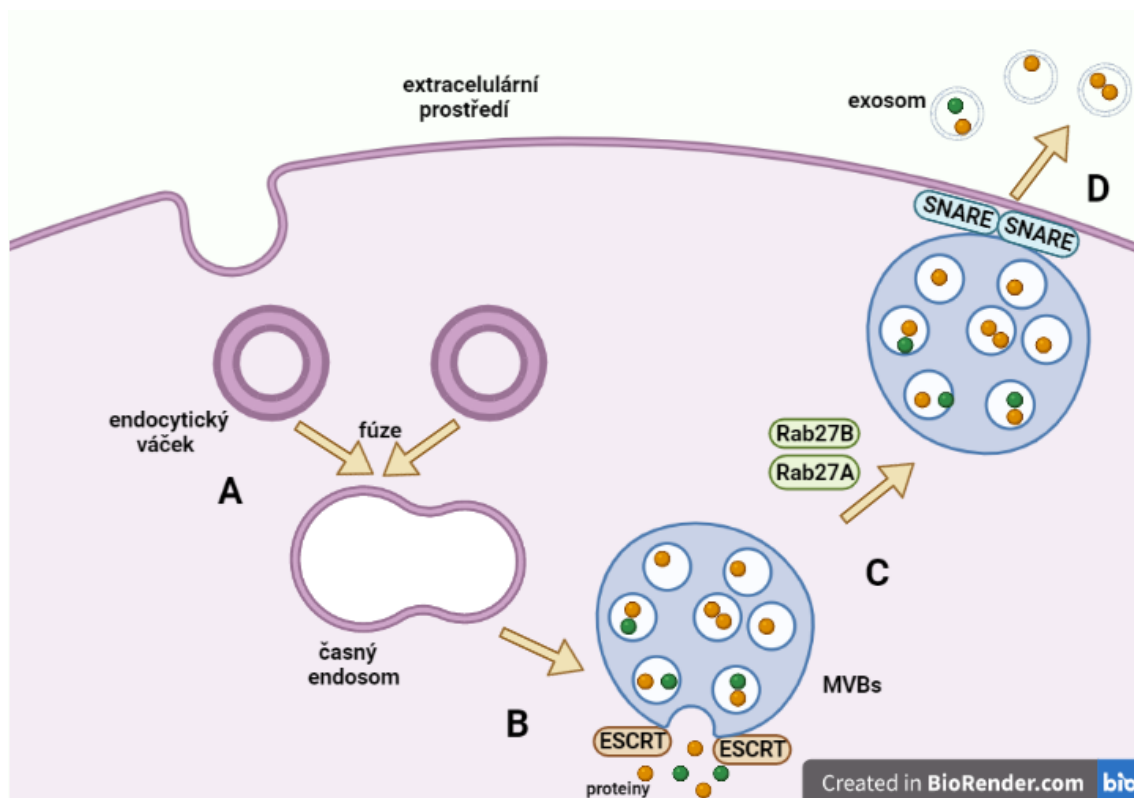
Hlavní složkou exosomů jsou membránové proteiny tetraspaninové rodiny (CD9, CD63 a CD81), dále endosomální třídící komplex nezbytný pro transport (ESCRT), proteiny zodpovědné za uvolnění exosomů: protein genu 101 citlivý k nádoru (TSG101) a ALG-2 interagující protein X (ALIX), proteiny zodpovědné za formování váčků jako malé GTPázy Rab, integriny, cytoskeletární proteiny a proteiny teplotního šoku (Hsp) (Gurung et al. 2021). Důležité je také složení fosfolipidové membrány exosomů, jejími hlavními složkami jsou fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylcholin (Parolini et al. 2009). Ve srovnání s buněčnou membránou obsahuje membrána exosomů ve zvýšené míře sfingomyelin, monosialodihexosylgangliosid a cholesterol (Parolini et al. 2009). Exosomy přenášejí DNA, různé typy RNA (mRNA, miRNA, nekódující RNA) a proteiny (Gurung et al. 2021; Mears et al. 2004). Množství přenášených proteinů a nukleových kyselin souvisí nejen s typem mateřských buněk, ale také s velikostí exosomů (Zhang et al. 2018).

2.3.2 Formování exosomů

Prvním krokem formování exosomů je fúze endocytických váčků, které se tvoří v buňce vchlípením plazmatické membrány, za vzniku časného endosomu. Tento proces může probíhat závisle nebo nezávisle na klatrinu či kaveolinu (Mashouri et al. 2019).

Vznik a sekrece exosomů je složitý heterogenní proces (Gurung et al. 2021). Vznik exosomů začíná v cytoplazmě buňky (znázorněno na obrázku 5), kdy se z membrány časných endosomů během jejich zrání formují intraluminální váčky (ILVs) (Stoorvogel et al. 1991). Vzniklé pozdní endosomy obsahující ve svém lumen ILVs se nazývají multivesikulární tělíška (MVBs). Třídění proteinů a dalšího obsahu do ILVs je velmi komplexním a důležitým procesem, na kterém se podílejí čtyři ESCRT komplexy skládající se z mnoha proteinů (Colombo et al. 2014). Tento proces sortování je závislý na ubikvitinylaci, ale přesný mechanismus dosud není znám (Gurung et al. 2021). ILVs zároveň mohou vznikat i drahou nezávislou na ESCRT (Stuffers et al. 2009). MVBs buď podléhají degradaci v lysozomu, anebo jsou pomocí Rab GTPáz a SNARE proteinů přichycena na plazmatickou membránu, a následnou exocytózou jsou ILVs uvolněna do extracelulárního prostředí (Gurung et al. 2021). Takto sekretované ILVs pak nazýváme exosomy (Raposo et al. 1996; Gurung et al. 2021). Pokud dojde k inhibici Rab27a GTPázy a proteinů ESCRT komplexu, uvolňují buňky méně exosomů (Wei Zhang et al. 2022). Oba typy MVBs (MVBs určené k lysozomální degradaci, či MVBs cílící k sekreci exosomů) spolu pravděpodobně v buňkách koexistují (Buschow et al. 2009; Colombo et al. 2014). V dendritických buňkách bylo zjištěno, že po aktivaci T-buňkami sekretují exosomy obsahující molekuly MHC II. třídy. Třídění proteinů do exosomů je nezávislé na ubikvitinylaci MHC-II a následně tyto exosomy interagují s membránou T-buněk (Buschow et al. 2009).

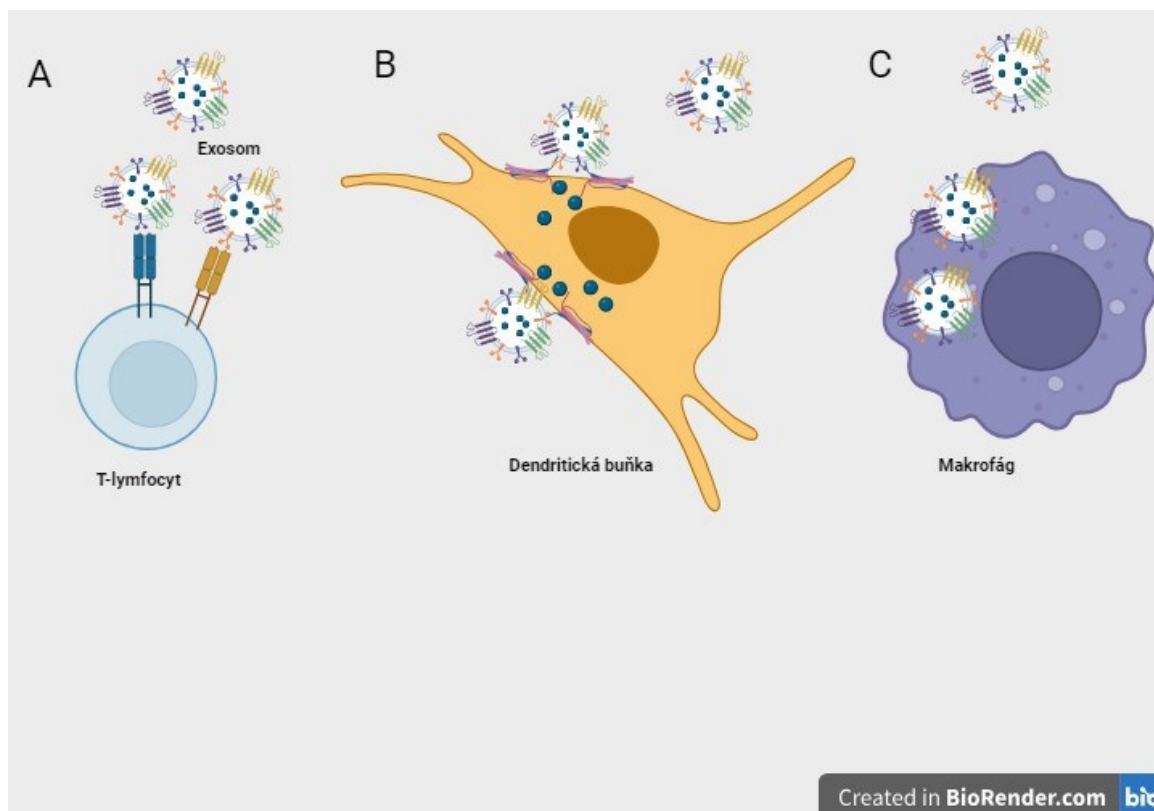
Sekrece exosomů může být ovlivněna mnoha faktory. Například exosomy z metastatických melanomových buněk jsou více uvolňovány v kyselém mikroprostředí, které je typické pro nádorové buňky (Parolini et al. 2009).



Obrázek 5–**Formování exosomů.** Tento děj začíná fúzí váčků za vzniku časného endosomu. Následně tento endosom maturuje do pozdního endosomu a během tohoto procesu dochází k invaginaci membrány a vzniku intraluminálních váčků. Sortování proteinů do ILVs se děje za pomoci ESCRT komplexů. Následně dochází k transportu MVBs k membráně a k exocytóze intraluminálních váčků, které v extracelulárním prostředí nazýváme exosomy. (Vytvořeno pomocí BioRender.com a převzato z: (Březinová 2022))

2.3.3 Interakce exosomů s buněčnou membránou

Existuje několik způsobů interakce exosomů s buněčnou membránou, a sice přímý kontakt s buněčnými receptory, fúze s plasmatickou membránou či internalizace do buňky (obrázek 6) (Gurung et al. 2021). Některé exosomy mohou využívat více typů interakcí s buňkami jednoho druhu (Zheng et al. 2019). Exosomy mohou být do buněk přijímány nespecificky (Horibe et al. 2018), či specificky v závislosti na cílové buňce (Hazan-Halevy et al. 2015). Způsoby interakce mezi exosomy a buňkami jsou dosud málo prozkoumány, a proto je jim věnována část mé diplomové práce.



Obrázek 6 – **Druhy interakcí mezi exosomy a buňkami.** (A) Exosomy interagují přes buněčné receptory, a tím spouštějí v buňkách odpovídající signální dráhy (tento typ interakce byl pozorován u T-lymfocytů (Admyre et al. 2006; Nolte-'t Hoen et al. 2009; Tkach et al. 2017; Chen et al. 2018; Wei Zhang et al. 2022)). (B) Exosomy mohou fúzovat s buněčnou membránou a svůj obsah vylít do buněčného cytosolu (pozorováno u dendritických buněk (Montecalvo et al. 2012)) nebo (C) mohou být exosomy internalizovány, např. do makrofágů (Montecalvo et al. 2012), a zde mohou tyto váčky splynout s endosomy a ovlivnit tak cílové buňky. (Vytvořeno pomocí BioRender.com)

2.3.3.1 Přímý kontakt exosomů s membránovými buněčnými receptory

Po přímém kontaktu exosomů s buněčnými receptory dojde ke spuštění signální dráhy v buňce a k ovlivnění procesů na ní závislých. Tato interakce byla doposud nejvíce pozorovaná mezi exosomy z nádorových či dendritických buněk a T-lymfocyty (Admyre et al. 2006; Nolte-'t Hoen et al. 2009; Tkach et al. 2017; Chen et al. 2018; Wei Zhang et al. 2022). Jedním z příkladů jsou exosomy z nezralých dendritických buněk, které přímo interagují přes MHC-II komplex a aktivují tak CD4⁺ T-lymfocyty (Tkach et al. 2017). V této interakci jsou zapojeny i exosomální molekuly CD40 a lektinový receptor typu C (DC-SIGN). Následně dojde v T-buňkách k sekreci prozánětlivého interferonu γ (IFN- γ) a interleukinu 17 (IL-17), tedy takzvané Th1 prozánětlivé odpovědi. Větší extracelulární váčky naopak indukují Th2 imunitní odpověď. Extracelulární váčky nezralých dendritických buněk tak v závislosti na své velikosti indukují odlišné imunitní odpovědi T-buněk. (Tkach et al. 2017). Tato aktivace a interakce antigenu a receptoru je pozorována i u exosomů ze zralých dendritických buněk v kontaktu s CD8⁺ T-lymfocyty (Admyre et al. 2006) či s CD4⁺ T-lymfocyty (Tkach et al. 2017). Přímý kontakt je též pozorován mezi exosomy nádorových buněk a CD8⁺ T-lymfocyty (Wei Zhang

et al. 2022). Při tomto kontaktu je využíván exosomový povrchový marker ICAM-1 (intercelulární adhezní molekula 1) a PD-L1, které interagují s LFA-1 (antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů) a PD-1 aktivovaných T-lymfocytů. V této interakci je důležitá zejména molekula ICAM-1, následně dochází k potlačení imunitní aktivity CD8⁺ T-buněk. Jedná se o komplexní proces, kdy aktivované CD8⁺ T-lymfocyty uvolňují do mikroprostředí IFN- γ , což vede k produkci exosomů s vyšší povrchovou expresí ICAM-1 a dojde též ke zvýšení množství exosomů nesoucích na svém povrchu zároveň ICAM-1 i PD-L1 (Wei Zhang et al. 2022). Exosomy z patientských metastatických melanomových buněk obsahují signifikantně více PD-L1 ve srovnání s exosomy z buněk zdravých jedinců (Chen et al. 2018). Této interakci je možné v nádorech zabránit inhibicí ICAM-1, a zvýšit tak funkčnost CD8⁺ T-lymfocytů (Wei Zhang et al. 2022). Interakce ligandu PD-L1 na exosomech z nádorových buněk s jeho receptorem na T-lymfocytech, zvýšení PD-L1 po indukci IFN γ a inhibice CD8⁺ T-lymfocytů byly pozorovány i v další studii (Chen et al. 2018). Cirkulující exosomy s PD-L1 by mohly být využity u pacientů pro monitorování odpovědi na léčbu inhibitory PD-1 (Chen et al. 2018).

2.3.3.2 Fúze exosomů s buněčnou membránou

Po fúzi či hemifúzi exosomů s plazmatickou membránou dojde k uvolnění obsahu váčků do buněčného cytosolu (Montecalvo et al. 2012; Gurung et al. 2021). Na této interakci se podílejí cholesterolové oblasti plazmatických membrán cílových buněk (dendritických (Montecalvo et al. 2012) či melanomových (Parolini et al. 2009)). Právě vyšší schopnost fúze exosomů s buněčnou membránou v kyselém nádorovém mikroprostředí může souviset se složením lipidické membrány exosomů, a sice se zastoupením sfingomyelinu, monosialodihexosylgangliosidu, a s tím související vyšší tuhostí membrány (Parolini et al. 2009).

Tento děj byl pozorován mezi exosomy z dendritických buněk a jejich mateřskými buňkami (Montecalvo et al. 2012), mezi exosomy z metastatických melanomových buněk a jejich mateřskými buňkami (Parolini et al. 2009), a částečně také mezi exosomy z mnohočetného myelomu a stromálními buňkami kostní dřeně (Zheng et al. 2019). Kyselé mikroprostředí je důležitým faktorem zvyšujícím fúzi nádorových buněk s exosomy (Parolini et al. 2009). Za těchto podmínek mohou exosomy, pocházející z agresivnějšího typu metastatického melanomového nádoru, fúzovat s méně agresivními buňkami melanomu (Parolini et al. 2009).

2.3.3.3 Internalizace exosomů do buněk

V nádorových liniích karcinomu plic a tlustého střeva bylo ukázáno, že způsob internalizace exosomů do buněk závisí na typu cílové buňky, nikoliv na původu exosomů (Horibe et al. 2018). Tohoto typu interakce se pravděpodobně účastní exosomové markery jako CD9, CD81, fosfatidylserin, CD11a, CD54, jelikož po jejich blokaci dojde ke snížení internalizace exosomů dendritickými buňkami (Morelli et al. 2004). Internalizace exosomů může probíhat klatrinem zprostředkovanou endocytózou a makropinocytózou (Tian et al. 2014a; Horibe et al. 2018). Dále je pozorována internalizace kaveolinem zprostředkovanou endocytózou u exosomů z buněk mnohočetného myelomu při inkubaci se stromálními buňkami kostní dřeně (Zheng et al. 2019). Částečně je využívána i makropinocytóza či fúze (Zheng et al. 2019). Podle Horibe et al. množství kaveolinu 1 v cílových buňkách nesouvisí s kaveolinem zprostředkovanou endocytózou (Horibe et al. 2018). V jiné studii bylo zjištěno, že endocytóza exosomů z lymfomu plášťových buněk je závislá na cholesterolu (Hazan-Halevy et al. 2015). Další možností internalizace je fagocytóza exosomů. Tento jev byl pozorován například u exosomů v kontaktu s dendritickými buňkami, B-lymfocyty nebo makrofágy (Montecalvo et al. 2012).

2.3.4 Exosomy jako terapeutické váčky

2.3.4.1 Biodistribuce exosomů

Jedním z důležitých přístupů k výzkumu možného využití exosomů pro terapeutické účely je studium jejich biodistribuce a farmakokinetiky *in vivo*. K této analýze se může využívat fluorescenční membránové značení, modifikované exosomy s membránovým proteinem reagujícím na bioluminiscenci, či membránové radioaktivní značení (Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Výzkumem biodistribuce exosomů byla zjištěna důležitá fakta: brzy po intravenózním zavedení značených exosomů z různých typů buněk (myších i lidských typů) se exosomy nejvíce koncentrují v játrech (Lai et al. 2014; Charoenviriyakul et al. 2017; Lázaro-Ibáñez et al. 2021), ve slezině (Lai et al. 2014; Lázaro-Ibáñez et al. 2021), případně v plicích a ledvinách (Lai et al. 2014; Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Může být pozorována mírně odlišná distribuce exosomů v orgánech v závislosti na typu mateřských buněk (Wiklander et al. 2015). Největší rozdíl v distribuci byl pozorován u exosomů z dendritických buněk, které ve větší míře osidlovaly slezinu (Wiklander et al. 2015). To podle Wiklander et al. může být způsobeno tím, že exosomy vyhledávají mikroprostředí podobné jejich mateřským buňkám (Wiklander et al. 2015). V jiné studii zjistili, že exosomy z dendritických buněk se *in vivo* ve slezině internalizují do dendritických buněk, či v menší míře do makrofágů (Morelli et al. 2004). Exosomy

z lidských metastatických melanomových buněk byly internalizovány do kyselých váčků mateřských buněk (Parolini et al. 2009).

Také koncentrace exosomů *in vivo* se během času mění v různých orgánech, dochází k jejich redistribuci a následné eliminaci (Lai et al. 2014). To může souviset i s přítomností makrofágů v játrech (Charoenviriyakul et al. 2017), či ve slezině (Imai et al. 2015). Ve studii Lázaro-Ibáñez et al. potvrdili postupnou eliminaci exosomů ze sleziny a plic, avšak v játrech byla během 24 hod zaznamenána zvyšující se koncentrace exosomů (Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Distribuce exosomů v organismu se může lišit v závislosti na typu použitého značení exosomů (Lázaro-Ibáñez et al. 2021).

Exosomy mohou osidlovat i nádorové tkáně. Byla potvrzena redistribuce exosomů z myši melanomové buněčné linie do orgánů, a sice do plic, kostní dřeně, jater a sleziny (Peinado et al. 2012). U těchto myši se po 28 dnech rozšířily metastázy do různých tkání, zároveň tyto exosomy také ovlivnily dendritické buňky kostní dřeně, čímž došlo k většímu růstu nádoru a rozvoji metastáz oproti kontrole. Za přenos exosomů do těchto tkání je zodpovědný jeden z důležitých onkoproteinů, tyrosin-kinázový MET receptor (z angl. Mesenchymal Epithelial Transition) (Peinado et al. 2012). V nádorech se zvýšenou angiogenezí byla *in vivo* potvrzena redistribuce intravenózně podaných exosomů z buněk linie HEK-293T (Lai et al. 2014). V jiné studii byl potvrzen mírný nárůst koncentrace exosomů z buněk linie Expi293F v myším kolorektálním nádoru po 24 hod (Lázaro-Ibáñez et al. 2021), podobné nálezy popisuje i další studie exosomů z HEK-293T v myším melanomu (Wiklander et al. 2015). Toto přirozené směřování exosomů do nádoru by mohlo být do budoucna využito při terapiích s modifikovanými exosomy (Lai et al. 2014).

Při pozorování exosomů *in vivo* je důležité zejména vybrat vhodnou a citlivou metodu pro značení exosomů (Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Biodistribuce exosomů totiž může záviset na genetické modifikaci mateřských buněk, zejména u vytvořených fúzních proteinů spojených s membránovými markery exosomů (Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Při redistribuci exosomů do tkání jsou důležitými faktory typ mateřské buňky a chemické složení exosomů (Gurung et al. 2021).

2.3.4.2 Terapeutické využití exosomů

Byl zkoumán transport doxorubicinu (též využitelný při léčbě akutní lymfocytární leukemie, nádoru prsu a dalších nádorových onemocnění) pomocí modifikovaných exosomů do nádorových buněk (karcinomu prsu, hepatocelulárního karcinomu a melanomu) (Tian et al.

2014b). Tyto modifikované exosomy z nezralých dendritických buněk měly na svém povrchu Lamp2b protein interagující s povrchovými αV integriny rakovinných buněk. Tato interakce a přenos doxorubicinu do nádorových buněk byly potvrzeny *in vitro* i *in vivo* a bylo ukázáno, že doxorubicin dopravovaný pomocí exosomů je pro myší modely méně toxický než doxorubicin podávaný samostatně (Tian et al. 2014b). Biodistribuce nemodifikovaných exosomů byla převážně v játrech a slezině, a po 8 hodinách došlo k úplnému vymizení těchto exosomů (Tian et al. 2014b), což se shoduje s tvrzením výše zmíněných studií (Lai et al. 2014; Charoenviriyakul et al. 2017; Lázaro-Ibáñez et al. 2021). Lamp2b protein na povrchu modifikovaných exosomů byl využit i ve studii léčby buněk CML (Bellavia et al. 2017). V tomto případě byl membránový Lamp2b fúzovaný s interleukinem 3, který interaguje se svým receptorem na leukemických buňkách (Bellavia et al. 2017). Receptor interleukinu 3 se více vyskytuje u leukemických kmenových buněk ve srovnání s hematopoetickými kmenovými buňkami (Nievergall et al. 2014). Modifikované exosomy tak do leukemických buněk přenášely imatinib (léčivo využívající se při terapii CML) či siRNA cílící na *BCR-ABL* (fúzní gen charakteristický pro CML, z angl. „breakpoint cluster region“-, „Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“) (Bellavia et al. 2017).

Možným cílem u exosomů z AML buněk by mohl být i transformující růstový faktor beta 1 (TGF- β 1), který pravděpodobně přenosem exosomů do NK buněk inhibuje jejich imunitní reakci (Hong et al. 2017). Exosomy získané z modifikovaných lymfocytárních leukemických buněk, ve kterých je umlčena produkce TGF- β 1, jsou využity k inkubaci s dendritickými buňkami a stimulují tím jejich zrání a funkci (Huang et al. 2017). Následně jsou takto získané dendritické buňky využity k imunizaci myší, kde podporují proliferaci a odpověď CD4⁺ T lymfocytů prostřednictvím zvýšených hladin interleukinu 2 a interferonu γ . Je stimulována také funkce CD8⁺ T-lymfocytů a antileukemická aktivita (Huang et al. 2017). Pozitivní účinek na imunitní systém měly dále vakcíny dendritických buněk stimulovaných koinkubací s exosomy z buněk myší myeloidní leukemie (Gu et al. 2015).

2.3.5 Role exosomů a extracelulárních váčků u AML

Vliv exosomů u AML je dosud méně prozkoumaný, a proto se tímto tématem zabývám ve své diplomové práci. Stejně jako exosomy z jiných buněk obsahují charakteristické CD znaky, tedy CD9, CD63, CD81 a Rab proteiny (Wojtuszkiewicz et al. 2016). AML exosomy mohou přenášet mRNA z leukemických buněk do stromálních buněk kostní dřeně, konkrétně např. transkripty receptoru inzulinového růstového faktoru I (*IGF-IR*), *FLT3* (Huan et al. 2013) a *NPM1* (Huan et al. 2013; Wojtuszkiewicz et al. 2016). Mohou přenášet

antiapoptické proteiny Bcl-2, Bcl-xL a Mcl-1 (Khalife et al. 2020). Exosomy získané z plazmy AML pacientů obsahují zvýšené množství proteinů inhibujících imunitu, např. TGF- β 1, PD1/PD-L1 nebo Fas/FasL (ligand povrchového buněčného receptoru), a dokáží snížením exprese NKG2D (z angl. Natural killer Group 2 member D) potlačit funkci NK buněk *in vitro* (Hong et al. 2017). V exosomech z linie MOLM-14 bylo detekováno zvýšené množství zejména let-7a, miR-99b, miR-155, miR-191 (Huan et al. 2013; Hornick et al. 2015), miR-150, miR-223 (Huan et al. 2013), miR-146a, miR-1246 v porovnání s mateřskými buňkami (Hornick et al. 2015). Některé z těchto miRNA mohou být využitelné jako biomarkery pro včasnou detekci AML, pokud jsou v exosomech zvýšené již v časně fázi onemocnění ve srovnání se zdravou kontrolou. V pilotním pokusu na myším modelu bylo zjištěno, že jako biomarkery by mohly být v AML exosomech využity miR-155, miR-150 a miR-1246 (Hornick et al. 2015). Navíc zvýšená miR-155 je detekována v hematopoetických kmenových a progenitorových buňkách (HSPC) po inkubaci s exosomy z AML linie. V těchto buňkách pak dochází k umlčení transkripčního faktoru *C-MYB* a snížení funkce a klonogenicity HSPC buněk (Hornick et al. 2016). Snížení přirozené funkce buněk je pozorováno i *in vivo* v myším modelu, kde exosomy mohou internalizovat do HSPC. miR-155 může cílit na Chk2 (z angl. checkpoint kinase 2) regulující buněčný cyklus a tím dojde ke snížení fosforylace na serinu 20 proteinu p53 (Hornick et al. 2016). U extracelulárních váčků získaných z AML buněčné linie obsahující zvýšený MRP1 (z angl. multidrug resistance protein), který je zodpovědný za rezistenci na léčivo daunorubicin, byl zjištěn přenos této rezistence prostřednictvím extracelulárních váčků do senzitivní AML buněčné linie (Bouvy et al. 2017). V těchto extracelulárních váčkách je zvýšené množství miR-19b a miR-20a ve srovnání s váčky ze senzitivní AML linie (Bouvy et al. 2017).

Uvedené příklady ilustrují důležitost exosomů ve všech fázích onemocnění, tedy ve fázi vzniku, diagnózy i léčby. V neposlední řadě dokazují, že exosomy hrají roli i v normálních procesech probíhajících u zdravých jedinců a jsou nedílnou součástí běžné komunikace mezi buňkami.

3 CÍLE

Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny tři dílčí cíle:

1. Charakterizovat účinek inhibitorů RG7112 a RITA, ovlivňujících interakci mezi Mdm2 a p53, na buňky AML.
2. Popsat způsob interakce exosomů různého původu s AML buňkami.
3. Vyšetřit vliv přítomnosti exosomů na citlivost AML buněk k inhibitorům Mdm2-p53 interakce.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie a roztoky

Název chemikálie/kitu	Výrobce
Agaróza	Sigma
Akrylamid	Sigma
Antibiotika (Penicilin, Streptomycin)	Sigma
Bisakrylamid	Serva
Bromfenolová modř (BPB)	Sigma
CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)	eBioscience
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
DMEM F12	Biosera
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Serva
ECL substrát (Prime Western Blotting Detection Reagent kit) Amesham	Cytiva
EDTA (Ethylendiamintetraoctová kyselina)	Fluka
Ethanol	Penta
Fetální bovinní sérum (FBS)	Biowest
Gel Red Nucleic Acid Stain	Biotium
Glutamin	Capricorn Scientific
Glycerol	Dr. Kulich Pharma s.r.o.
Glycin	Roth
H_3PO_4	Penta
HCl	Penta

Histopaque-1077	Sigma
Hoechst33342	Invitrogen
KCl	Lachema
KH ₂ PO ₄	Penta
MEM (Alpha-MEM)	Capricorn Scientific
2-mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Sigma
MitoTracker Red	Invitrogen
NaCl	Penta
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Lach-Ner, s.r.o.
NP-40	Amersham Life Science
Paraformaldehyd	Serva
Persíran amonný	Sigma
Propidium jodid (PI)	Sigma
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNáza A	Sigma
RPMI	Biosera
SDS (dodecylsíran sodný)	Sigma
SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit	Bioline
SensiFAST cDNA Synthesis Kit	Bioline
Sušené odtučněné mléko	Samantha
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Trans-blot Turbo 5x Transfer Buffer	Bio-Rad

TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Lach-ner, s.r.o.
Triton X-100	Serva
Trypanová modř	Sigma
Trypsin-EDTA (0,25%)	Capricorn Scientific
Tween-20	Roth

PBS (Phosphate Buffered Saline), upravit pH na 7,4 pomocí H_3PO_4	
NaCl	40 g
KCl	1 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	14,5 g
KH_2PO_4	1 g
dH ₂ O	5 l

PBS+ Tween 0,2%	
PBS	1 l
Tween-20	2 ml

Blotovací pufr	
Ethanol	200 ml
Trans-blot Turbo 5x Transfer Buffer	200 ml
ddH ₂ O	600 ml

2x vzorkový pufr	
Roztok TRIS (0,48 g TRIS rozpuštěn v 32 ml ddH ₂ O a pH nastaveno na 6,8 pomocí HCl)	16 ml
SDS	0,8 g
Glycerol	4 ml
Bromfenolová modř (1%)	200 µl
DTT	15,4 mg/0,5ml, přidává se těsně před použitím

ELFO pufr s SDS	
TRIS	9,09 g
glycin	43,2 g
SDS	3 g
ddH ₂ O	Doplnit do 3 l

Pufr pro dělicí gel, pH upravit na 8,8 pomocí HCl	
TRIS	18,1 g
SDS	0,4 g
ddH ₂ O	Doplnit do 100 ml

Pufr pro zaostřovací gel, pH upravit na 6,8 pomocí HCl	
TRIS	6,04 g
SDS	0,4 g
ddH ₂ O	Doplnit do 100 ml

Persíran amonný	
Persíran amonný	0,4 g
ddH ₂ O	1 ml

Akrylamid (30%)	
Akrylamid	58,4 g
Bisakrylamid	1,6 g
Glycerol	50 ml
ddH ₂ O	Doplnit do 200 ml, přefiltrovat

Promývací pufr, pH upravit pomocí konc. HCl na 7,5	
TRIS	0,18 g
EDTA	0,02 g
NaCl	1,31 g
ddH ₂ O	150 ml

Lytický pufr	
Promývací pufr	50 ml
NP-40	250 µl

PI staining solution	
Triton X-100 0,1% (v/v)	
RNáza A	100 µg/ml

Propidium jodid	50 µg/ml
PBS	Roztok v PBS

4% paraformaldehyd (PFA)	
Paraformaldehyd	4 g
PBS	80 ml
Zakrýt alobalem a míchat na vyhřívané míchačce (80 °C), po cca 2 hod doplnit objem PBS na 100 ml, přefiltrovat a skladovat v -20 °C	

Dělicí gel	
Chemikálie	objem
Akrylamid (30%)	7,5 ml
ddH ₂ O	6 ml
Pufr pro dělicí gel (pH 8,8)	4,5 ml
TEMED	12 µl
Persíran amonný	24 µl

Převrstvovací pufr	
Chemikálie	objem
ddH ₂ O	1,5 ml
TRIS/SDS (pH 8,8)	0,5 ml

Zaostřovací gel	
Chemikálie	objem
Akrylamid (30%)	1 ml
ddH ₂ O	6,5 ml
Pufř pro zaostřovací gel (pH 6,8)	2,5 ml
TEMED	10 µl
Persíran amonný	20 µl

Hoechst (5 mM roztok)	
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	0,0014 g
ddH ₂ O	0,5 ml

RPMI médium (10% FBS)	Objem	Výsledná koncentrace
RPMI	440 ml	88%
Fetální bovinní sérum (FBS)	50 ml	10%
Antibiotika (penicilin, streptomycin)	5 ml	1%
Glutamin	5 ml	1%

Alpha-MEM médium (20 % FBS)	Objem	Výsledná koncentrace
Alpha-MEM	390 ml	
Fetální bovinní sérum (FBS)	100 ml	20%
Antibiotika (penicilin, streptomycin)	5 ml	1%
Glutamin	5 ml	1%

DMEM médium (10 % FBS)	Objem	Výsledná koncentrace
DMEM F12	445 ml	
Fetální bovinní sérum (FBS)	50 ml	10%
Antibiotika (penicilin, streptomycin)	5 ml	1%

Bezexosomové médium (10% FBS)	Objem	Výsledná koncentrace
Stočené RPMI s FBS (20%)	196 ml	49%
RPMI	196 ml	49%
Antibiotika (penicilin, streptomycin)	4 ml	1%
Glutamin	4 ml	1%

4.1.2 Buněčné linie a primární AML buňky

AML buněčné linie s nemutovaným p53 (MOLM-13, MV4-11, OCI-AML2, OCI-AML3) – získané z Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

AML buněčná linie s p53 nulovým fenotypem (KG-1) – koupeno z Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

CML buněčná linie (K562) – koupeno z Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

Buněčná linie fibroblastů (HS-5) – získaná od Dr. Hložkové z FN Motol

Buněčná linie HEK-293T- získaná od Dr. Němečkové z ÚHKT

Primární AML buňky (označeny LD76, LD77, LD78, LD79 a LD80) – patientské vzorky z leukodeplece poskytnuté na základě souhlasu Etické komise ÚHKT pro projekt GAČR číslo 22-03875S.

4.1.3 Protilátky

a) protilátky pro western blot:

Cílový protein	Typ	Ředění	Katalogové číslo	Výrobce	Molekulová hmotnost (kDa)
β-Aktin	myší monoklonální	1:500	sc-47778	Santa Cruz	42
Bax	myší monoklonální	1:250	sc-7480	Santa Cruz	20
Bcl-2	myší monoklonální	1:500	sc-509	Santa Cruz	25/18
Bcl-xL	myší monoklonální	1:250	sc-8392	Santa Cruz	32
kaspáza 3	myší monoklonální	1:250	sc-7272	Santa Cruz	30/14
CD9	králičí polyklonální	1:1000	EXOAB- CD9A-1	System Biosciences	20
CD63	myší monoklonální	1:250	sc-5275	Santa Cruz	63
CD81	myší monoklonální	1:250	sc-166029	Santa Cruz	20
c-Myc	králičí monoklonální	1:1000	ab32072	Abcam	68
FBL	myší monoklonální	1:250	sc-166021	Santa Cruz	33
Hsc70	králičí polyklonální	1:1000	10654-1- AP	Proteintech	70

Mcl-1	králičí polyklonální	1:250	sc-20679	Santa Cruz	41
Mdm2	králičí monoklonální	1:1000	ab259265	Abcam	100/85
NCL	králičí monoklonální	1:1000	ab203417	Abcam	110
NOXA	králičí polyklonální	1:1000	A10802	Antibodies.co m	14
NPM	myší monoklonální	1:500	sc-70392	Santa Cruz	37
NPMpS4	králičí monoklonální	1:500	ab278648	Abcam	37
NPMpT199	myší monoklonální	1:1000	ab81551	Santa Cruz	37
PARP	myší monoklonální	1:500	sc-8007	Santa Cruz	110/85
p21	myší monoklonální	1:250	sc-6246	Santa Cruz	20
p53	myší monoklonální	1:500	sc-126	Santa Cruz	53
p53pS15	králičí monoklonální	1:500	ab223868	Abcam	53
p53pS46	králičí monoklonální	1:500	ab76242	Abcam	53
p53pS392	králičí monoklonální	1:1000	ab33889	Abcam	53
Puma	myší monoklonální	1:250	sc-374223	Santa Cruz	22

HRP konjugovaná sekundární protilátka	kozí anti-myší	1:20 000-50 000	31430	Thermofisher Scientific	
HRP konjugovaná sekundární protilátka	kozí anti-králičí	1:20 000-50 000	31460	Thermofisher Scientific	

b) protilátky pro imunofluorescenci:

Protilátka	Typ	Ředění	Katalogové číslo	Výrobce
Cox IV	králičí monoklonální	1:100	4850P	Cell Signaling Technology
Cytochrom c	myší monoklonální	1:100	12963S	Cell Signaling Technology
Talin	králičí polyklonální	1:100	ab71333	Abcam
14-3-3	myší monoklonální	1:100	sc-166061	Santa Cruz
Alexa Fluor 555	kozí anti-myší	1:200	A21424	Invitrogen
Alexa Fluor 647	kozí anti-myší	1:200	A21236	Invitrogen
Alexa Fluor 647	kozí anti-králičí	1:200	A21245	Invitrogen
Alexa Fluor 555	kozí anti-králičí	1:200	A21429	Invitrogen

4.1.4 Primery

(syntetizované na objednávku firmou KRD)

Gen	Forward sekvence	Reverse sekvence
<i>BAX</i>	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	GGAGGAAGTCCAATGTCCAG
<i>BBC3</i>	CTCTCCTCTCGGTGCTCCTT	AGGCTAGTGGTCACGTTTGG
<i>BCL2</i>	GGTGGAGGAGCTCTTCAGG	ACAGTTCCACAAAGGCATCC
<i>BCL2L1</i>	GGAGCTGGTGGTTGACTTTC	GGATCCAAGGCTCTAGGTG
<i>CDKN1A</i>	TCAAATCGTCCAGCGACCTT	TCTGACTCCTTGTTCCGCTG
<i>C-MYC</i>	GCCAAGAGGGTCAAGTTGGA	CAAGACGTTGTGTGTTTCGCC
<i>GAPDH</i>	GAAACTGTGGCGTGATGGC	CCGTTTCAGCTCAGGGATGAC
<i>MCL1</i>	TAAGGACAAAACGGGACTGG	ACCAGCTCCTACTCCAGCAA
<i>MDM2</i>	AGCTTGGCTGCTTCTGGG	GTACGCACTAATCCGGGGAG
<i>PMAIP1</i>	AAGAAGGCGCGCAAGAAC	CGTGACCTCCTGAGAAAAC
<i>TP53</i>	TTCACCCTTCAGATCCGTGG	TTTGGACTTCAGGTGGCTGG

4.1.5 Inhibitory

Inhibitory (RG7112 a RITA) byly rozpuštěny ve sterilním dimethylsulfoxidu (DMSO) na zásobní koncentraci 10 mM a uskladněny v alikvotách v - 20 °C. Poté byly alikvoty na výsledné koncentrace ředěny v růstovém médiu.

Název	Výsledná koncentrace	Výrobce
RG7112	1 µM, 2 µM, 4 µM	Selleckchem
RITA	0,5 µM, 1 µM, 2 µM	Selleckchem

4.1.6 Laboratorní přístroje

Laboratorní přístroj	Výrobce
Analytické váhy AE200 Comesa	Mettler
Aparatura pro horizontální agarózovou DNA elektroforézu E0738	Sigma
Aparatura pro SDS-PAGE (SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézu)	Bio-Rad
Blotcyler W5	Precision Biosystems
Centrifuga MiniSpin, rotor F45-12-11	Eppendorf
Centrifuga Biofuge pico	Heraeus
Centrifuga 5702	Eppendorf
Centrifuga Rotofix 32A	Schoeller
Cell Counter, přístroj na počítání buněk	Bio-Rad
Konfokální mikroskop Olympus FV 1000	Olympus
Laminární box SafeFast Elite	Faster
Míchačka magnetická s ohřevem	RCT basic
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
PCR cykler CFX96 Optics Module	Bio-Rad
Průtokový cytometr LSRFortessa Analyzer	BD Biosciences
Přístroj pro detekci fluorescence a chemiluminiscence G:BOX iChemi XT-4	Syngene
Svářečka fólií	ETA
Světelný mikroskop	Biolar
Thermoblock TB2	Biometra
Trans-Blot® Turbo™ Transfer systém	BioRad

Míchačka kývací Blotboy 3D Rocker	Benchmark Scientific
Ultracentrifuga Sorvall, rotor 42.2TI (Beckmann-Coulter)	Sorvall
Ultracentrifuga Sorvall, rotor T647,5 (Sorvall)	Sorvall
Vortex V-1 plus	Biosan

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněčných linií

AML a CML linie byly kultivovány v kultivačních lahvích v inkubátoru s 5 % CO₂, o teplotě 37 °C a vlhkosti 80%, a pasáž probíhala 3x týdně sterilně v laminárním boxu. AML linie (MV4-11, MOLM-13, KG-1) a CML linie (K562) byly kultivovány v RPMI médiu (složení viz kapitola 4.1.1), OCI-AML2 a OCI-AML3 v alpha-MEM médiu (složení viz kapitola 4.1.1).

Adherentní linie HEK-293T byla kultivována v médiu DMEM a pasážována 3x týdně pomocí trypsinu.

Adherentní linie HS-5 byla kultivována v RPMI a též pasážována za použití trypsinu, jednou za 4-5 dní.

4.2.2 Měření proliferace a viability buněčných linií

AML buňky byly nasazeny v koncentraci 0,3 – 0,5 × 10⁶ buněk / ml, v čase 0 hod ošetřeny příslušnými inhibitory a inkubovány v CO₂ inkubátoru po dobu 96 hod v 1 ml kultivačních jamkách. V intervalu 24 hod byly buňky před měřením promíchány, odebrány v definovaném množství, smíchány 1:1 s trypanovou modří, a pomocí přístroje pro automatické počítání buněk byla určena jejich koncentrace a viabilita. Při analýze byly hodnoty jednotlivých měření vztaženy ke kontrole a zobrazené chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, zpracováno v programu GraphPad Prism (verze 10.2.3, GraphPad Software, USA).

4.2.3 Měření proliferace a viability buněčných linií kokultivovaných s exosomy

Exosomové pelety byly resuspendovány v 0,5 ml média RPMI, přefiltrovány přes navlhčený filtr Filtropur S (Sarstedt) o velikosti pórů 0,2 μm a následně byly obě ultracentrifugační zkumavky vypláchnuty 1 ml RPMI média a tento objem přefiltrován přes filtr. Tímto postupem vznikla exosomová frakce o výsledném objemu 3 ml média, byla rozdělena a přidána k buňkám (o koncentraci 0,5 × 10⁶ buněk/ml) a vzorky byly kultivovány

v jamkách o výsledném objemu 5 ml. Paralelně byly nasazeny vzorky buněk bez vyizolovaných exosomů. Následně byly přidány inhibitory, a buňky byly kultivovány po dobu 48-72 hod a v intervalech 24 hod byla měřena jejich proliferace a viabilita (stejný postup jako v kapitole 4.2.2.). Počty byly vztaženy k okamžiku přidání inhibitorů, kultivace buněk s exosomy před přidáním inhibitorů probíhala minimálně 30 min, maximálně 16 hod. Výsledné křivky viability a proliferace byly statisticky zhodnocené se směrodatnou odchylkou v programu Microsoft Excel.

4.2.4 Izolace primárních buněk

Pacientské vzorky z leukaferézy byly získány po písemném souhlasu pacientů na Aferetickém oddělení ÚHKT. Depletát byl 10x naředěn sterilním PBS, promíchán a opatrně navrstven na Histopaque 1077 (v poměru 1:1) v 50-ml centrifugační zkumavce. Dále byl tento vzorek stočen v centrifuze Schoeller (500 g, 30 min) pro oddělení jednotlivých typů krevních buněk od sebe (po stočení v centrifugační zkumavce shora: plazma, blasty, monocyty a lymfocyty, vrstva Histopaque, granulocyty, erytrocyty). Ze zkumavky byla skleněnou pipetou odebrána plazma do odpadní nádoby a lymfocyty do 15-ml centrifugačních zkumavek, doplněny PBS a stočeny na centrifuze 350 g, 10 min. Po stočení byl odpipetován supernatant, resuspendován v PBS a stočen na centrifuze na 300g po dobu 7 min, poté byl opět odebrán supernatant, resuspendován v PBS a stočen na 200 g, 7 min. Buňky byly spočítány a pelet buněk byl resuspendován v RPMI médiu. Poté byly buňky nasazeny na koncentrace $2-5 \times 10^6$ /ml podle výtěžku a účelu dalšího zpracování (qPCR, western blot, nasazení buněk na izolaci exosomů).

4.2.5 Příprava bezexosomového média

Bezexosomové médium se využívá pro nasazení buněk pro kultivaci a následnou izolaci exosomů. Fetální bovinní sérum (FBS), které je součástí média, obsahuje exosomy, jejichž přítomnost by interferovala s izolovanými exosomy z dané buněčné linie (Théry et al. 2006). Bylo tedy smícháno 300 ml média (RPMI) a 100 ml FBS či 200 ml MEM a 200 ml FBS a stočeno na ultracentrifuze po dobu 16 hod, 100 000 g/4 °C. Následně byl odlit supernatant (exosomy jsou koncentrovány v peletu) a tento supernatant je potřeba přefiltrovat přes filtr MF-Milipore (o velikosti 0,22 μ m, MCE Membrane) pro odstranění případné kontaminace (ultracentrifugace probíhá nesterilně). Takto získaný sterilní bezexosomový základ je pak použit k výrobě finálního média, viz kapitola 4.1.1.

4.2.6 Nasazení buněk pro produkci a izolaci exosomů

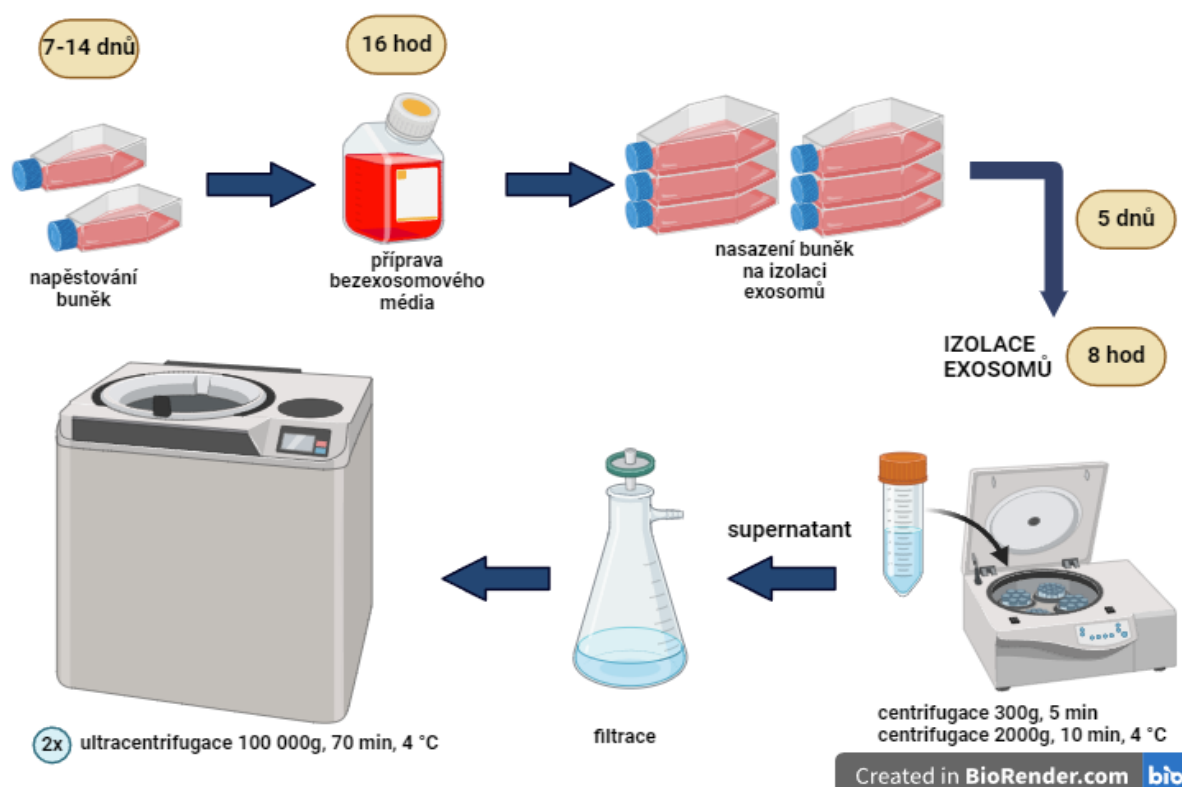
Na jednu dávku izolovaných exosomů bylo nasazeno 40 milionů buněk, délka pěstování pro získání tohoto počtu se lišila pro jednotlivé buněčné linie (obvykle trvala 7-14 dnů).

Buněčný pelet byl získán při točení 300g, 5 min a následně resuspendován v 8 ml bezexosomového média. To bylo rozděleno po 4 ml do dvou velkých kultivačních lahví a v případě CML linie K562 doplněno do 100 ml bezexosomovým médiem. Kultivace probíhala v inkubátoru s 5 % CO₂ a teplotě 37 °C po dobu 5 dnů, následně byly exosomy z buněk izolovány. Pro kultivaci AML linií byl počáteční objem buněčné kultury v jedné kultivační lahvi pouze 50 ml a po 48 hod bylo přidáno dalších 50 ml. Kultivace primárních AML buněk probíhala kratší dobu, obvykle 48 hodin, protože během delší inkubace v médiu zanikaly ve větší míře.

4.2.7 Izolace exosomů

Celý proces přípravy na izolaci exosomů a izolace exosomů je pro lepší představu o časové náročnosti této metody znázorněn na obrázku 7. Před každou izolací byla spočítána koncentrace buněk pro informaci o celkovém počtu a viabilitě buněk, buňky byly také vyšetřeny pod světelným mikroskopem na přítomnost kontaminací. Jedna izolace obsahuje dvě dávky izolovaných exosomů, tedy 80 milionů buněk v celkovém objemu 400 ml při nasazení. Následně byl objem z kultivačních lahví slit do centrifugačních zkumavek (o objemu 50 ml) a stočen na 300g/5 min při pokojové teplotě. V peletu jsou stočeny buňky, jejichž část byla sklizena do vzorkového pufru pro následnou analýzu pomocí western blotu, zatímco supernatant byl přemístěn do dalších 50-ml zkumavek pro stočení 2000g/10 min/4 °C. Nyní lze pracovat i nesterilně mimo laminární box. Po stočení byl všechen supernatant z jedné buněčné linie slit do jedné kádinky a je filtrován pomocí 20-ml injekční stříkačky přes filtr Filtropur S o velikosti pórů 0,2 µm do skleněné láhve. Z této láhve byl supernatant rozdělen do ultracentrifugačních zkumavek, které musí být i s víčkem vyváženy na přesnost setin, případně lze dovyvážit přidáním PBS. Takto vyvážené ultracentrifugační zkumavky se supernatantem obsahujícím exosomy byly stočeny na ultracentrifuze při 100 000g, 70 min a 4 °C. Po dotočení se odebral supernatant do výše peletu (v peletu jsou obsaženy exosomy) a pelet byl resuspendován zbylým supernatantem v ultracentrifugační zkumavce. Takto vzniklé suspenze byly ze 3 ultracentrifugačních zkumavek přepipetovány do jedné a ultracentrifugační zkumavky byly ještě vypláchnuty 1 ml PBS. Takto připravené 2 ultracentrifugační zkumavky byly opět vyváženy PBS a znovu stočeny 100 000g, 70 min, 4 °C. Po stočení byl viditelný pelet, ve kterém by měly být koncentrovány pouze exosomy. Supernatant je třeba odsát skleněnými pipetami a následně mikropipetami tak, aby v ultracentrifugační zkumavce nezbyla žádná tekutina. Následně byl pelet důkladně resuspendován v malém objemu: pro barvení exosomů

a mikroskopické pozorování ve 150 μ l PBS, pro analýzu hladin proteinů v exosomech ve 150 μ l lytického pufru a pro kokultivaci exosomů s buňkami v 500 μ l bezexosomového média.



Obrázek 7 – Znázornění časové náročnosti jednotlivých kroků přípravy na izolaci exosomů a následná izolace exosomů. Nejprve je třeba napěstovat buňky v dostatečném množství (40 milionů buněk/dávku), což trvá 7-14 dnů v závislosti na typu buněk. Následně připravit bezexosomové médium (16 hod, 100 000g, 4 °C). Napěstované buňky jsou s bezexosomovým médiem nasazeny na izolaci exosomů (inkubace 5 dnů), a následuje samotný proces izolace exosomů (přibližně 8 hod), buňky stočeny na centrifuze (300g, 5 min), poté supernatant odlit a stočen na centrifuze 2000g, 10 min, 4 °C, supernatant je přefiltrován přes filtr a proces ultracentrifugace (100 000g, 70 min, 4 °C) je opakován 2x.

4.2.8 Filtrace exosomů

Exosomy byly po vyizolování filtrovány ve dvou případech, a sice pokud byly koinkubovány s buňkami a měřena jejich proliferace či po obarvení přidány k buňkám pro pozorování na konfokálním mikroskopu. Filtr Filtropur S (Sarstedt) o velikosti pórů 0,2 μ m musí být navlhčen (1 ml PBS z injekční stříkačky), následně byl přefiltrován potřebný objem exosomové frakce do centrifugační zkumavky, filtr byl promyt dalším médiem (1,5-2 ml, viz kapitoly 4.2.3 a 4.2.14.1) a tato frakce byla přidána k buňkám.

4.2.9 Sklizeň buněk na qPCR, izolace RNA, reverzní transkripce a qPCR

AML linie či primární AML buňky byly nasazeny v koncentraci $0,5 \times 10^6$ nebo 2×10^6 buněk/ml (kontrola, ošetřeny 1 μM RG7112 či 2 μM RITA) a kultivovány po dobu 24 hod. Následně byla vyhodnocena proliferace a viabilita jednotlivých vzorků a poté bylo sterilně odebráno 5-7 ml buněk, stočeno 5 min/300g, supernatant byl slit a resuspendován v 10 ml sterilního PBS a znovu stočen 5 min/300g. Po stočení byl supernatant slit, filtračním papírem osušeno hrdlo falkony, případně pipetou odebrán zbytek tekutiny-vše probíhalo sterilně v laminárním boxu. Zkumavky s peletem byly uloženy do -80°C .

Pro analýzu genové exprese bylo třeba vyizolovat RNA ze zamraženého peletu buněk dle protokolu kitu (RNeasy Mini Kit, Qiagen) a vyizolovaná RNA byla opět uchována v -80°C pro následný přepis do cDNA. Při reverzní transkripci RNA do cDNA se postupovalo dle návodu kitu SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline) a v PCR cykleru byl nastaven program:

Teplota	Čas
25 °C	10 min
42 °C	15 min
48 °C	15 min
85 °C	5 min
4 °C	

Tabulka 1 – Program využitý při reverzní transkripci v PCR cykleru

Následně bylo provedeno měření hladiny vybraných transkriptů pomocí qPCR, jednotlivé vzorky pro jeden transkript byly analyzovány v technických triplikátech, bylo postupováno dle návodu kitu SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit (Bioline) a pro měření byl využit PCR cykler. Specifické primery pro jednotlivé transkripty byly navrženy prostřednictvím nástroje PrimerBLAST. Jako referenční gen byla využita glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (*GAPDH*) a jako negativní kontrola byl využit vzorek bez přidaného templátu. Produkce mRNA v jednotlivých cyklech byla detekována pomocí SYBR Green (součást kitu) a výsledky byly analyzovány v programu Bio-Rad CFX Manager Software, kde byly vypočítány hodnoty Ct (průměr 3 hodnot Ct pro jeden transkript) a Ct ref (průměr 3 hodnot pro referenční gen). Následně byla hladina transkriptů vypočítána v programu

Microsoft Excel podle rovnice $2^{-(\Delta Ct \text{ ošetřený vzorek} - \Delta Ct \text{ kontrola})}$, kde $\Delta Ct \text{ ošetřený vzorek}$ je rozdíl Ct hodnot sledovaného a referenčního genu pro vzorek ošetřený inhibitory a $\Delta Ct \text{ kontrola}$ je rozdíl Ct hodnot sledovaného a referenčního genu kontrolního vzorku. V programu Bio-Rad CFX Manager Software byla vytvořena amplifikační křivka i křivka tání. K posouzení specificity amplifikovaných produktů qPCR byla využita i agarózová elektroforéza. Pro následné statistické vyhodnocení u linií MV4-11 a MOLM-13 byl využit nepárový t-test a chybové úsečky na obrázcích 10 a 11 představují směrodatnou odchylku, zpracováno v programu GraphPad Prism (verze 10.2.3, GraphPad Software, USA). Analýza primárních AML vzorků byla provedena v programu Microsoft Excel. Pro qPCR byl využit program:

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	2 min	1x
95 °C	5 s	39 x
60 °C	10 s	
72 °C	10 s	
95 °C	10 s	1x
melting 65-95 °C	5 s	1x

Tabulka 2 – Program pro qPCR v PCR cycleru

4.2.10 Elektroforéza DNA (produktů qPCR reakce)

Produkty qPCR reakce, tedy amplifikované úseky cDNA, byly rozděleny podle velikosti na agarózové elektroforéze standardním postupem. Byl využit 1% agarózový gel, vzorky byly smíchány s 6x Loading Dye. Elektroforéza probíhala při napětí 98V přibližně 1 hod. Pro vizualizaci gelu bylo použito barvivo Gel Red Nucleic Acid Stain (10 000x rozpuštěna ve vodě, Biotium) a DNA byla detekována přístrojem Gene Box (Syngene).

4.2.11 Příprava lyzátů a western blot

Pro analýzu western blotem byly buněčné vzorky (kontrolní i ošetřené, případně buňky kokultivované s exosomy) po uplynutí inkubační doby stočeny na centrifuze 300g/5 min, supernatant slit do odpadní nádoby, resuspendován v 1 ml PBS, přepipetován

do mikrozkušavky a stočen na centrifuze Heraeus (5 min, 500g). Po stočení byl supernatant odpipetován Pasteurovou pipetou a k buněčnému peletu přidán 2x vzorkový pufr naředěný 1:1 ddH₂O, u buněčných linií byl přidáván v objemu 20 µl vzorkového pufru/10⁶ buněk, u primárních AML buněk 5 µl vzorkového pufru/10⁶ buněk. Vzorky byly zahřáty v termobloku při 95 °C/5 min a mohou být uchovány při -20 °C. Vzorky byly přepipetovány do centrifugačních zkumavek a stočeny na ultracentrifuze 200 000g/4 hod/4 °C, čímž jsou zbaveny vazkých součástí (zejména zbytků nukleových kyselin). Po stočení byl supernatant přepipetován mikroštrikačkou Hamilton do mikrozkušavky a uchováván při -20 °C pro další analýzu.

Exosomové vzorky pro analýzu hladin proteinů byly ihned po izolaci a resuspendování v lytickém pufru smíchány s 2x vzorkovým pufrem v poměru 1:1, tedy 150 µl lytického pufru s frakcí exosomů (viz kapitola 4.2.7) a 150 µl vzorkového pufru. Vzorky byly zahřáty v termobloku (95 °C, 5 min) a uchovány při -20 °C. Tímto krokem byly připraveny na SDS-PAGE elektroforézu a je s nimi zacházeno stejně jako s buněčnými vzorky.

SDS-PAGE elektroforéza probíhala dle standardního protokolu, složení separačního gelu, zaostřovacího gelu a převrstvovacího pufru je uvedeno v kapitole 4.1.1. Jako marker molekulové hmotnosti byl využit Precision PlusProtein Dual Color Standard (Bio-Rad) (v objemu 2 µl/jamku), vzorky byly nanášeny v objemu 5-10 µl. Elektroforéza probíhala při maximálním napětí 200 V a proudu 100 mA po dobu cca 1 hod.

Následně byly rozdělené proteiny z gelů za použití blotovacího přístroje přeneseny na PVDF membránu, složení blotovacího pufru viz kapitola 4.1.1. Bloty byly vyříznuty v místě předpokládané velikosti analyzovaných proteinů určené polohou známých bandů standardu. Membrána byla blokována roztokem PBS s 0,2% Tween-20 a přidáním 5% odtučněným mlékem (o koncentraci 1 g/20 ml PBS) na třepačce po dobu 1 hodiny. Primární protilátka (viz kapitola 4.1.3) byla přidána do tohoto roztoku (ve správném poměru, obvykle 1:1000) a inkubována s bloty přes noc při 4 °C. Následuje promytí membrány v roztoku (PBS-Tween-20) 6x v intervalech 5 min, inkubace s naředěnou sekundární protilátkou (v poměru 1:20 000-50 000) v roztoku (PBS-Tween-20) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě, a opět promytí roztokem (PBS-Tween-20) 6x po dobu 5 min. Následuje pětiminutová inkubace membrány v substrátu ECL a vzniká luminiscenční signál, který je detekován přístrojem G:BOX v programu GeneSys.

4.2.12 Imunoprecipitace

Buňky linie HEK-293T byly nasazeny do 5-ml Petriho misek, po 24 hod transfekovány plazmidem nesoucím Mdm2 protein značený mCherry a po dalších 24 hod ošetřeny 5 μ M RG7112 nebo 5 μ M RITA. Po 24 hod působení inhibitorů byly buňky promyty chlazeným PBS a škrabkou uvolněny ze dna misky, přeneseny do zkumavky a promyty PBS. Buněčný pelet byl inkubován v lytickém pufru po dobu 30 min na ledu a poté stočen na centrifuze na 20 000g po dobu 10 min a 4 °C. Supernatant, tedy buněčný lyzát, byl přidán k agarózovým nanočásticím s navázaným peptidem s vysokou afinitou k mCherry (RFP-Trap) nebo k p53 proteinu, který se v HEK-293T buňkách přirozeně vyskytuje ve vyšším množství (p53-Trap). Tato suspenze byla jemně překlápěna po dobu 60 min při 4 °C, aby se na nanočástice navázaly příslušné proteiny z lyzátu. Poté byly nanočástice několikrát promyty promývacím pufrům, resuspendovány ve 100 μ l 2x vzorkového pufru, svařeny 10 min při 95 °C a stočeny na centrifuze 2500g/2 min/4 °C. Supernatant s uvolněným precipitátem byl uchován v -20 °C dokud nebyly vzorky využity na SDS-PAGE.

4.2.13 Průtoková cytometrie

Ošetřené a kontrolní vzorky buněk (odpovídající množství 5×10^5 buněk) byly sklizeny během přípravy buněčných vzorků na SDS-PAGE, tedy stočeny na centrifuze (300g, 5 min), supernatant slit do odpadní nádoby, promyty 1 ml PBS a opět stočeny na centrifuze Heraeus po dobu 5 min, 500g. Poté byl Pasteurovou mikropipetou odpipetován supernatant do odpadní nádoby a pelet buněk byl resuspendován 0,5 ml PBS. Tato suspenze buněk byla pomalu na ledu nakapána do zkumavek s vychlazeným 70% ethanolem o objemu 4,5 ml a uložena minimálně do druhého dne v -20 °C.

Pro měření byly buňky stočeny ve vychlazené centrifuze 500g/10min, promyty 5 ml PBS, po stočení byl supernatant slit a byla odsáta zbylá tekutina. Následně byly buňky resuspendovány v 0,5 ml PI staining solution (složení viz kapitola 4.1.1), ponechány 2 hod ve tmě v lednici (4°C) a změřeny na FACS. Fluorescenční barvivo propidium jodid vstupuje do ethanolem permeabilizovaných buněk a váže se na DNA. Intenzita měřené fluorescence odpovídá obsahu DNA v buňce, čímž jsou od sebe zřetelně odděleny jednotlivé fáze buněčného cyklu: G0/G1 – n chromozomů, G2/M – 2n chromozomů, S fáze – oblast mezi G0/G1 a G2/M. Oblast histogramu s intenzitou nižší než jaká odpovídá G0/G1 fázi se označuje jako subG1 fáze a zahrnuje mrtvé buňky. Výsledky byly zpracované v programu BD FACSDiva™ Software, a následně byl využit program Microsoft Excel.

4.2.14 Barvení vzorků a konfokální mikroskopie

Všechny fluorescenční obrázky byly zpracovány použitím FluoView software, Olympus Corporation.

4.2.14.1 Fluorescenční barvení exosomů

Exosomy byly po izolaci resuspendovány ve 150 μ l PBS (viz kapitola 4.2.7) a následně (či druhý den po uchování v lednici) k nim bylo přidáno 350 μ l PBS a 2 μ l 5mM roztoku CFSE v DMSO. Suspenze byla inkubována ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Následně byl proces barvení zastaven přidáním 4 ml vychlazeného růstového média na 5 min, dále bylo přidáno 60 ml PBS a tato suspenze byla stočena na ultracentrifuze (100 000g, 70 min, 4 °C). Po stočení jsou obarvené exosomy koncentrované v peletu, proto byl opatrně odebrán supernatant a pelet resuspendován v 1 ml bezexosomového média (RPMI či alpha-MEM podle typu buněk, se kterými jsou dále exosomy inkubované). Následně byl tento objem přefiltrován (viz kapitola 4.2.8), filtr byl následně promyt 1,5 ml bezexosomového média do falkonky s exosomy a tato suspenze byla přidána k buňkám v malé Petriho misce s krycím sklíčkem ve dně, tedy uzpůsobené pro pozorování pomocí konfokálního mikroskopu. Ke sledování interakce obarvených exosomů s cílovými buňkami byl využit konfokální mikroskop s komůrkou, která umožňuje pozorování za stejných podmínek jako kultivace buněk v inkubátoru (5% CO_2 , 37 °C, 80% vlhkost).

4.2.14.2 Barvení buněk po kultivaci s exosomy

Po kultivaci buněk s exosomy byly některé vzorky dobarveny fluorescenčními sondami lokalizujícími do konkrétních buněčných struktur živých buněk: pro barvení jader bylo použito barvivo Hoechst33342, pro barvení mitochondrií sonda MitoTracker Red.

4.2.14.3 Fixace buněk po kultivaci s exosomy

Některé vzorky buněk kokultivovaných s fluorescenčně značenými exosomy byly fixovány pro zachování dlouhodobějšího preparátu a označení dalších buněčných struktur pomocí intracelulárního značení protilátkami. Vzorek byl stočen na centrifuze (300g, 6 min), supernatant slit do odpadní nádoby, pelet buněk resuspendován v 1 ml PBS a přepipetován do mikrozkušavky. Tato suspenze byla stočena 500g po dobu 5 min, supernatant odsát Pasteurovou pipetou, pelet buněk byl resuspendován v PBS (150 μ l PBS/sklíčko) a rozdělen na vyčištěná sklíčka. Následuje 20-30 min inkubace ve vlhké komůrce za účelem usazení buněk na sklíčko, filtračním papírem byla opatrně odsáta přebytečná tekutina. Na sklíčko byl přidán 4% paraformaldehyd pro fixaci buněk a sklíčko byla inkubována ve vlhké komůrce přes noc v lednici.

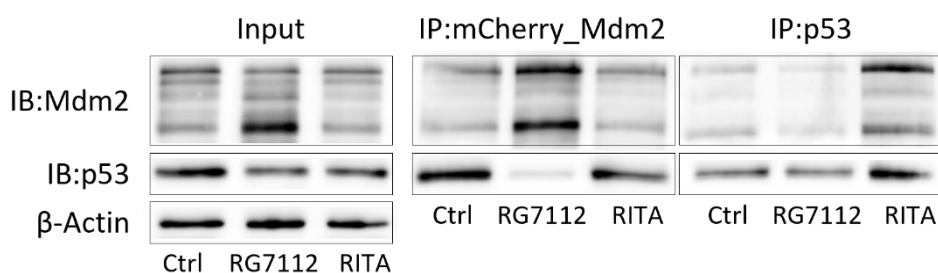
Následující den byla sklíčka promyta v Petriho misce roztokem PBS s 0,2% Tween-20, sklíčko se pak inkubovalo 10 min při pokojové teplotě v 0,5% roztoku Triton-X100, čímž byly buňky permeabilizovány. Sklíčka byla 3x po dobu 5 min promyta PBS a dále inkubována 60 min s roztokem příslušně naředěné primární protilátky (viz kapitola 4.1.3) v PBS-Tween-20. Následně byla sklíčka opět promyta (3x5 minut v PBS) a inkubována s roztokem fluorescenčně značené sekundární protilátky v PBS (1:200), po dobu 60 min ve tmě, poté byla sklíčka 2x promyta ve tmě a poslední promytí je v PBS bez Tween-20. Na podložní sklíčko byla nakápnuta kapka fixačního přípravku (Prolong) a krycí sklíčko se na něj opatrně položí, aby nevznikly bubliny. Je potřeba sklíčka nechat uschnout do druhého dne, aby Prolong dobře zpolymeroval, poté je možné buňky pozorovat konfokálním mikroskopem.

Při barvení buněčných organel byla využita primární protilátka proti proteinu 14-3-3 pro označení mikrotubul, protilátky proti cytochromu c a COX IV pro označení mitochondrií a Talin pro označení plazmatické membrány.

5 VÝSLEDKY

5.1 Charakteristika účinku inhibitorů p53-Mdm2 na buňky AML

Vzhledem k tomu, že obě zvolená léčiva, RG7112 a RITA, jsou popisována jako molekuly inhibující interakci mezi Mdm2 a p53, otestovali jsme jejich účinek na buňkách linie HEK-293T transfekovaných fluorescenčně značenou variantou Mdm2 (mCherry Mdm2, plazmid poskytnut a transfekce provedena Dr. Holoubkem, ÚHKT). Jak je možné vidět na obrázku 8, zatímco RG7112 skutečně podstatně zeslabuje interakci mezi Mdm2 a p53, v buňkách ošetřených RITA žádný inhibiční efekt pozorován není. Z výsledků uvedených dále je ale zřejmé, že RITA má i přesto významný vliv na p53-dependentní apoptózu u citlivých buněk. Oba tyto inhibitory byly tedy dále testovány na modelových buněčných liniích i primárních AML buňkách.



Obrázek 8 - Vliv léčiv deklarovaných jako inhibitory interakce mezi Mdm2 a p53 v buňkách linie HEK-293T transfekovaných mCherry_Mdm2. Input - celková hladina vyšetřovaných proteinů v buněčných lyzátech. IP:mCherry_Mdm2 – hladina exogenního Mdm2 a s ním koprecipitovaného proteinu p53. IP:p53 – hladina endogenního p53 a s ním koprecipitovaného Mdm2.

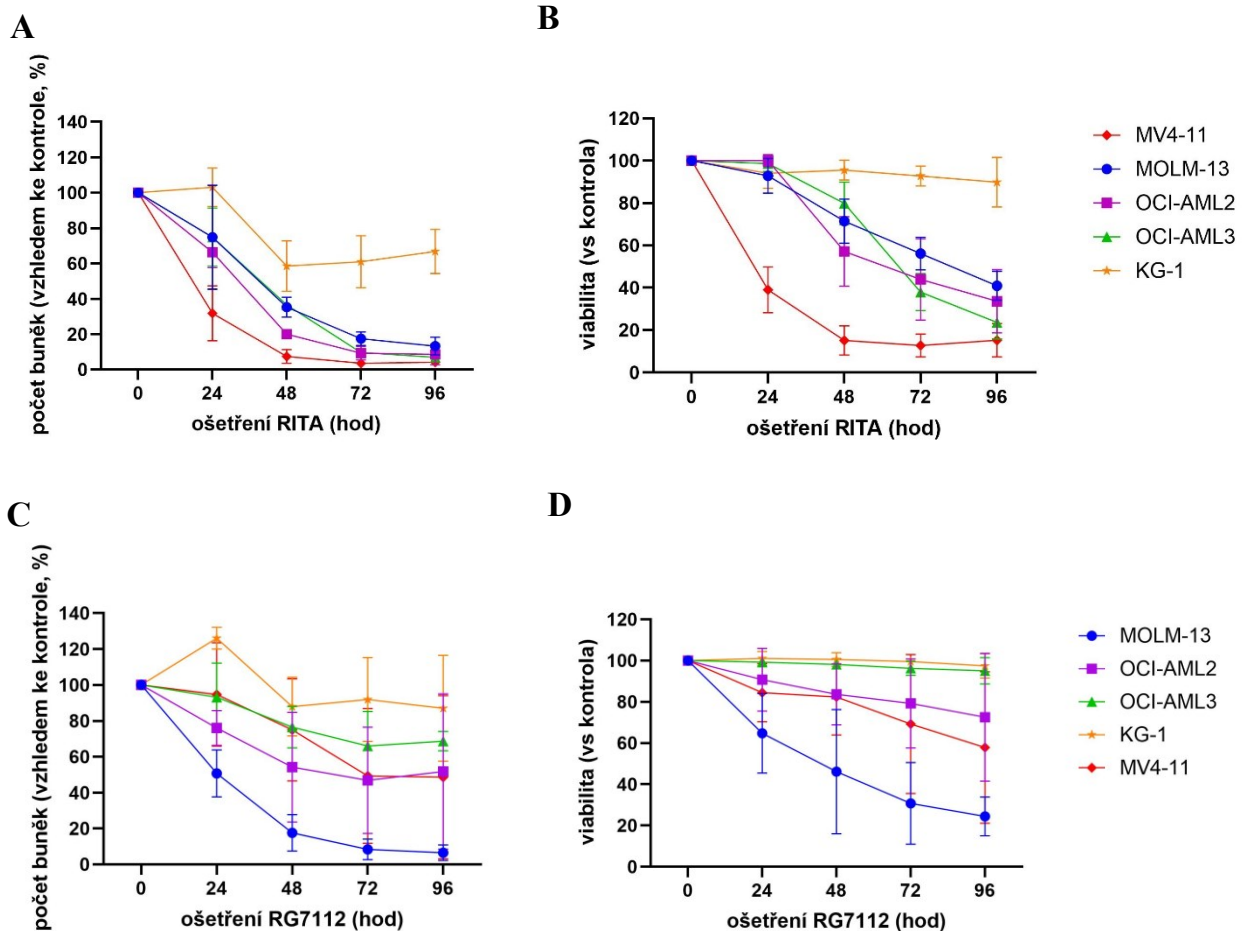
5.1.1 Vyšetření vlivu inhibitorů na proliferaci a viabilitu AML linií

Buňky reprezentativního panelu AML linií (viz kapitola 4.1.2) byly nasazeny do kultivačních jamek a v čase 0 hod k nim byly přidány inhibitory, RG7112 nebo RITA ve finální koncentraci 1 μ M. Tato koncentrace byla zvolena z předchozích titračních experimentů tak, aby bylo možno sledovat vliv těchto inhibitorů na viabilitu a proliferaci buněk po dobu 96 hod. Viabilita a proliferace buněk byla měřena v intervalu 24 hod s využitím trypanové modři. Hodnoty jednotlivých měření jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku bez inhibitorů. Tento pokus byl proveden ve 4 biologických opakováních.

Z obrázku 9 je zřejmé, že RITA (A, B) po 24 hod nejvíce působí na proliferaci (A) a viabilitu (B) buněčné linie MV4-11. Naopak nejméně jsou ovlivněny viabilita a proliferace

linie KG-1. Buněčné linie MOLM-13, OCI-AML2, OCI-AML3 reagují na RITA podobně, největší změny jsou pozorovány v časovém intervalu 24-48 hod.

Největší vliv RG7112 na proliferaci (C) a viabilitu (D) pozorujeme u buněčné linie MOLM-13. Nejvyšší rezistenci vykazují opět KG-1, málo senzitivní jsou také buňky linie OCI-AML3.



Obrázek 9 – Měření proliferace (A, C) a viability (B, D) AML buněčných linií (MOLM-13, MV4-11, KG-1, OCI-AML2, OCI-AML3) po ošetření 1 μ M RITA (A, B) či RG7112 (C, D) po dobu 96 hod. Hodnoty jednotlivých měření jsou vztaženy ke kontrole a chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku (\pm SD). Toto měření bylo provedeno ve 4 biologických opakováních.

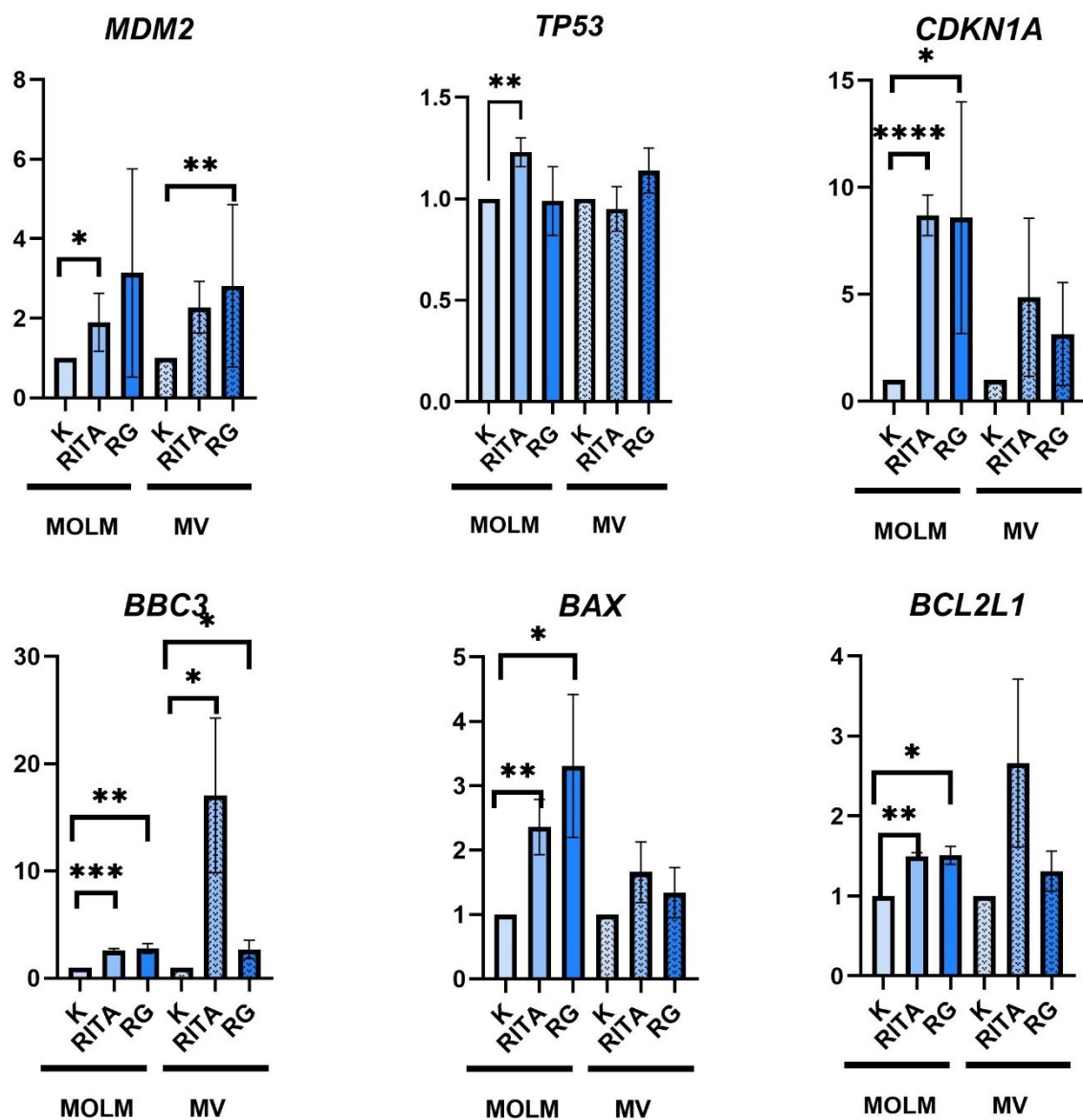
Vzhledem k výše popsaným výsledkům jsme pro další výzkum zvolili dvě linie s vysokou citlivostí k jednomu ze studovaných inhibitorů a relativní rezistencí ke druhému z nich: MOLM-13 jako senzitivní k RG7112 a relativně rezistentní k RITA a MV4-11 jako senzitivní k RITA a relativně rezistentní k RG7112. V buňkách těchto linií jsme proto provedli analýzu exprese vybraných genů a proteinů po ošetření zvolenými inhibitory, tedy RG7112 i RITA. Následně byly tyto linie použity i pro sledování vlivu přítomnosti exosomů na citlivost

buněk k vybraným inhibitorům. Vzhledem k tomu, že většina následných analýz probíhala po 24 hod působení inhibitorů, kdy byl vliv 1 μM RITA na viabilitu buněk linie MOLM-13 zanedbatelný, a s ohledem na dřívější experimenty na primárních buňkách, ve kterých 1 μM RITA rovněž nevyvolala žádnou reakci (Wolfová et al. 2023), zvolili jsme pro další experimenty 2 μM koncentraci tohoto inhibitoru. Koncentrace RG7112 byla ponechána na hodnotě 1 μM .

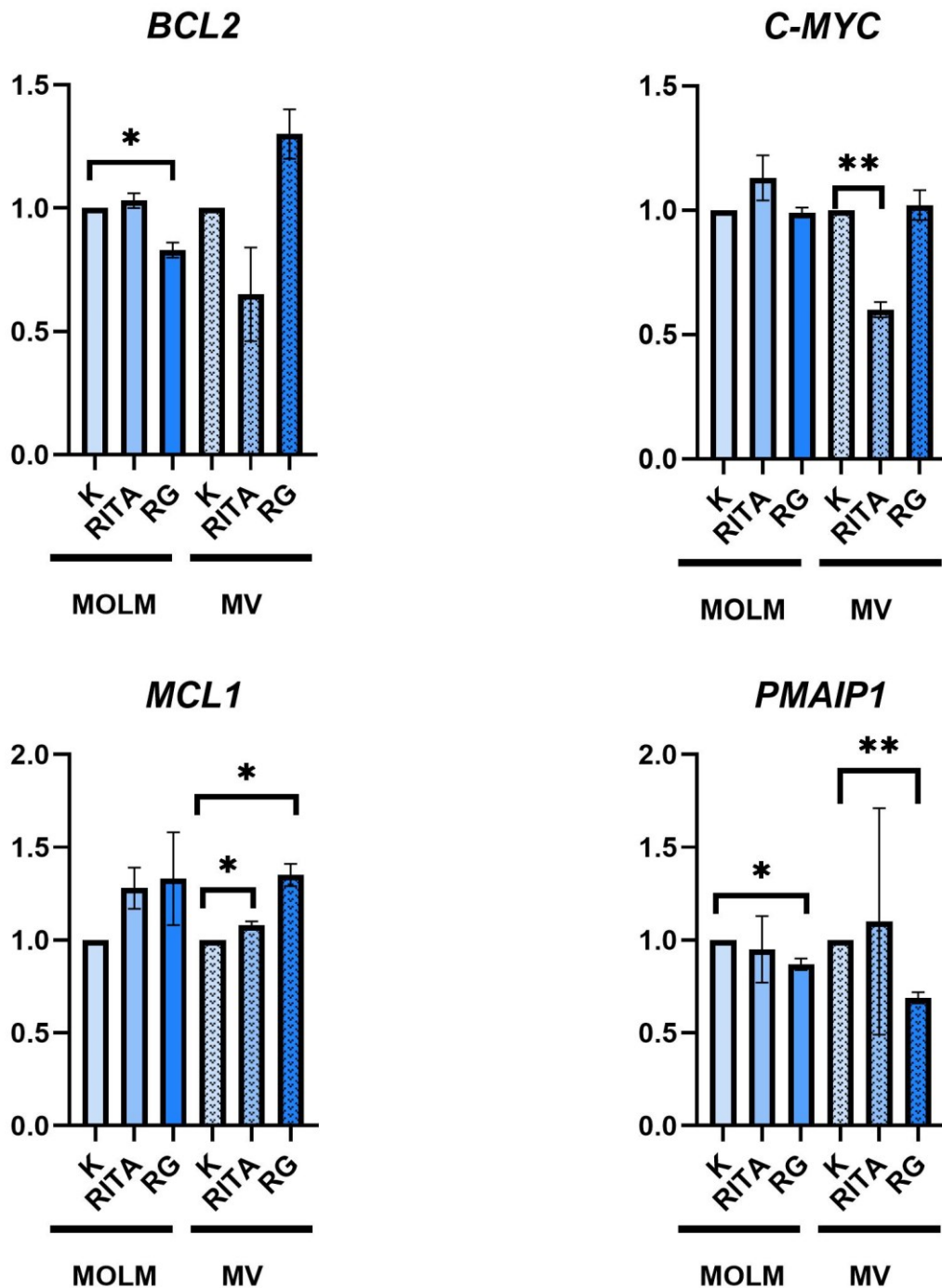
5.1.2 Vliv inhibitorů na transkripci v AML liniích a primárních vzorcích

Kvantitativní PCR v reálném čase pro vyšetření hladin transkriptů vybraných genů byla provedena pro AML linie (MOLM-13, MV4-11) a několik vzorků primárních buněk AML pacientů z leukodeplece (označeny LD78, LD79, LD80). Pro detekci cDNA bylo využito fluorescenční barvivo SYBR Green a jako referenční gen *GAPDH*. Každá sada obsahovala kontrolní neošetřený vzorek (K), vzorek ošetřený 1 μM RG7112 (RG) a vzorek ošetřený 2 μM RITA (RITA), všechny inkubovány po dobu 24 hod. Vzorky AML linií byly měřeny v technických triplicátech a minimálně ve 2 biologických opakováních. Pro některé vzorky linií MOLM-13 (označeny MO24, MO25) a MV4-11 (označeny MV44, MV45) a primárních AML buněk (LD78, LD79, LD80) byly současně vyšetřeny i hladiny proteinů (viz kapitola 5.1.3.2).

Obě studovaná léčiva jsou charakterizována jako inhibitory interakce mezi Mdm2 a p53, předpokládali jsme tedy, že jejich vliv se projeví i změnami v expresi *MDM2*, případně i *TP53* a dalších genů, jejichž transkripce je závislá na aktivitě proteinu p53. Výsledné hladiny transkriptů jsou znázorněny prostřednictvím grafů na Obrázcích 10 a 11. U všech vyšetřovaných vzorků a obou léčiv jsme skutečně zaznamenali zvýšení transkriptu pro *MDM2*. Expres *TP53* nebyla výrazně změněna, nárůst jsme ale detekovali pro p53-závislé geny *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3* a *BCL2L1* (z angl. Bcl-2-like protein 1, gen pro protein Bcl-xL). Zvýšení bylo signifikantní pro vzorky z linie MOLM-13, zatímco u experimentů s linií MV4-11 rozdíly nedosáhly statisticky významné hodnoty (s výjimkou genů *BBC3* a *MDM2*). Důvodem je pravděpodobně větší rozptyl hodnot referenčního genu *GAPDH* vypovídající o velkých rozdílech v koncentracích porovnávaných vzorků. U vzorků linie MV4-11 po RG7112 a RITA byl pozorován rovněž mírný nárůst exprese transkriptu *MCL1*. RITA dále indukovala snížení exprese *C-MYC* a *BCL2* v buňkách linie MV4-11.

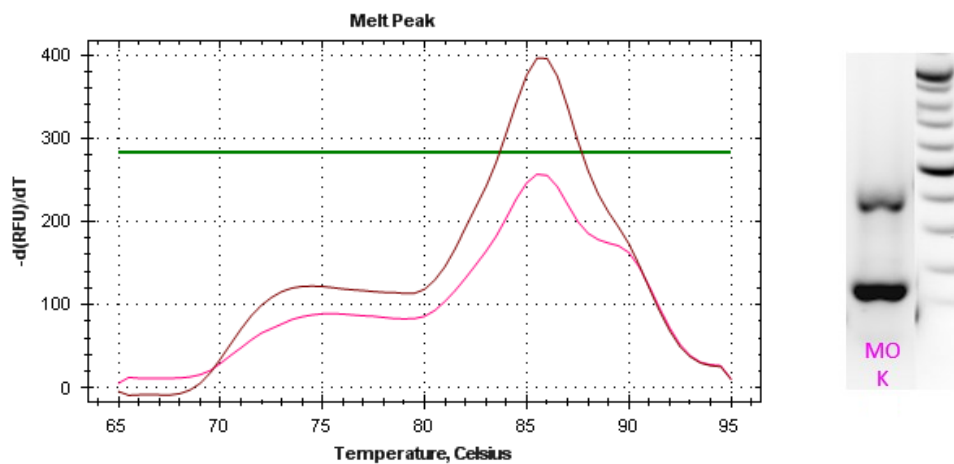


Obrázek 10 – Statistické zhodnocení výsledné hladiny transkriptů MDM2, TP53, CDKN1A, BBC3, BAX, BCL2L1 u AML linií MOLM-13 (MOLM) a MV4-11 (MV). Tyto linie byly ošetřeny 1 μ M RG7112 (RG) či 2 μ M RITA. Jako kontrolní vzorek byly použity buňky bez ošetření inhibitory (označen K). Jako referenční gen byl použit GAPDH. Hladiny transkriptů byly statisticky zhodnocené pomocí nepárového t-testu a příslušných p-hodnot (na obrázku označeny hvězdičkou), tedy: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

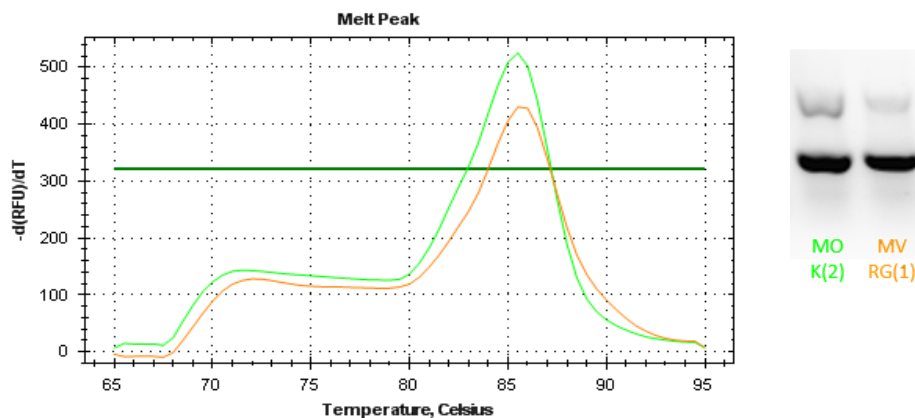


Obrázek 11 - Statistické zhodnocení výsledné hladiny transkriptů *BCL2*, *C-MYC*, *MCL1*, *PMAIP1* u linie MOLM-13 (MOLM) a MV4-11 (MV) znázorněných prostřednictvím grafu. Buňky byly ošetřeny 1 μ M RG7112 (RG) nebo 2 μ M RITA, K představuje kontrolní vzorek bez ošetření. Jako referenční gen byl použit GAPDH. Hladiny transkriptů byly statisticky zhodnocené prostřednictvím nepárového t-testu a p-hodnot (na obrázku označeny hvězdičkou), tedy: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

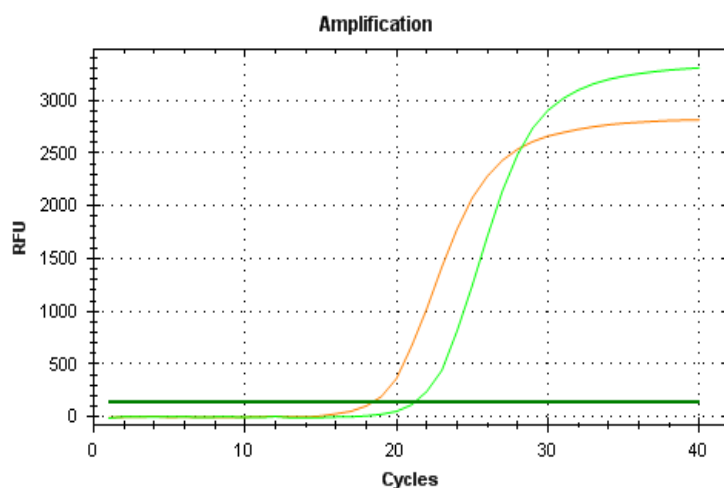
K posouzení správně provedené qPCR nebyla použita pouze křivka tání, ale dále jsme její správnost zkontrolovali pomocí agarózové elektroforézy a specifického produktu na gelu, viz názorný obrázek 12, 13 a 14 demonstrující analýzu exprese genu *PMAIP1* (gen pro protein NOXA). Ačkoliv snížená exprese *PMAIP1* je statisticky významná po ošetření obou buněčných linií inhibítorem RG7112 a produkt na gelu se zdá specifický, tento výsledek vyžaduje opatrnost při vyhodnocení dat vzhledem k netypickému tvaru křivky tání, pro srovnání je správný tvar křivky tání zobrazen na obrázku 12 (kontrola, hnědě).



Obrázek 12 - Křivka tání produktu cDNA pro gen *PMAIP1*. MOLM-13 kontrola (růžově, MO-K) a MOLM-13 kontrola (hnědě) ukazující správný tvar křivky tání pro *PMAIP1*. V pravé části obrázku je znázorněn gel pro cDNA vzorku MOLM-13 kontrola (růžová křivka tání). Lader: po 100 bp.

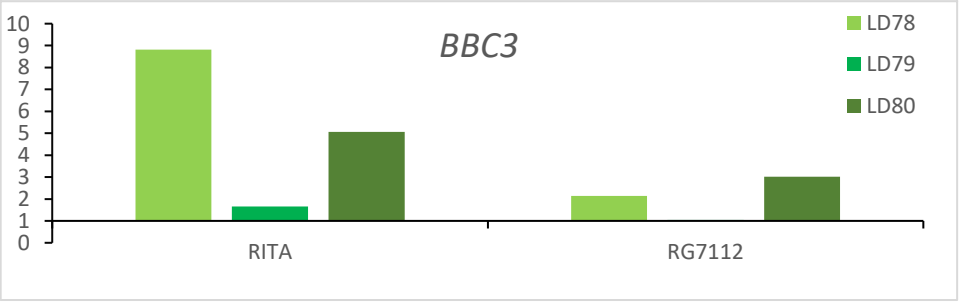
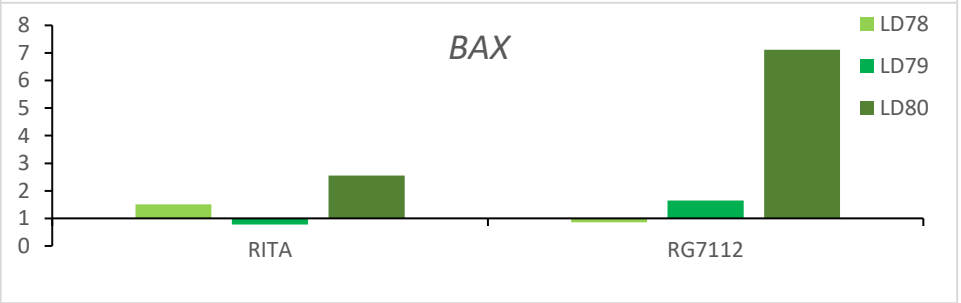
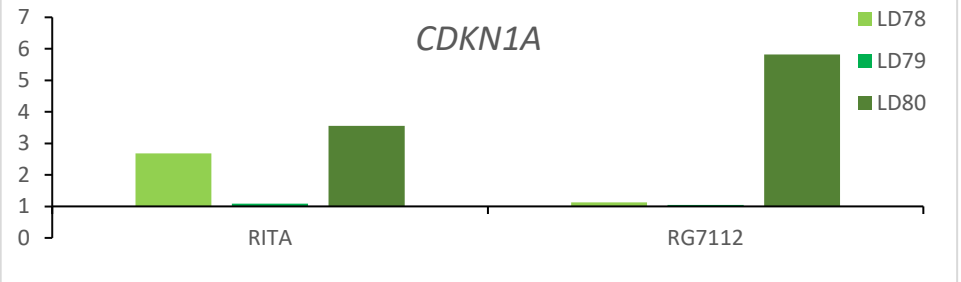
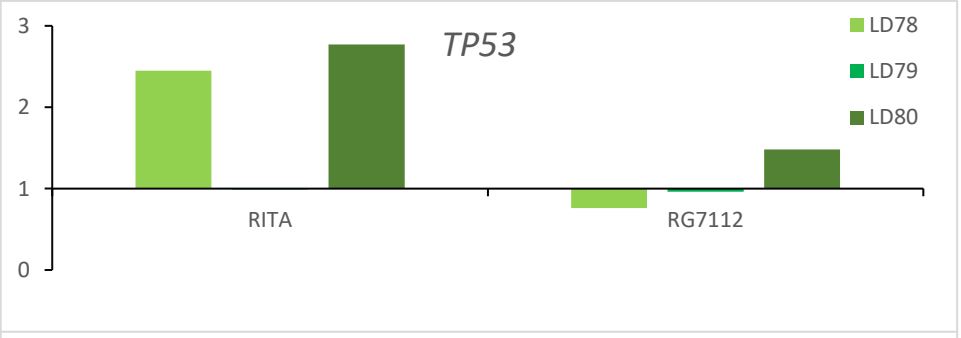
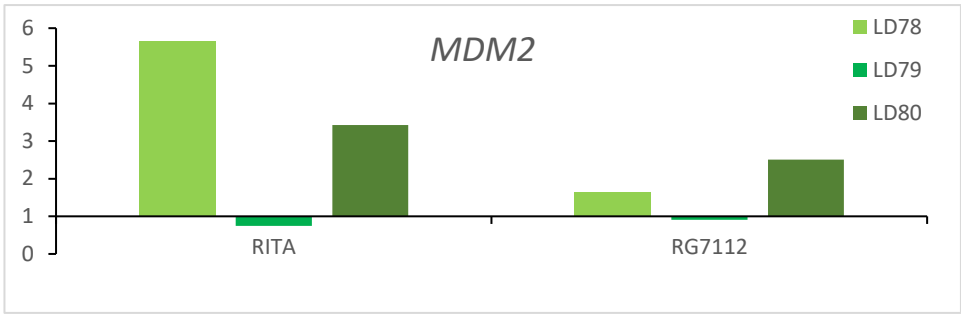


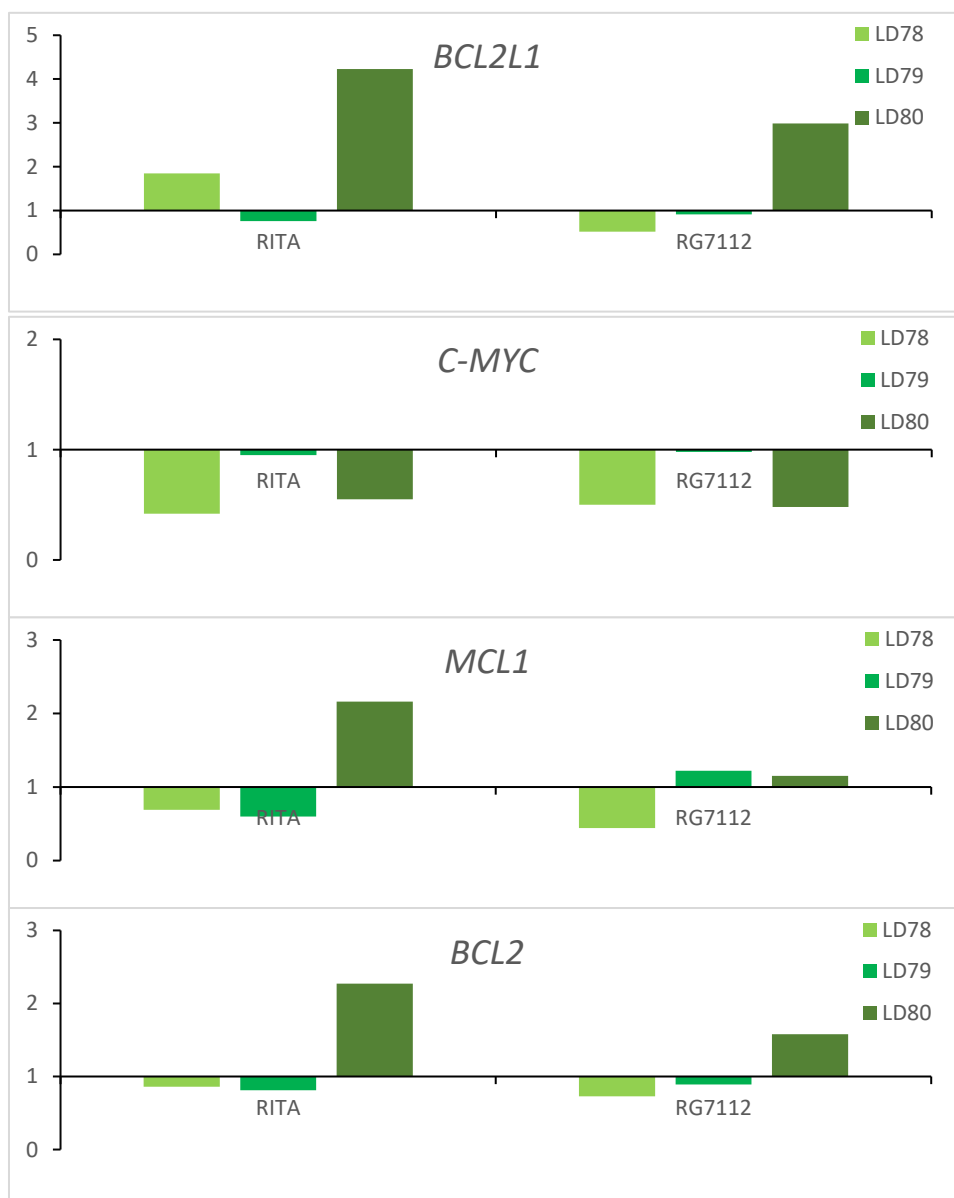
Obrázek 13 – Křivka tání produktu cDNA pro gen *PMAIP1*. MOLM-13 linie-kontrola (zeleně, MO K (2)) a MV4-11 po ošetření RG7112 (oranžově, MV RG (1)). V pravé části je znázorněna elektroforéza těchto cDNA, kde je vidět specifický band u 215 bp.



Obrázek 14 – Amplifikační křivka produktů genu *PMAIP1*. MOLM-13 linie-kontrola (zeleně) a MV4-11 po ošetření RG7112 (oranžově).

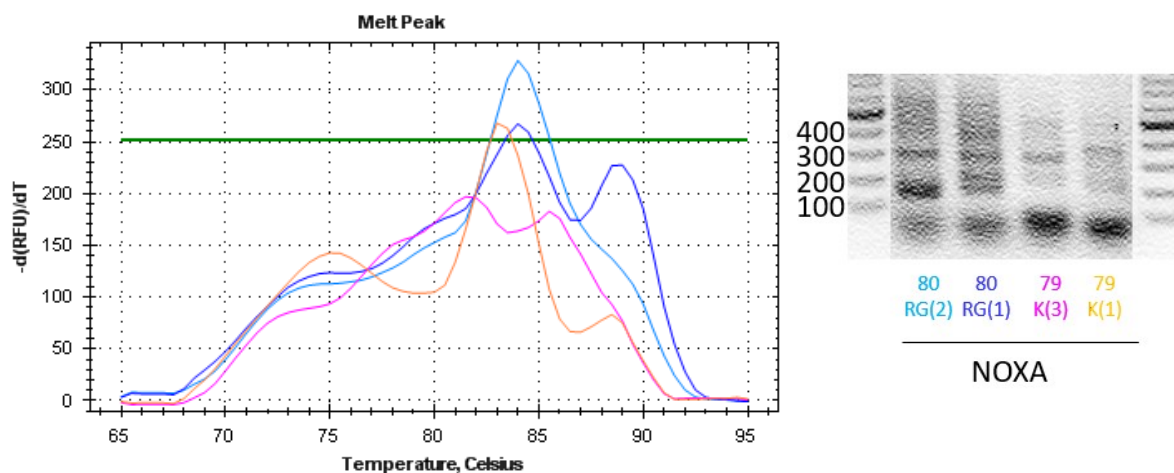
Expres vybraných genů byla vyšetřena i u primárních AML vzorků z leukodeplece (označeny LD78, LD79, LD80). Tato analýza byla provedena v technických triplikátech, ale pouze v 1 biologickém opakování, z důvodu omezeného množství materiálu z primárních vzorků. Hladina transkriptu pro jednotlivé vzorky byla vyhodnocena individuálně, vzhledem k velké heterogenitě onemocnění a tedy pravděpodobnosti velkých rozdílů mezi individuálními patientskými vzorky. Výsledná analýza hladin transkriptů je znázorněna na obrázku 15. Vzorky LD78 a LD80 se ve většině případech chovají podobně, na rozdíl od vzorku LD79. Pozorovali jsme zvýšenou hladinu transkriptu pro p53 zejména po RITA, u RG7112 pouze u vzorku LD80. Expres *MDM2* je opět zvýšena stejně jako v případě AML linií. Nárůst exprese u p53-závislých genů byl u některých vzorků pozorován u obou léčiv, zejména u genů *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3* a *BCL2L1*. Naopak snížená exprese byla pozorována u genů *C-MYC*, *BCL2* a *MCL1* u většiny vzorků po ošetření RG7112 i RITA. Vzorek LD79 nevykazuje výrazně zvýšenou expresi u žádného genu po ošetření RITA ani RG7112.



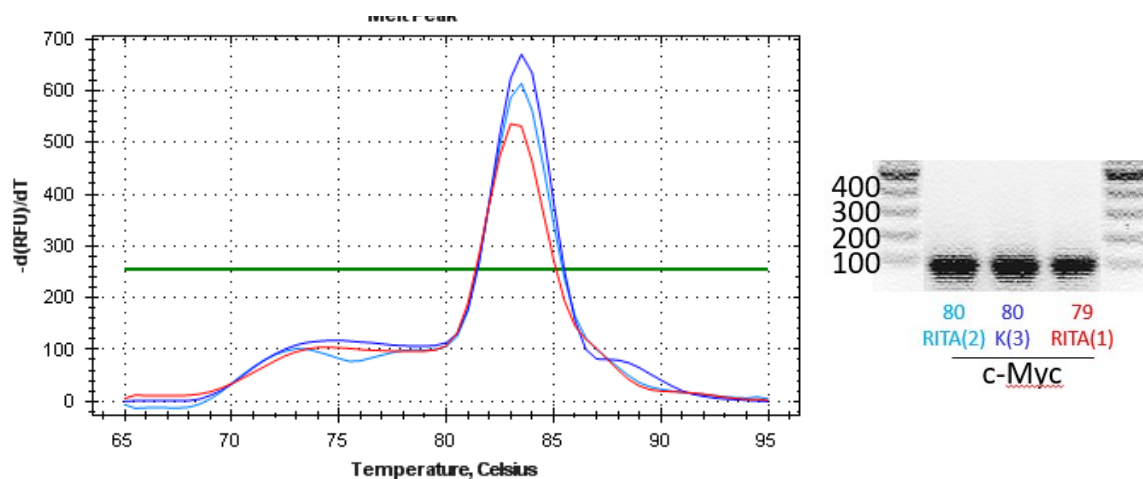


Obrázek 15 - Analýza hladiny transkriptů *MDM2*, *TP53*, *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3*, *BCL2L1*, *C-MYC*, *MCL1* a *BCL2* u primárních buněk (LD78, LD79, LD80) po ošetření 1 μ M RG7112 či 2 μ M RITA. Výsledné hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou vztaženy ke kontrole (neošetřenému vzorku), tedy kladná hodnota představuje zvýšení oproti kontrole, záporná představuje snížení.

Po analýze kvantitativní PCR byla opět vytvořena křivka tání pro jednotlivé cDNA a pro některé vzorky byla následně provedena agarózová elektroforéza pro kontrolu specifického produktu na gelu, výsledky jsou znázorněny na obrázcích 16 a 17. Vzhledem k výsledkům tohoto ověření byl vyrazen gen *PMAIP1* z důvodu příliš krátkého produktu na gelu, viz obrázek 16.



Obrázek 16 – Křivka tání s více peaky pro gen PMAIP1. V pravé části obrázku je znázorněn gel, na kterém je nespecifický a příliš krátký produkt cDNA pro protein NOXA. Analyzovány byly duplikáty vzorků LD80 po ošetření RG7112 (světle modře, 80 RG (2) a tmavě modře, 80 RG (1)) a duplikáty LD79 kontrolních vzorků (růžově, 79 K (3) a oranžově, 79 K(1)).



Obrázek 17 - Křivka tání produktu cDNA pro gen C-MYC. LD79 po ošetření RITA (červená, 79 RITA (1)), LD80 po ošetření RITA (světle modrá, 80 RITA (2)) a LD80 kontrolní vzorek (tmavě modrá, 80 K (3)). V pravé části obrázku je znázorněn gel pro cDNA všech tří vzorků. Na gelu je pozorován specifický produkt pro gen C-MYC o předpokládané délce 123 bp. V tomto případě drobné odchylky v křivce tání nejsou podstatné.

5.1.3 Hladina proteinů u AML linií a primárních AML buněk

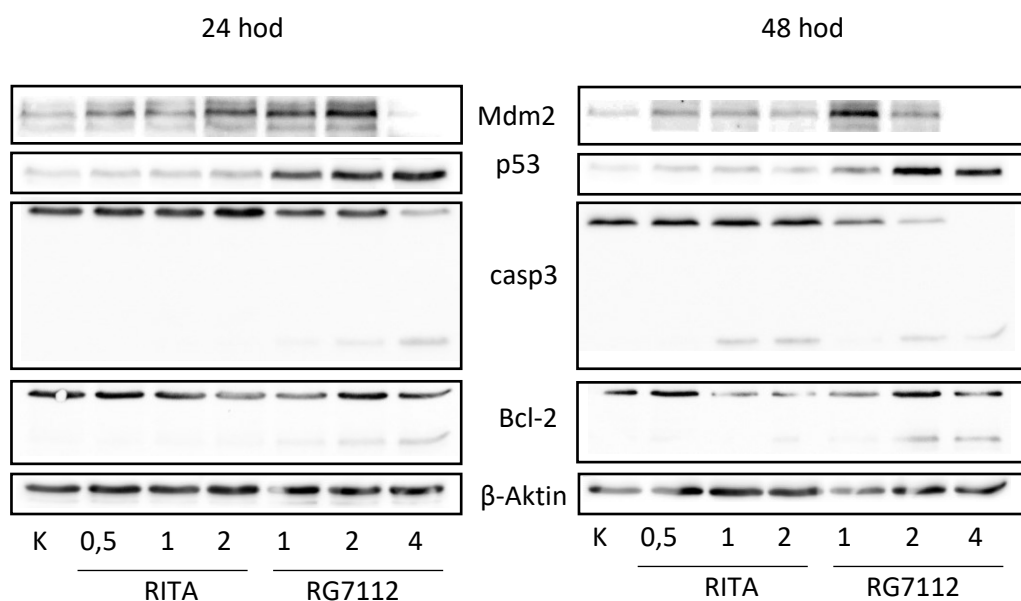
5.1.3.1 Základní proteinové charakteristiky vlivu RG7112 a RITA na zvolené AML linie

Pro základní představu o vlivu studovaných inhibitorů na proces apoptózy ve zvolených liniích MOLM-13 a MV4-11 jsme provedli analýzu hladiny proteinů přímo zasažených inhibitory (Mdm2 a p53) a proteinů souvisejících s apoptózou (kaspáza 3, Bcl-2) po ošetření různými koncentracemi RG7112 (1 μ M, 2 μ M, 4 μ M) a RITA (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M) v časových intervalech 24 hod a 48 hod (obrázky 18 a 19).

Jak je vidět z obrázku 18, v buňkách linie MOLM-13 obě léčiva indukují zvýšení hladiny Mdm2 a p53, pro oba proteiny jsou změny výraznější po ošetření RG7112. Výjimkou je nejvyšší koncentrace RG7112, po níž zvýšení Mdm2 hladiny nepozorujeme.

Pozorované výsledky u MOLM-13 (koncentrace 1 μM RG7112 a 2 μM RITA po 24 hod) korelují s pozdějším experimentem (biologického opakování) ze stejné buněčné linie (obrázek 20). Po 24 hod ošetření buněk RG7112 je pozorována apoptóza (štěpení kaspázy 3). U Bcl-2 se s narůstající koncentrací objevuje band u nižší molekulové hmotnosti, který byl rovněž dříve popsán v souvislosti s apoptózou závislou na kaspáze 3 (Kirsch et al. 1999; Fortney et al. 2002).

Po ošetření RITA je v linii MOLM-13 apoptóza (štěpení kaspázy 3) zjevná až po 48 hod. Hladina antiapoptického proteinu Bcl-2 se snižuje se zvyšující koncentrací RITA, ale nepozorujeme jeho kratší proapoptickou variantu. Naopak po RG7112 zůstává hladina celodélkového proteinu Bcl-2 bez výrazné změny, ale hladina proapoptického fragmentu se zvyšuje.



Obrázek 18 – Western blot analýza vybraných proteinů (Mdm2, p53, kaspáza 3, Bcl-2) u buněčné linie MOLM-13 po ošetření inhibitory o různých koncentracích. Použité koncentrace byly 0,5 μM , 1 μM nebo 2 μM pro RITA a 1 μM , 2 μM nebo 4 μM pro RG7112. Všechny vzorky byly sklizeny po 48 hod kultivace, inhibitory byly k buňkám přidány na posledních 24 nebo 48 hod. Kontrolní vzorek bez ošetření inhibitory označen K.

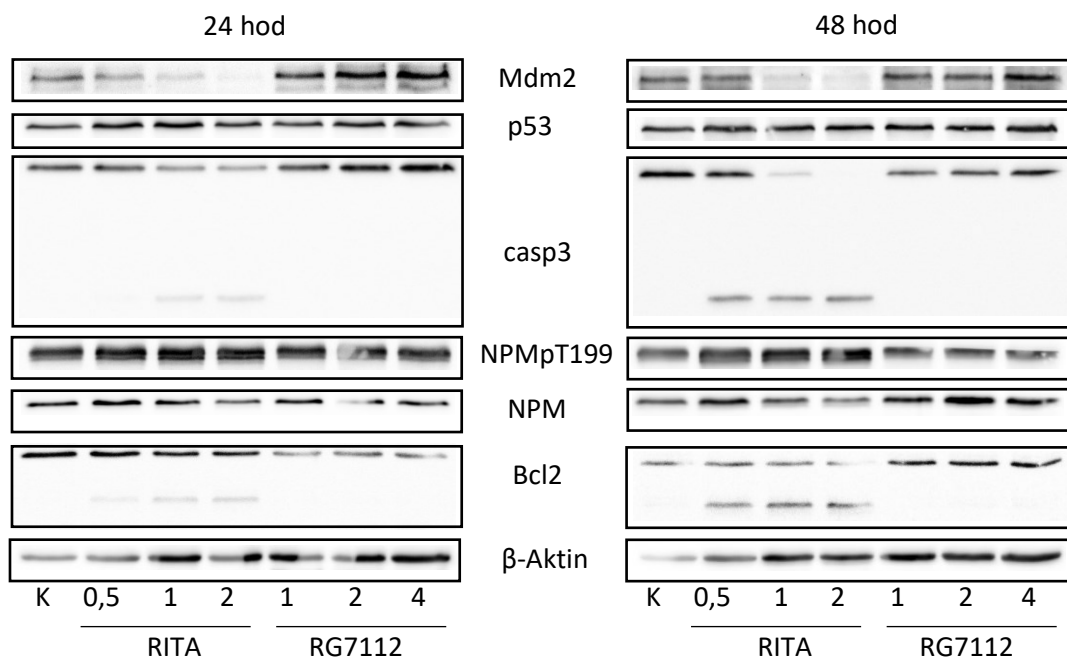
Dále byly analyzovány vzorky linie MV4-11 (obrázek 19), kdy opět výsledky při použití koncentrace 1 μM RG7112 a 2 μM RITA po 24 hod korelují s pozdějším experimentem (dalšího biologického opakování) u stejné buněčné linie (obrázek 20). Pouze

hladina Bcl-2 je v těchto vzorcích s RG7112 mírně snížena, což se nepotvrdilo v následných experimentech.

Oba inhibitory u linie MV4-11 mírně zvyšují hladinu tumor-supresoru p53, ale zatímco po ošetření RG7112 se hladina Mdm2 podle očekávání významně zvyšuje, RITA indukuje snížení hladiny Mdm2 proteinu.

Po ošetření RG7112 není pozorována apoptóza (není štěpena kaspáza 3). Naopak antiapoptotický Bcl-2 (hlavní band) je po 24 hod snížen, ale po 48 hod je ve všech koncentracích pozorován zvýšený.

RITA spouští apoptózu (štěpení kaspázy 3) už ve velmi nízkých koncentracích, po 48 hod je aktivace kaspázy 3 zjevná i v nejnižší použité koncentraci 0,5 μM . U Bcl-2 hlavní band zůstává beze změny, ale se zvyšující se koncentrací a dobou působení RITA přibývá proapoptotický fragment. Zajímavým zjištěním je, že není pozorován významný rozdíl u hladin NPM, ale detekujeme významné zvýšení fosforylace na threoninovém zbytku NPM-T199. Tato skutečnost byla detailně popsána v nedávné publikaci Wolfová et al. 2023 (Wolfová et al. 2023).



Obrázek 19 – Výsledky western blot analýzy u buněčné linie MV4-11 po působení RITA (0,5 μM , 1 μM , 2 μM) a RG7112 (1 μM , 2 μM , 4 μM) po 24 hod a 48 hod. Analyzovány byly vybrané proteiny (Mdm2, p53, kaspáza 3, NPMpT199, NPM, Bcl-2). Kontrolní vzorek bez ošetření inhibitory označen K.

5.1.3.2 Detailní proteomické vyšetření účinku RG7112 a RITA po 24 hod v AML liniích a patientských vzorcích

Pomocí elektroforézy a následné western blot analýzy byly stanoveny hladiny jednotlivých proteinů u AML linií (MOLM-13 a MV4-11, obrázek 20) a patientských vzorků (označených LD78, LD79, LD80, obrázek 21) ošetřených po dobu 24 hod 1 μ M RG7112 nebo 2 μ M RITA. Kontrolní vzorek nebyl ošetřen inhibitory a byl kultivován také 24 hod. V tomto experimentu jsme vyšetřovali hladiny proteinů souvisejících s aktivací proteinu p53 a proteiny související s apoptózou buněk. Vzhledem k předběžným výsledkům jsme očekávali vyšší odpověď linie MOLM-13 na ošetření RG7112 a linie MV4-11 na inhibitor RITA. Časový interval byl zvolen tak, aby již byly patrné změny na proteinové úrovni, ale nebyla ještě zásadně snížena viabilita ošetřených buněk, což umožnilo analyzovat časnou fázi apoptózy. Jako referenční protein byl vybrán β -Aktin, který je u AML linií ověřený jako housekeeping protein. U AML linií byly experimenty měřeny ve 2 biologických opakováních, ve výsledcích je prezentován jeden ilustrativní replikát z každé buněčné linie v pořadí neošetřený vzorek – buňky ošetřené RITA – buňky ošetřené RG7112. Patientské vzorky byly celkem tři a každý z nich se liší v odpovědi na ošetření inhibitory, stejně jako bylo pozorováno výše při měření hladin transkriptů.

Vyšetření účinku RITA:

U buněčné linie MOLM-13 dochází v přítomnosti RITA ke zvýšení hladiny proteinů p53, p21, Mdm2, mírně zvýšený je také antiapoptotický Bcl-xL, jadérkový protein NPM a jeho fosforylovaná forma NPMpT199. Fosforylované formy proteinu p53 (p53pS15, p53S46, p53pS392) související s jeho stabilizací a aktivitou jsou pozorovány jako mírně zvýšené. Naopak snížena je hladina fosforylované formy NPM na serinu 4 (NPMpS4) a proapoptotického Bax. Bez výrazné změny je antiapoptotický protein Bcl-2 a Mcl-1, onkoprotein c-Myc, proapoptotické proteiny NOXA a Puma a jadérkový protein nukleolin (NCL). Protein PARP se podobně štěpí i v kontrole a kaspáza 3 ani Bcl-2 nejsou štěpeny ve srovnání s kontrolou, takže není pozorována indukovaná apoptóza. V souhrnu tedy proteomická analýza potvrzuje výsledky měření proliferace a viability, tedy že u buněk linie MOLM-13 je účinkem RITA aktivován protein p53, dochází k transkripční aktivaci Mdm2, ale i ke spuštění opravných procesů, což koreluje se sníženou proliferací. Zároveň nepozorujeme známky apoptózy, což odpovídá jen mírně snížené viabilitě těchto rezistentních buněk.

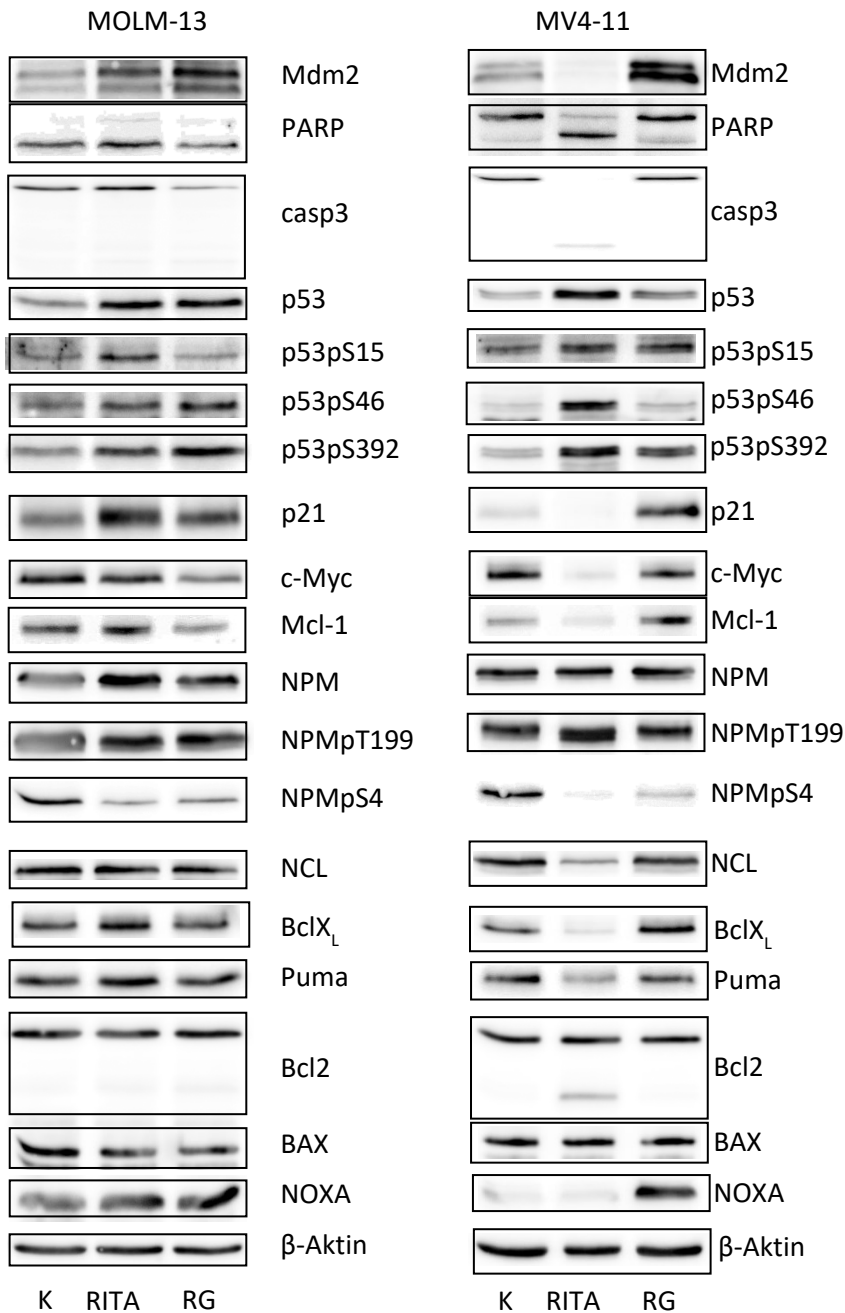
U buněčné linie MV4-11 je pozorována po ošetření RITA zvýšená hladina tumor-supresoru p53, fosforylace NPM na T199 a fosforylovaných forem p53 (p53pS15, p53pS46, p53pS392), což souvisí s aktivovanou apoptózou (Smeenk et al. 2011). Dále je vlivem RITA snížena hladina proteinu Mdm2, proteinu p21 regulujícího buněčný cyklus v G1 fázi, onkoproteinu c-Myc, antiapoptotického Mcl-1 a Bcl-xL, apoptotického Puma, fosforylovaného NPM na Ser4 a jadérového proteinu NCL. Naopak bez výrazné změny v porovnání s kontrolou zůstávají protein NPM, proapoptotické proteiny NOXA a Bax a antiapoptotický Bcl-2. Avšak u Bcl-2 je pozorován kratší proapoptotický fragment. Účinně jsou štěpeny také PARP a kaspáza 3 indukující apoptózu. V této senzitivní linii je tedy účinkem RITA masivně spuštěna p53-dependentní apoptóza, což koreluje s dříve popsány křivkami proliferace a viability.

Wyšetření účinku **RG7112**:

Po ošetření inhibitorem RG7112 jsme u AML linie MOLM-13 pozorovali zvýšenou hladinu p53 a jeho fosforylovaných forem (p53pS46, p53pS392), p21, Mdm2 a proapoptotického proteinu NOXA. Snížené jsou proteiny c-Myc, Mcl-1, NPMpS4, Bax. Bez výrazné změny jsou pozorovány hladiny proteinů proapoptotického Puma, fosforylovaná varianta proteinu p53 (p53pS15), antiapoptotických Bcl-xL a Bcl-2, či NCL, NPM a NPMpT199. Mírně štěpeny jsou kaspáza 3 a Bcl-2. Zablokování vazby Mdm2 na p53 má tedy za následek zvýšení stabilizace a aktivity p53 a spuštění procesu apoptózy závislé na p53. Zvýšená aktivita p53 se projevuje i na regulaci transkripce Mdm2 a vyšší hladině Mdm2 proteinu, ale vzhledem k jeho inhibici nedochází k interakci s p53 a tedy regulaci hladiny p53. Výsledkem je spuštění apoptotického procesu zahrnující zejména aktivitu p21 a, jak bude ukázáno dále, zástavu buněčného cyklu při přechodu do S-fáze. To souhlasí s podstatným snížením proliferace i viability v této RG7112-senzitivní linii popsáným v kapitole 5.1.1.

Posledním vyšetřovaným jevem byl vliv inhibitoru RG7112 na linii MV4-11. Podobně jako u linie MOLM-13 jsme detekovali zvýšené hladiny proteinů Mdm2, p53 a jeho fosforylovaných forem (p53pS15, p53pS46, p53pS392), p21 a NOXA, na rozdíl od MOLM-13 je ale zvýšená rovněž hladina Mcl-1. Snížená je fosforylace proteinu NPM na serinu 4. Bez výrazné změny jsou jadérové proteiny NPM, NPMpT199 a NCL a také velká část proteinů anti- a proapoptotických proteinů: Bcl-2, Bcl-xL, Bax, c-Myc a Puma. Nejsou štěpeny proteiny související s apoptózou, PARP, Bcl-2 a kaspáza 3. Nižší účinnost RG7112 tedy pravděpodobně nesouvisí se sníženou aktivací p53, ale spíše s absencí vlivu na antiapoptotický

protein Mcl-1 a transkripční faktor c-Myc, které jsou oba výraznými hráči v regulaci apoptózy a v linii MOLM-13 se jejich hladina po ošetření RG7112 snižuje.



Obrázek 20 – Western blot analýza vybraných proteinů u AML linií (MOLM-13 a MV4-11) po ošetření 1 μ M RG7112 (RG) a 2 μ M RITA po dobu 24 hod. Při analýze byly hladiny proteinů vztaheny ke kontrolnímu neošetřenému vzorku (označen K).

Analýza proteinů po ošetření **RITA** u primárních AML buněk:

Stejně jako při charakterizaci změn na úrovni transkripce byla vyšetřena hladina proteinů u jednotlivých primárních AML buněk (LD78, LD79, LD80). Podobně jako v případě

transkriptů jsou změny některých proteinů pro více vzorků shodné. Jde zejména o zvýšený tumor-supresor p53 a jeho fosforylovanou variantu p53pS392 (LD78, LD80), Bcl-xL (LD78, LD79, LD80) a proapoptotické proteiny Puma (LD78, LD80) a Bax (LD78, LD80). Silný band proteinu Bcl-2 u nižší molekulové hmotnosti je též pozorován u všech vzorků a hlavní band Bcl-2 je bez výrazné změny. Různý rozsah fragmentace pozorujeme pro PARP (LD78, LD80) a kaspázu 3 (LD79, LD80). Snížená hladina je detekována u proteinů Mdm2 (LD79, LD80), fosforylovaných variant p53 - p53pS15 a p53pS46 (LD79, LD80), p21 (LD79, LD80), c-Myc (LD78, LD79, LD80), NPMpT199 (LD79, LD80) a NCL (LD79, LD80). Bez výrazné změny ve srovnání s kontrolou jsou celkový NPM (LD78, LD80), NPMpS4 (LD78, LD80) a NOXA (LD78, LD80).

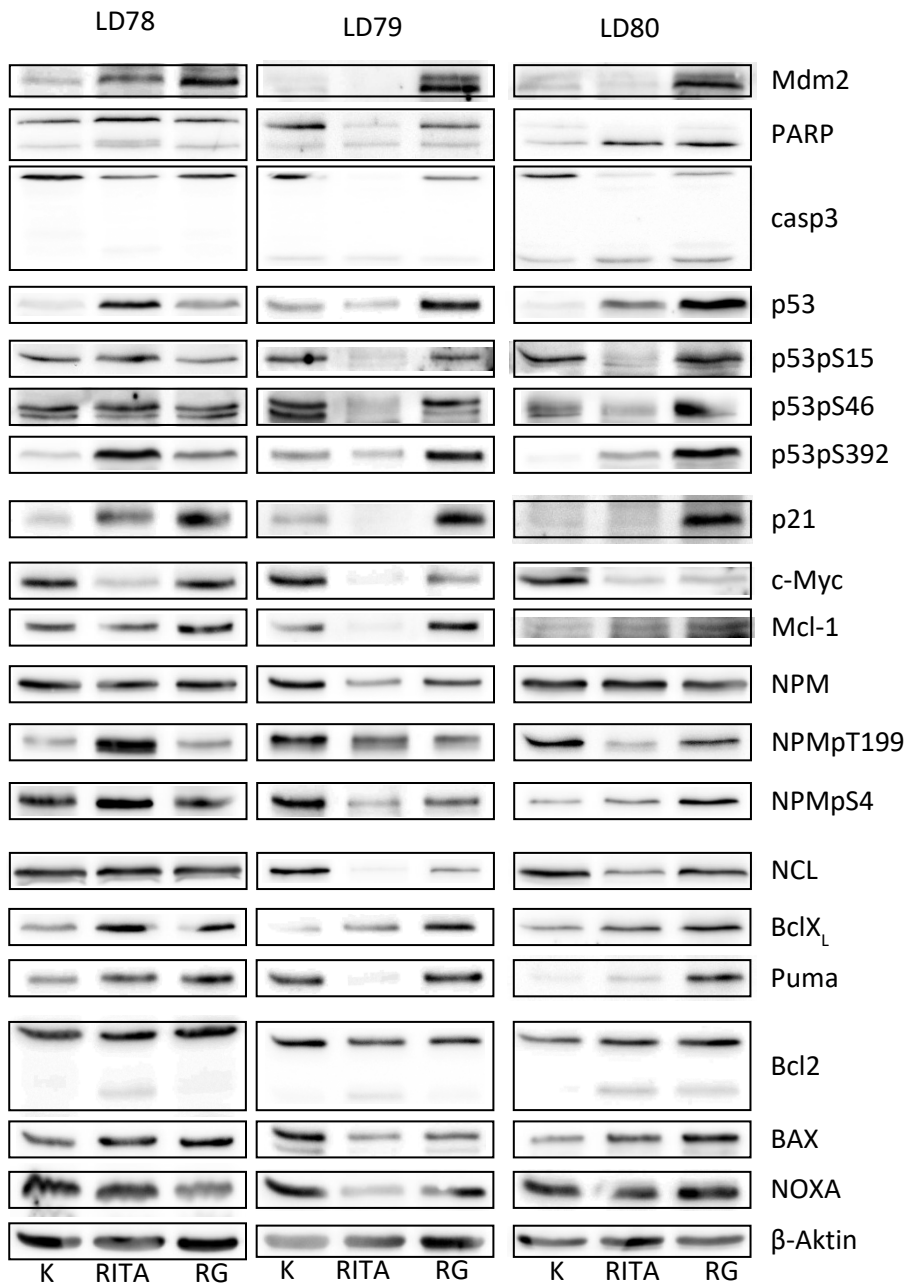
Co se týče individuálních odchylek ve srovnání s ostatními vzorky, je v LD78 pozorována zvýšená hladina Mdm2, NPMpT199 a mírně zvýšený p21. Naopak bez výrazné změny vůči kontrole jsou p53pS15, p53pS46 a NCL. U vzorku LD79 je mírně snížená hladina NPM, NPMpS4, Puma, Bax, Mcl-1 a NOXA, p53 a p53pS392 jsou beze změny. Hladina většiny proteinů u vzorku LD80 po ošetření RITA je shodná s odpovědí AML linie MV4-11. Výsledky western blotové analýzy vypovídají o tom, že RITA indukuje apoptózu ve všech testovaných vzorcích primárních buněk, její rozsah a průběh jsou ale odlišné.

Analýza proteinů po ošetření **RG7112** u primárních AML buněk:

Podobně byla analyzována hladina proteinů po ošetření primárních AML buněk inhibitorem RG7112. U všech vzorků je dle našich očekávání pozorována zvýšená hladina Mdm2, p53 a jeho fosforylované formy p53pS392, a proteinů p21 a Puma transkripčně závislých na p53. U dvou vzorků (LD78, LD80) nacházíme také zvýšenou expresi dalšího transkripčního cíle p53, proapoptotického proteinu Bax. Zajímavé je, že také hladina antiapoptotického Bcl-xL je u všech vzorků zvýšená. Ve srovnání s kontrolou je snížená hladina transkripčního faktoru c-Myc (LD79, LD80) a fosforylace NPMpS4 (LD78, LD79). Fragmentaci proteinu PARP nacházíme pouze u LD80, aktivaci kaspázy do jisté míry i v LD79. Bez výrazné změny hladiny jsou p53pS46 (LD78, LD79), p53pS15 (LD78, LD79), Mcl-1 (LD78, LD79), NPM (LD78, LD79, LD80), NPMpT199 (LD78, LD80), NCL (LD78, LD80), NOXA (LD79, LD80). Hlavní band Bcl-2 je beze změny a band s nižší molekulovou hmotností je výrazný také pouze u LD80.

Nejvíce senzitivní k RG7112 se tedy zdá být vzorek LD80. Dochází u něj ke štěpení PARP, Bcl-2 i kaspázy 3, dále je zvýšená fosforylace p53 na serinech 15, 46 a 392. V ostatních

dvou vzorcích detekujeme změny ukazující na přítomnost primárního efektu nutlinů, tedy zvýšení exprese Mdm2 a aktivace p53, ale v čase odběru vzorku bylo přítomno jen minimum dalších ukazatelů apoptózy. Pro detailnější zhodnocení efektu RG7112 na tyto buňky by proto bylo potřeba sledovat vliv inhibitoru v delším časovém úseku.

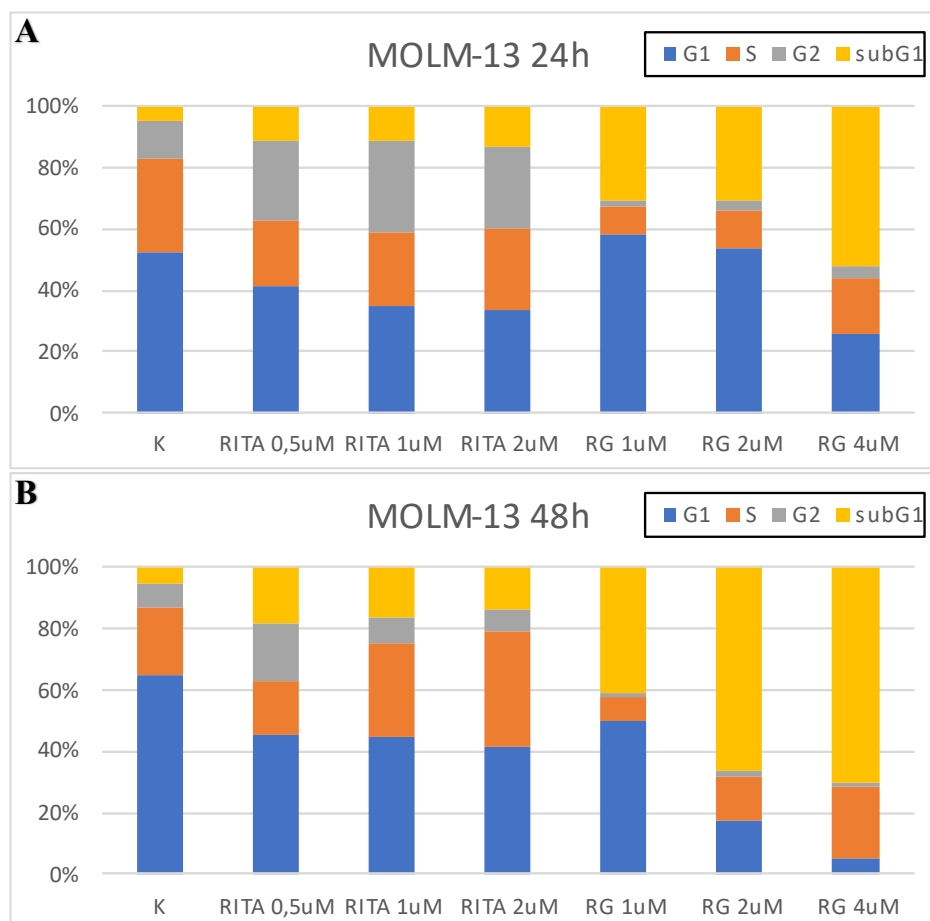


Obrázek 21 - Western blot analýza vybraných proteinů u primárních AML buněk (LD78, LD79, LD80) po ošetření 1 μM RG7112 (RG) a 2 μM RITA po dobu 24 hod. Kontrolní vzorek bez ošetření inhibitory (K).

5.1.4 Vliv inhibitorů na buněčný cyklus u AML linií (MV4-11, MOLM-13)

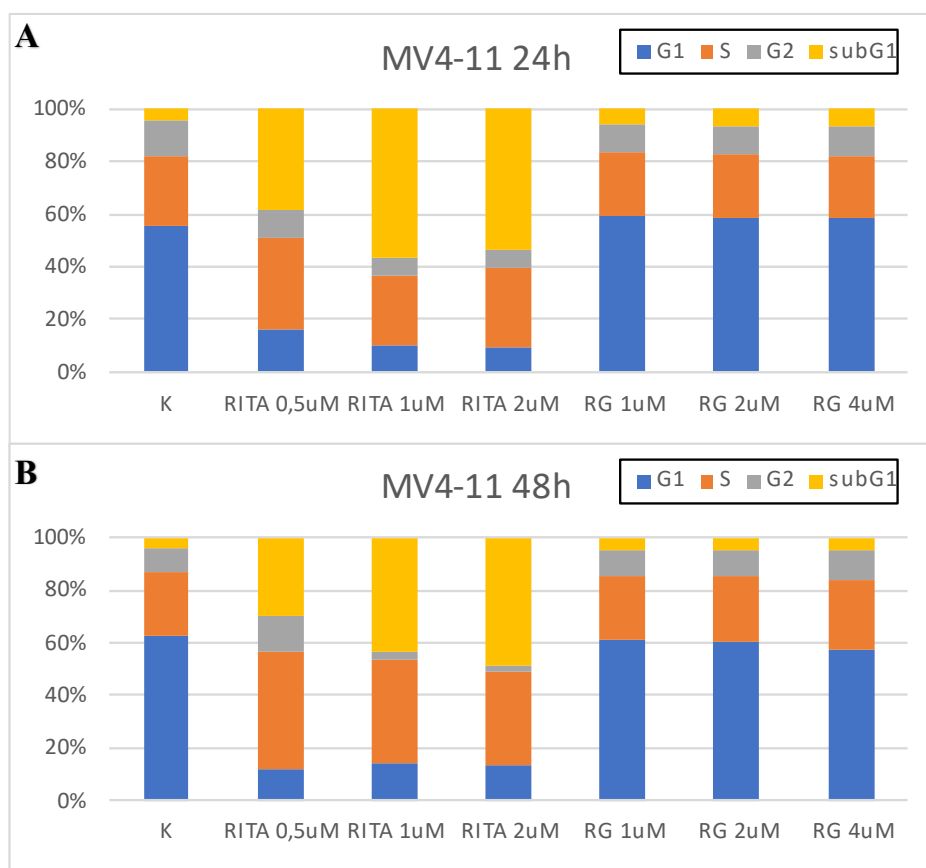
Pomocí průtokového cytometru jsme změřili zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu u AML linií (MV4-11, MOLM-13) po ošetření inhibitory RG7112 (1 μ M, 2 μ M, 4 μ M) a RITA (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M) v časovém intervalu 24 hod a 48 hod (obrázky 22 a 23). SubG1 fáze ukazuje procento apoptotických buněk, pro které je charakteristické snížené množství DNA, morfologické změny a jaderná kondenzace (Plesca et al. 2008). Jako kontrola byly použity buňky neošetřené inhibitory, které byly kultivovány stejnou dobu jako opůsobené buňky.

U buněčné linie MOLM-13 (obrázek 22) je se zvyšující se koncentrací RG7112 po 24 hod pozorováno vyšší procento apoptotických buněk (přibližně 30-60 %), (obrázek 22, A). Po 48 hod se u RG7112 zvyšuje množství apoptotických buněk a tento efekt narůstá se zvyšující se koncentrací inhibitoru (obrázek 22, B). Zvyšuje se také frakce buněk nacházejících se v S-fázi, což obvykle znamená spuštění opravných mechanismů před případným přechodem k buněčnému dělení. Oproti tomu po ošetření RITA (24 hod) vykazují buňky linie MOLM-13 ve srovnání s kontrolou pouze o jednotky procent více apoptotických buněk. V časovém intervalu 24 hod pozorujeme vyšší procento buněk v G2/M fázi, po 48 hod se zvyšuje zastoupení buněk v S fázi. To svědčí pro postupnou zástavu buněčného cyklu v přechodu mezi S a G2 fázi (obrázek 22, B). Změny opět korelují s výsledky měření proliferace a viability, tedy vlivem RITA je snížená proliferace v důsledku zástavy buněčného cyklu a spuštění opravných mechanismů, zatímco po ošetření RG7112 již je patrný i značný pokles viability.



Obrázek 22 - Fáze buněčného cyklu (G1, S, G2, subG1) linie MOLM-13 měřené průtokovým cytometrem. Buňky byly ošetřeny inhibitory RITA (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M) a RG7112 (1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, označeno RG) po dobu 24 hod (A) a 48 hod (B). Kontrola představuje vzorek neošetřený inhibitory (K).

U buněčné linie MV4-11 (obrázek 23) po ošetření RITA nacházíme vysoké procento buněk v subG1 fázi v podstatě ve všech vzorcích, společně s vysokým zastoupením živých buněk v S-fázi. Se zvyšující se koncentrací RITA pak pozorujeme také dramatické snížení frakce buněk v G2/M fázi, což dále potvrzuje vysokou toxicitu RITA pro tuto buněčnou linii. Naopak buňky MV4-11 ošetřené RG7112 vykazují jen malé změny oproti kontrole, včetně procenta apoptotických buněk v obou sledovaných časových bodech.



Obrázek 23 – Fáze buněčného cyklu (G1, S, G2, subG1) linie MV4-11 po ošetření inhibitory RITA a RG7112 (RG) o různých koncentracích po dobu 24 (A) a 48 hod (B). Výstup byl získán měřením průtokového cytometru. Použité koncentrace inhibitorů byly 0,5 μ M, 1 μ M nebo 2 μ M pro RITA a 1 μ M, 2 μ M nebo 4 μ M pro RG7112. Jako kontrola byl využit vzorek buněk neošetřený inhibitory (K).

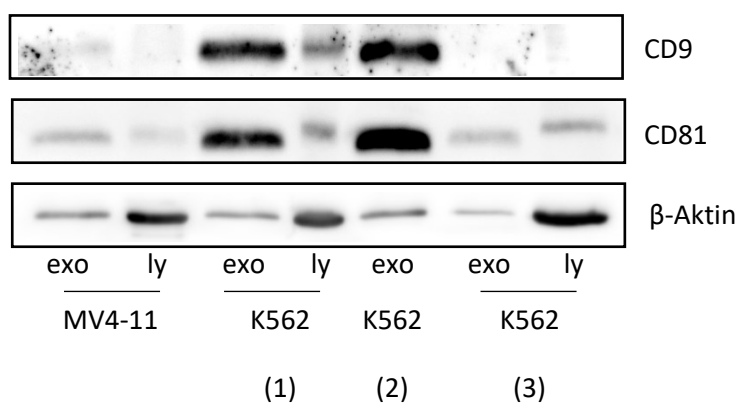
5.2 Vyšetření exosomových markerů a typu interakce exosomů s cílovými buňkami

Druhou částí diplomové práce je analýza exosomů produkovaných AML buňkami a jejich interakce s cílovými buňkami. Využili jsme přechodných zkušeností s buněčnou linií K562 pocházející od pacienta s CML (Hrdinova et al. 2021; Březinová 2022) a aplikovali jsme stejný postup izolace exosomů na náš panel AML linií a buňky AML pacientů, s mírnými úpravami průběhu kultivace optimalizovanými pro AML buňky.

5.2.1 Detekce exosomových markerů a proteinů v exosomových lyzátech a jejich mateřských buňkách

Pro ověření správnosti metody jsme pro izolaci exosomů nejprve použili již známý model linie K562, posléze jsme stejný postup aplikovali na linii MV4-11. V souladu s postupem prezentovaným v práci Hrdinova et al. (Hrdinova et al. 2021), jsme vytvořili lyzáty z izolovaných exosomů, ve kterém jsme prostřednictvím elektroforézy a western blotu

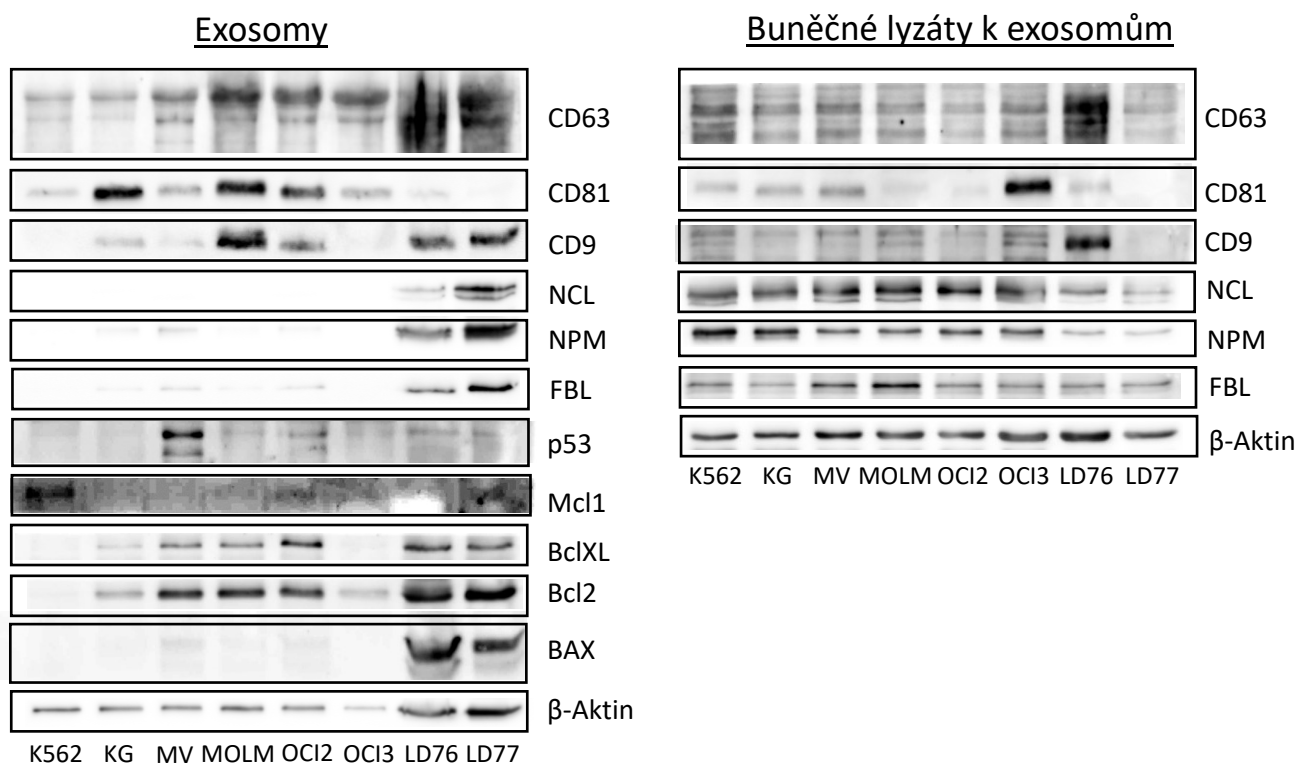
analyzovali hladinu specifických markerů. Stejným způsobem jsme vyšetřili také lyzát z mateřských buněk. Pro zjištění relativní koncentrace vzorků byla také vždy vyšetřována hladina β -Aktinu. Výsledky western blot analýzy jsou znázorněny na obrázku 24. Transmembránový tetraspaninový protein CD9 je detekovaný téměř výhradně v exosomech, ve vzorcích MV4-11, a vzorcích K562 různých biologických opakováních (K562 (1) a K562 (2)). Dalším exosomovým markerem je CD81, opět z rodiny tetraspaninů, který rovněž nacházíme podstatně koncentrovanější v exosomových lyzátech než v celobuněčných lyzátech. Oba markery detekujeme ve vyšší míře v exosomech pocházejících z linie K562. Hladina interního standardu β -Aktinu je podle očekávání mnohem vyšší v celobuněčných lyzátech než v lyzátech exosomů, avšak pro využití jako interního standardu je jeho množství ve všech vzorcích dostačující.



Obrázek 24 - Western blot exosomových vzorků (exo) a jejich mateřských buněčných lyzátů (ly) z leukemických linií (MV4-11 a K562). Byly vyšetřeny hladiny proteinů CD9 a CD81, hladina β -Aktinu slouží jako kontrola nanášky.

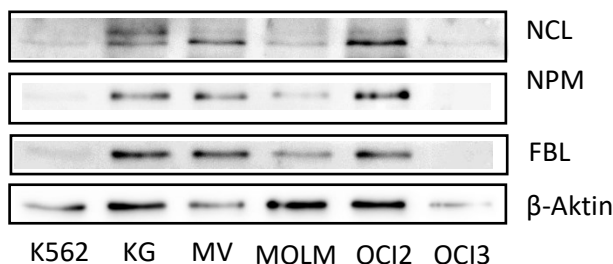
V další sadě experimentů byly izolovány exosomy z linie K562 a z 5 studovaných AML linií (KG-1, MV4-11, MOLM-13, OCI-AML2, OCI-AML3), a také ze dvou patientských vzorků (označených jako LD76 a LD77). Výsledky jejich proteomické analýzy jsou znázorněny na obrázcích 25 a 26. Hladina exosomových markerů CD9, CD81 a CD63 se mezi exosomy z různých linií liší, nejvyšší hladina CD81 je pozorována u exosomů pocházejících z KG-1, MOLM-13, OCI-AML2 a naopak nejnižší hladina u leukodeplecí LD76 a LD77. Množství CD9 znaku je opět nejvyšší u exosomů z MOLM-13, OCI-AML2, a také LD76 a LD77, naopak velmi nízká je hladina tohoto znaku u K562 a OCI-AML3. Marker CD63 je pozorován ve všech exosomových vzorcích, avšak s různou intenzitou. V celobuněčných lyzátech vytvořených z peletu buněk použitých pro izolaci exosomů jsou exosomové markery pozorovány snížené, případně vůbec nejsou přítomny (výjimkou je CD9 u LD76 a CD81 u OCI-AML3). Kromě

exosomových markerů jsme v této sadě vzorků vyšetřovali také hladiny některých proteinů, které jsme v přechodí kapitole identifikovali jako důležité z hlediska účinku RG7112 nebo RITA. Přítomnost těchto proteinů v exosomech by totiž mohla signalizovat jejich zapojení v ovlivnění reakce cílových buněk na ošetření léčiv. V různé míře detekujeme jadéřkové proteiny NCL, NPM a fibrilarin (FBL), stejně jako většinu s apoptózou souvisejících proteinů, tj. p53, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL a Bax. Zajímavé je, že téměř všechny jadéřkové proteiny jsou více detekovány u exosomů z primárních vzorků než z linií, přestože jejich relativní exprese v buňkách je v porovnání s liniemi často spíše nižší. Tato skutečnost je blíže zkoumána v následující kapitole (5.2.2.).



Obrázek 25 – Western blot analýza exosomových markerů (CD63, CD81 a CD9) a jadéřkových proteinů (NCL, NPM, FBL) v exosomových vzorcích a jejich buněčných lyzátech. V exosomových vzorcích byla dále testována hladina tumor-supresorového p53, antiapoptotických proteinů (Mcl-1, Bcl-2 a Bcl-xL) a proapoptotického proteinu Bax. V tomto experimentu byly využity vzorky: CML linie (K562), AML linií (KG-1 (KG), MV4-11 (MV), MOLM-13 (MOLM), OCI-AML2 (OCI2), OCI-AML3 (OCI3)) a primární AML buňky (LD76 a LD77). Hladiny β-Aktinu slouží jako interní kontrola.

Bloty z exosomových lyzátů bez deplecí



Obrázek 26 - Western blot analýza exosomových lyzátů (K562, KG-1 (KG), MV4-11 (MV), MOLM-13 (MOLM), OCI-AML2 (OCI2), OCI-AML3 (OCI3)) bez vzorků leukodeplecí.

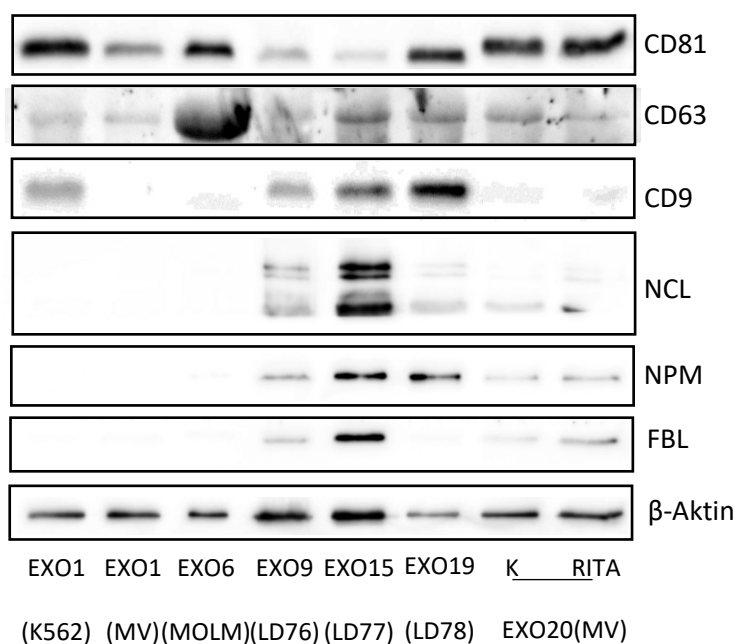
5.2.2 Exosomy z buněk ošetřených RG7112 nebo RITA

Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, exosomové lyzáty z primárních buněk obsahují vyšší množství proteinů souvisejících s apoptózou i jadérekových proteinů. Jedním z možných vysvětlení je, že primární buňky během kultivace odumírají ve větší míře než buňky linií a mohou tedy do exosomů uvolňovat více těchto proteinů, případně uvolňují ještě další malé útvary, například apoptotická tělíška, které se mohou ve výsledném izolátu vyskytovat. Ve třetí sadě analýz jsme použili některé původní vzorky exosomových lyzátů (K562, MV-EXO1, LD76 a LD77), které jsme porovnali s dalšími vzorky získanými z linie MOLM-13 a patientského vzorku LD78 a dvojicí vzorků izolovaných z linie MV4-11: z intaktních buněk a buněk ošetřených 2 μ M RITA, pro navození stavu vzorku podobného primární kultuře (z hlediska buněčné viability). Účinek RITA na AML linii MV4-11 byl popsán výše (prostřednictvím růstové křivky, transkripce, proteinových hladin, buněčného cyklu, viz kapitoly 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 a 5.1.4).

Western blot analýza této sady vzorků je zobrazena na obrázku 27. Exosomy z primárních buněk (LD78) obsahují vysokou koncentraci exosomového markeru CD81 i další markery CD63, CD9 (nejvyšší množství ze všech), naopak z jadérekových proteinů v tomto vzorku nacházíme vyšší množství pouze NPM. Nicméně exosomy z linie MV4-11 (EXO20) po ošetření RITA skutečně obsahují zvýšené množství jadérekových proteinů (NPM, NCL, FBL) relativně k β -Aktinu a ve srovnání s kontrolou.

I v této sadě vzorků je vidět, že se exosomové lyzáty z různých buněčných leukemických linií a primárních AML buněk liší v hladinách exosomových markerů CD81, CD9, CD63. Množství exosomových markerů, zejména CD81, se liší i mezi exosomy z téže linie (viz např EXO1 a kontrolní vzorek EXO20 z linie MV4-11).

Exosomové lyzáty



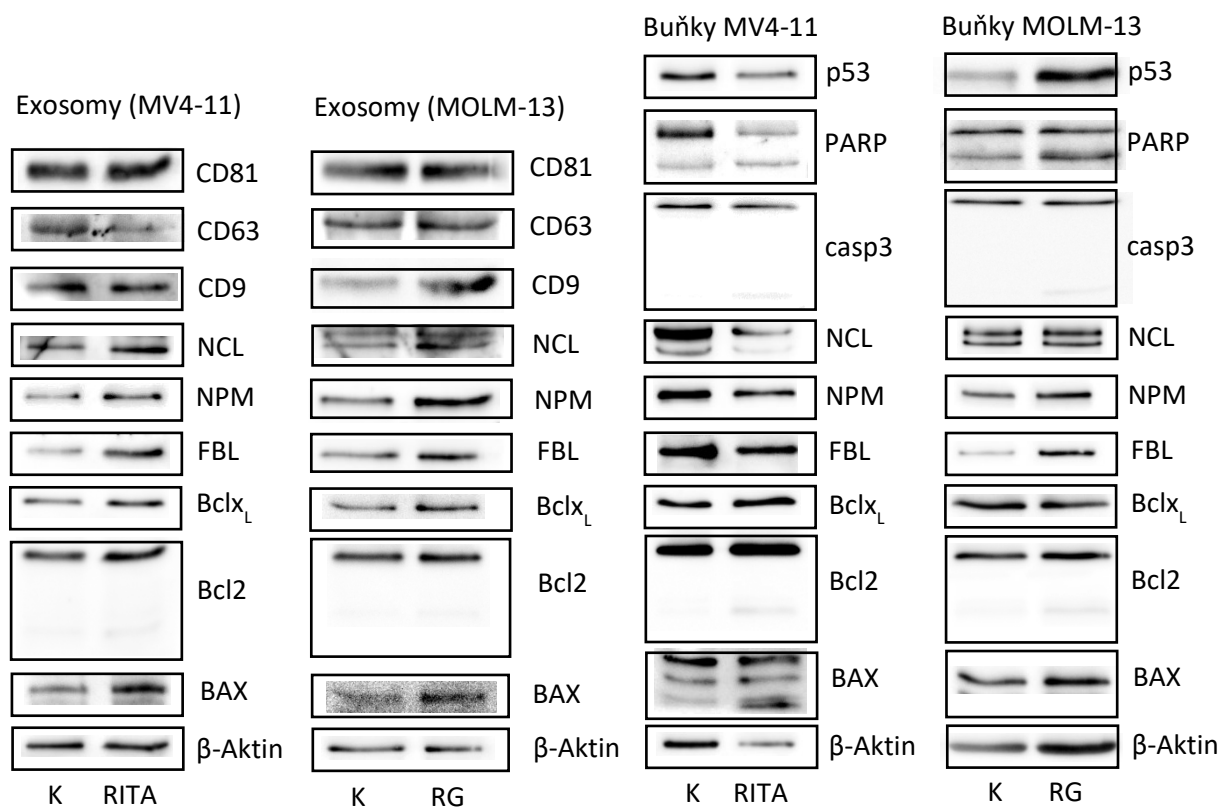
Obrázek 27 – Western blot exosomových frakcí z leukemických linií (K562 (EXO1-K562), MV4-11 (EXO1-MV), MOLM-13 (EXO6-MOLM), primárních buněk (LD76, LD77, LD78) a linie MV4-11 po ošetření 2 μ M RITA (EXO20(MV)-RITA) a kontrolního vzorku (EXO20(MV)-K). Byla vyšetřena hladina exosomových markerů (CD81, CD63, CD9) a jadérekových proteinů (NCL, NPM, FBL) relativně vůči β -Aktinu.

Abychom detailněji otestovali hypotézu, že exosomy z apoptotických buněk obsahují vyšší množství jadérekových proteinů, byla k již existující dvojici exosomů z linie MV4-11 podobně vytvořena dvojice exosomových lyzátů z linie MOLM-13. Vzorek představující zdroj apoptotických buněk byl v tomto případě ošetřen 1 μ M RG7112, o němž jsme dříve ukázali, že vyvolává v této buněčné linii apoptózu. Všechny vzorky byly vyšetřeny na přítomnost znaků CD81, CD63, CD9, jadérekových proteinů NCL, NPM, FBL a anti-/proapoptotických proteinů Bcl-xL, Bcl-2 a Bax (obrázek 28). Podobně byly analyzovány i příslušné celobuněčné lyzáty, u nichž byla navíc testována míra apoptózy pomocí fragmentace PARP a aktivace kaspázy 3 a hladina p53.

Množství CD znaků v exosomových lyzátech se tentokrát neliší nijak výrazně, ve všech vzorcích nacházíme dostatečnou hladinu těchto markerů, abychom dokázali, že vzorek skutečně obsahuje exosomy. V exosomových lyzátech z obou apoptotických vzorků je opět pozorován zvýšený obsah jadérekových proteinů (NCL, NPM, FBL) ve srovnání s kontrolou, mírně jsou zvýšeny také hladiny proapoptotického proteinu Bax a antiapoptotického Bcl-xL.

Štěpený fragment Bcl-2 je v malé míře vidět i v exosomovém lyzátu. Z této analýzy vyplývá, že pokud vzorek obsahuje vysoké procento apoptotických buněk, můžeme v uvolněných exosomech detekovat proteiny související s apoptózou a také jadéřkové proteiny.

Buněčné lyzáty obsahují štěpený PARP a mírně štěpenou kaspázu 3 na důkaz apoptózy v ošetřených buňkách, v kontrole je PARP štěpený méně. V obou ošetřených vzorcích se také objevuje apoptotický fragment Bcl-2. Změny v jadéřkových proteinech nejsou na rozdíl od exosomových vzorků nijak systematické, pro NCL v linii MV4-11 pozorujeme mírné snížení hladiny, zvýšení naopak detekujeme u FBL v linii MOLM-13, ale pro potvrzení těchto trendů by byl potřeba větší soubor vzorků.



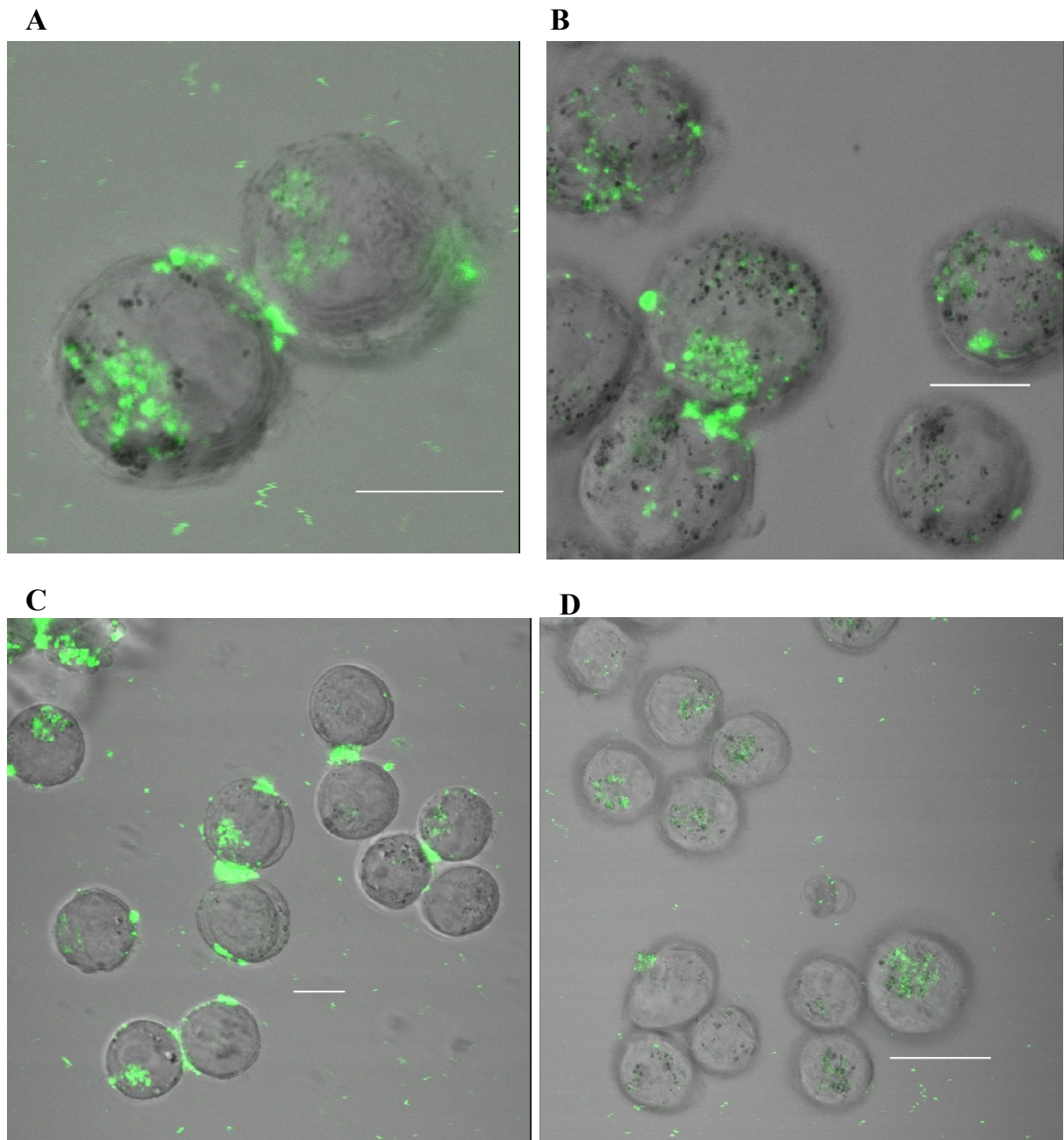
Obrázek 28 - Western blot analýza exosomových lyzátů z buněk (MOLM-13, MV4-11) po ošetření inhibitory (RG7112 (RG), RITA) a kontrolní vzorek (bez ošetření, označen K). Dále je zobrazena analýza buněčných lyzátů (ošetřené inhibitory, kontrolní (K)), z kterých byly tyto exosomové vzorky získány. Všechny vzorky byly vyšetřeny na přítomnost CD značek, jadéřkových proteinů, antiapoptotických proteinů a proapoptotického proteinu. U buněčných lyzátů byla navíc zjišťována míra apoptózy (kaspáza 3, PARP) a hladina proteinu p53.

5.2.3 Typy interakce exosomů s buněčnou membránou

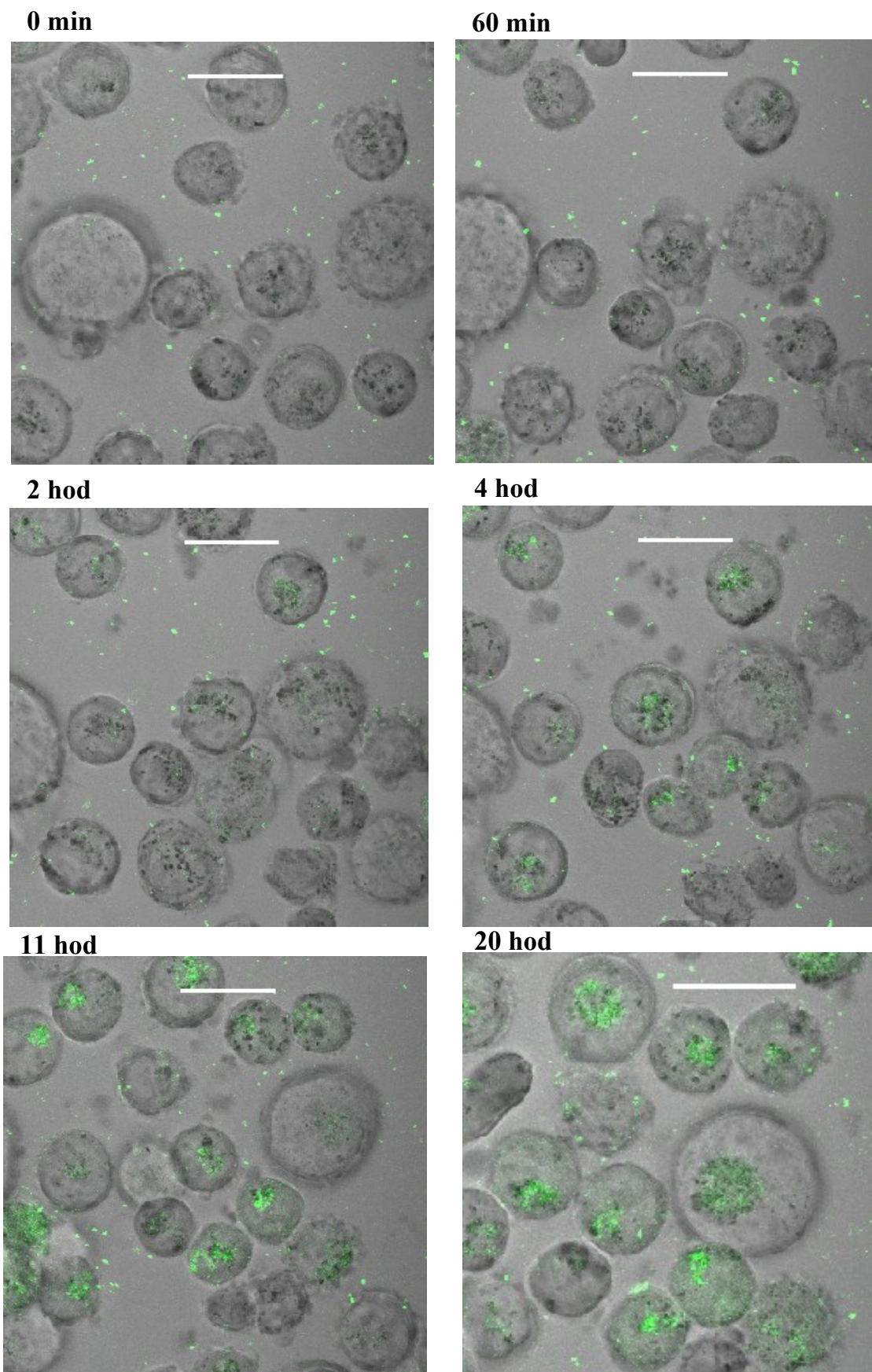
Současně s částí určenou k přípravě lyzátu byla druhá část exosomů izolovaných z linie K562 a z panelu AML linií použita k lokalizačním experimentům. Tato část vzorku byla z peletu resuspendována v PBS, obarvena barvivem CFSE a koinkubována s buňkami

vybraných linií. Způsoby interakce exosomů s buněčnou membránou byly pozorovány prostřednictvím konfokálního mikroskopu.

Prvně byly vyizolovány exosomy z CML linie (K562) pro opakování pokusu z publikace (Hrdinova et al. 2021), aby byly ověřeny naše podmínky pro správnou izolaci exosomů, případně byla možnost optimalizace této metody pro již ověřenou internalizaci exosomů z K562 linie do mateřských buněk. Tento experiment byl proveden ve 4 biologických opakováních. Protože sterilizace ultracentrifugačních zkumavek je téměř neproveditelná, výsledná suspenze obarvených exosomů není sterilní. Pro koinkubaci s buňkami je tedy třeba suspenzi přefiltrovat, abychom se zbavili případné kontaminace. Porovnání vzorků, k nimž byla přidána buď suspenze s exosomy bez filtrace (obrázek 29 A, B, C) nebo po přefiltrování (obrázek 29 D) navíc ukázalo, že v nefiltrované suspenzi se exosomy vyskytují ve velkých shlucích, které nespecificky adherují na povrch buněk (zejména v jejich kontaktech) a jejich fluorescence je intenzivnější než signál internalizovaných exosomů v buňce. Filtrace je tedy důležitá i z toho důvodu, že průchodem přes filtr se exosomová suspenze homogenizuje. Optimalizace spočívala především v testování vhodných filtrů pro filtraci a různých pořadí filtrace, objemů přidaného média a ředění výsledné exosomové suspenze. Ve všech vzorcích byla potvrzena internalizace exosomů do buněk linie K562, výskyt exosomů v mezibuněčném prostoru se výrazně omezil filtrací. V buňkách se exosomy koncentrují v oblasti kolem organizačního centra mikrotubulů (MTOC). Průběh internalizace exosomů byl dále snímán v intervalech po 30 min (obrázek 30), internalizované exosomy jsme obvykle schopni detekovat po 90 min, časová závislost subcelulární lokalizace ale žádná detekována nebyla. V některých biologických opakováních internalizace trvala delší čas (i 5 hodin) a rovněž intenzita měřené fluorescence se pro jednotlivé vzorky lišila. Po 24 hod inkubaci byly exosomy vždy bezpečně pozorovány uvnitř buněk linie K562.

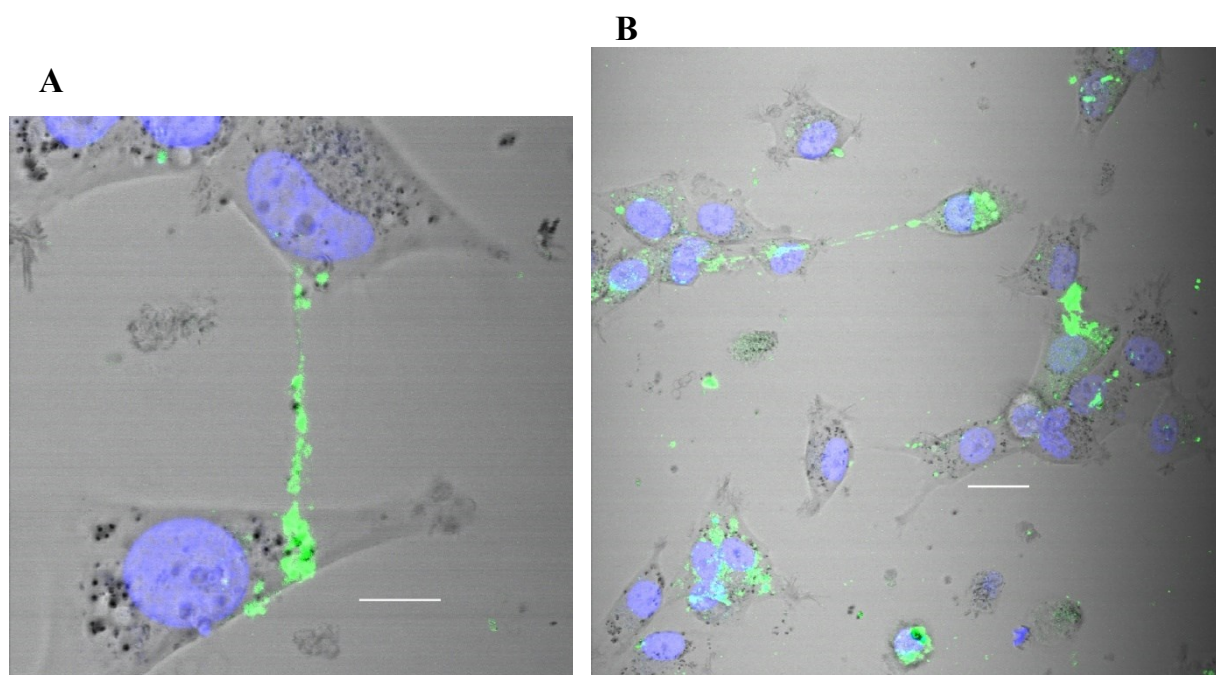


Obrázek 29 - Nepřefiltrované exosomy (obarvené CFSE, zelená) z K562 koinkubované po dobu 20 hod s K562 buňkami, internalizují do buněk, ale také tvoří větší shluky v jejich kontaktech, měřítko 10 μm (A, B, C). Na obrázku D jsou znázorněny přefiltrované exosomy (obarvené CFSE) z K562 a následně po dobu 20 hod inkubovány s buňkami K562, netvoří velké shluky a jsou buňkami internalizovány, měřítko 20 μm .

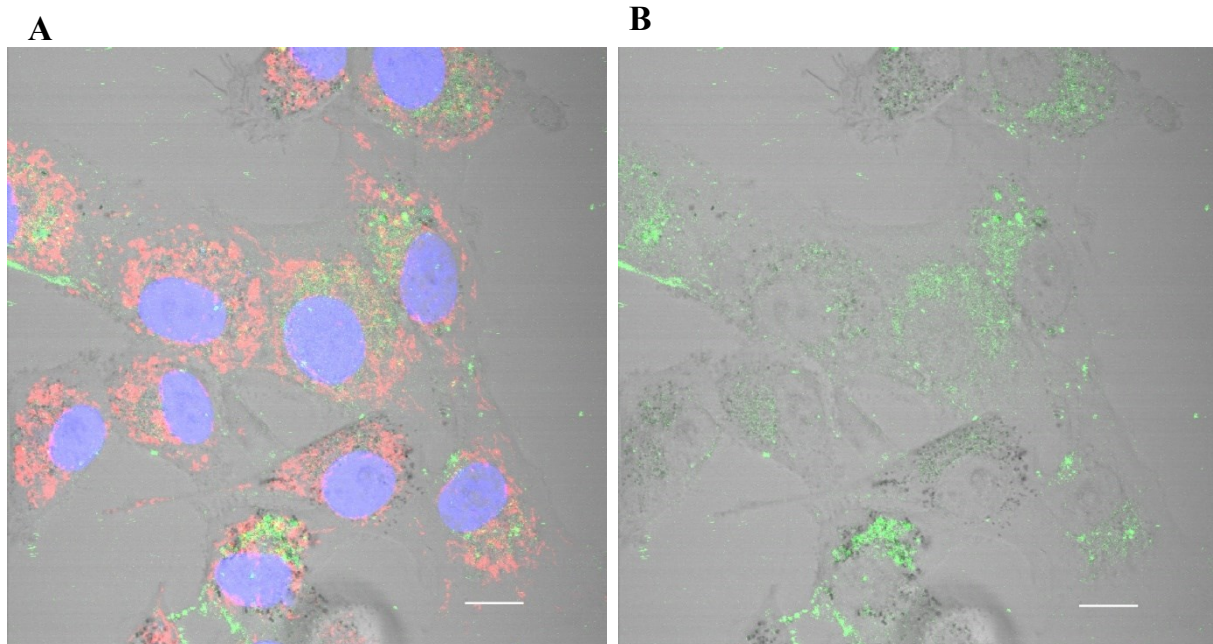


Obrázek 30 – Exosomy (obarvené CFSE, zelená) z K562 byly inkubovány s buňkami téže linie a sledovány v časovém intervalu 30 min (na obrázku znázorněny časové úseky 0 min, 60 min, 2 hod, 4 hod, 11 hod, 20 hod), po 60 min se exosomy začínají objevovat v buňkách a po 4 hod jsou s vyšší intenzitou pozorovány ve všech buňkách, měřítko 20 μm . Poslední obrázek znázorňuje internalizaci po 20 hod, měřítko 10 μm .

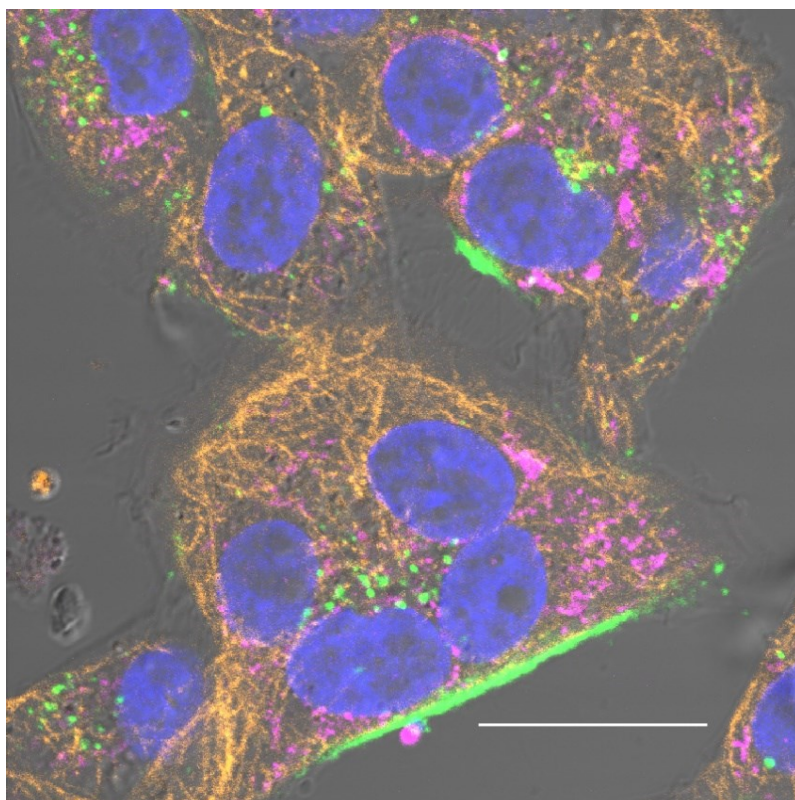
Abychom lépe charakterizovali chování exosomů při vstupu do buněk, byly exosomy z linie K562 alternativně inkubovány s fibroblasty (buněčná linie HS-5), tentokrát provedeno ve 3 biologických opakováních. I při této inkubaci došlo k internalizaci exosomů (obrázek 31). Exosomy nejčastěji tvoří ostrůvky v cytoplazmě mezi jádrem a buněčnou membránou, jsou pozorovány i ve výběžcích buněk, z vnější strany buněčné membrány či je pozorován možný přenos exosomů mezi buňkami. Pro lepší vizualizaci lokalizace exosomů v živých buňkách byly buněčné organely některých vzorků fluorescenčně obarveny (obrázek 31, 32), jádro barvivem Hoechst33342, mitochondrie sondou MitoTracker Red. Některé vzorky buněk kokultivovaných s fluorescenčně značenými exosomy byly fixovány a buněčné organely byly dobarveny specifickými protilátkami (obrázky 33 a 34). Pro vizualizaci mitochondrií byly použity mitochondriální protein COX IV či cytochrom c, mikrotubuly byly označeny protilátkou proti 14-3-3 a plazmatická membrána protilátkou proti povrchovému proteinu Talin.



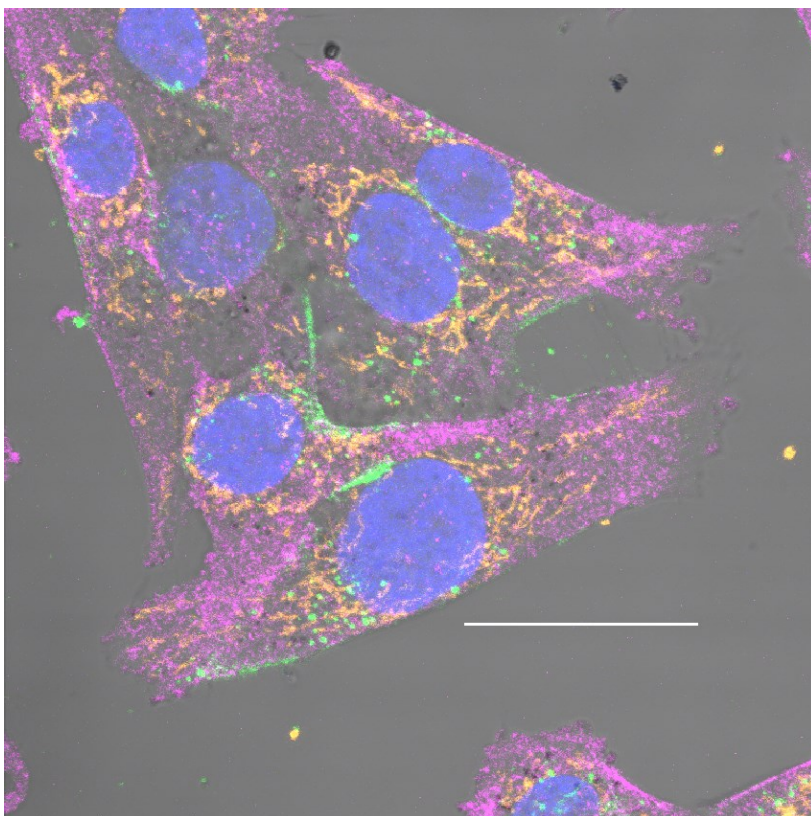
Obrázek 31 – EXO4 Obarvené exosomy (CFSE, zelená) z K562 linie koinkubovány po dobu 20 hod s HS-5 buňkami. Je pozorována možná komunikace buněk prostřednictvím exosomů (A, měřítko 10 μ m), či internalizace exosomů v HS-5 buňkách (B, měřítko 20 μ m). Jádra jsou dobarvena barvivem Hoechst33342 (modrá).



Obrázek 32 - EXO14 Obarvené exosomy (CFSE) z K562 linie inkubované 20 hod s HS-5 linií (A, B), jsou pozorovány charakteristické ostrůvky exosomů mezi jádrem (Hoechst33342, modře) a membránou, mitochondrie jsou vizualizovány červeně (barvivo MitoTracker Red), měřítko 10 μm (A, B). Vpravo (B) je pouze signál z exosomů.



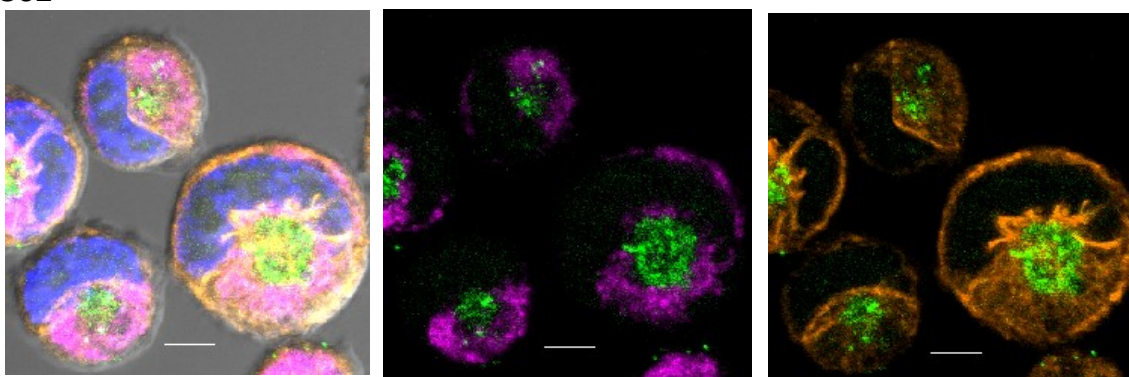
Obrázek 33 - EXO17 Buňky (linie HS-5) byly koinkubované s exosomy (značenými zeleně, barvivo CFSE) z K562 linie, pak fixované a dále obarvené: jádro (modře, Hoechst33342), mitochondrie (magenta, COX IV) a mikrotubuly (oranžově, 14-3-3), měřítko 20 μm .



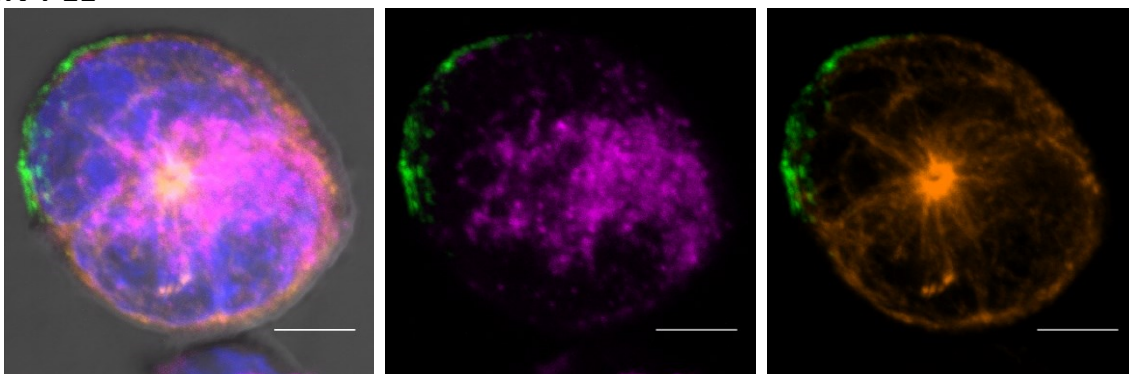
Obrázek 34 - EXO17 Buňky (linie HS-5) byly koinkubované s exosomy (značenými zeleně, barvivo CFSE) z K562 linie, následně byly buňky fixované a dále obarvené pro vizualizaci jádra (modrá, Hoechst33342), mitochondrií (oranžová, cytochrom c) a membránových struktur (magenta, Talin), měřítko 20 μm .

Exosomy z K562 linie byly dále koinkubovány také s AML liniemi (MOLM-13 a MV4-11), ale v tomto případě jsme internalizaci exosomů do buněk nepozorovali, exosomy byly nalezeny přichycené z vnější strany cytoplazmatické membrány jen v malých oblastech. Pro lepší vizualizaci a porovnání s internalizací do linie K562 byly vzorky zfixovány a jejich buněčné orgány obarveny specifickými protilátkami pro vizualizaci mikrotubul (protein 14-3-3) a mitochondrií (mitochondriální protein COX IV) (obrázek 35). Vzhledem ke způsobu přípravy fixovaného vzorku, tedy centrifugace a promytí buněčné suspenze, lze předpokládat, že exosomy nespecificky interagující s buňkami se při tomto procesu odmyjí. Pozitivní signál od exosomů na buněčné membráně ve fixovaném vzorku tedy naznačuje, že kontakt mezi exosomem a buňkou je pravděpodobně specifický a tedy pevný.

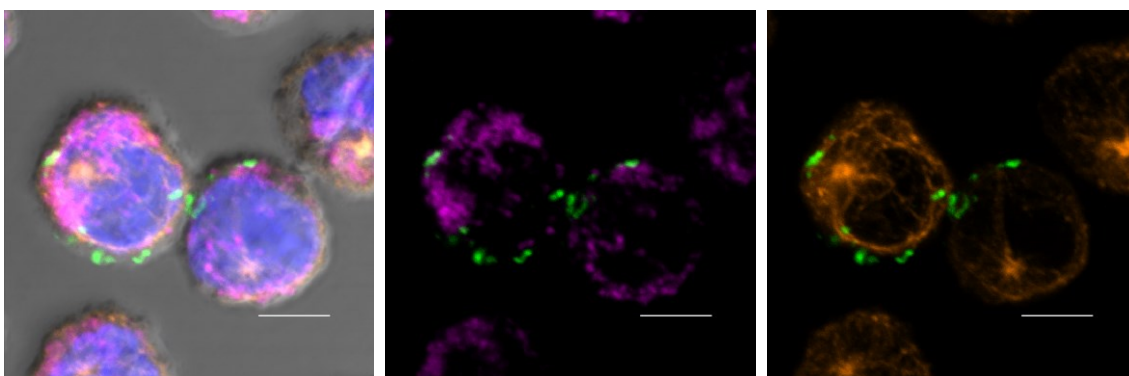
K562



MV4-11

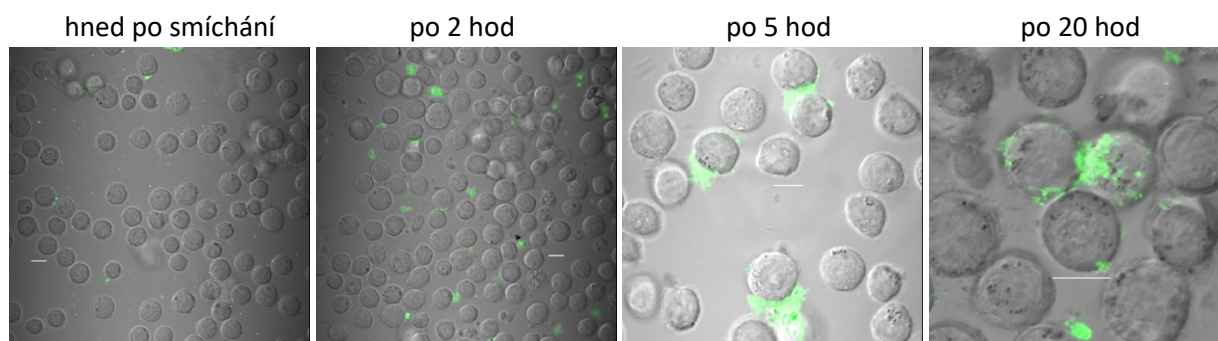


MOLM-13

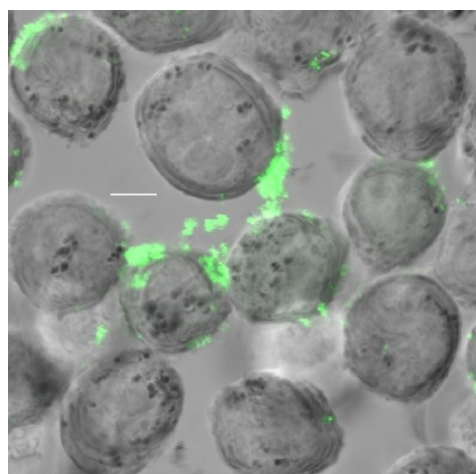


Obrázek 35 - EXO17 Zfixovaný vzorek, obarvené exosomy (zeleně, CFSE) koinkubovány a internalizovány do své zdrojové linie (K562), koinkubovány a pozorovány přísedlé (MOLM-13 a MV4-11). Jádra jsou obarvena modře (Hoechst33342). Buňky byly po inkubaci s exosomy zfixovány a obarveny specifickými protilátkami pro mitochondriální protein COX IV (magenta) a mikrotubuly 14-3-3 (oranžově), na obrázku lze vidět všechny kanály, případně jen mitochondrie a exosomy, či mikrotubuly s exosomy, měřítko 5 μm .

V dalším biologickém opakování (obrázek 36) byl pozorován aktivní kontakt exosomů z K562 s buněčnou membránou linie MOLM-13 snímány v různých časových intervalech (2 hod, 5 hod a 20 hod). Tento kontakt přetrval i poté, co byl vzorek po 20 hod inkubaci stočen na 5 min/500g a resuspendován v PBS (obrázek 37).



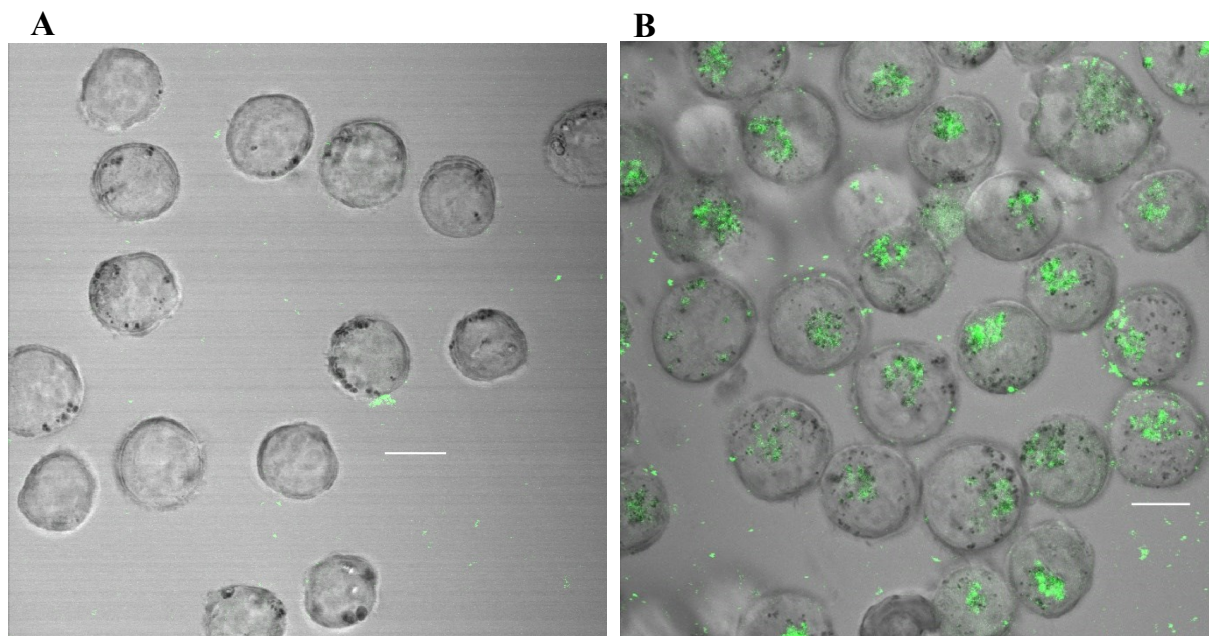
Obrázek 36 – EXO2 Exosomy (obarveny CFSE, zeleně) z K562 po inkubaci s MOLM-13, snímány byly jednotlivé časové intervaly a exosomy jsou pozorovány jako přisedlé, měřítko 10 μ m.



Obrázek 37 - EXO2 Obarvené exosomy (zeleně, CFSE) z K562 po 20 hod inkubaci s MOLM-13 a následném stočení 500g, 5 min a resuspendování v PBS, měřítko 5 μ m.

Překvapivě odlišné chování exosomů v prostředí buněk různých linií vyžaduje další experimenty, jejichž cílem je zjistit, zda typ interakce exosomů s buňkami souvisí s typem zdrojových buněk, ze kterých byly exosomy vyzolované, či s typem cílových buněk, se kterými jsou exosomy koinkubované. Především experiment byl tedy zopakován pro exosomy z AML linie. Konkrétně byly izolovány exosomy z linie MOLM-13, které jsme koinkubovali s liniemi MOLM-13, K562 a HS-5 a také se vzorkem primárních AML buněk (LD78).

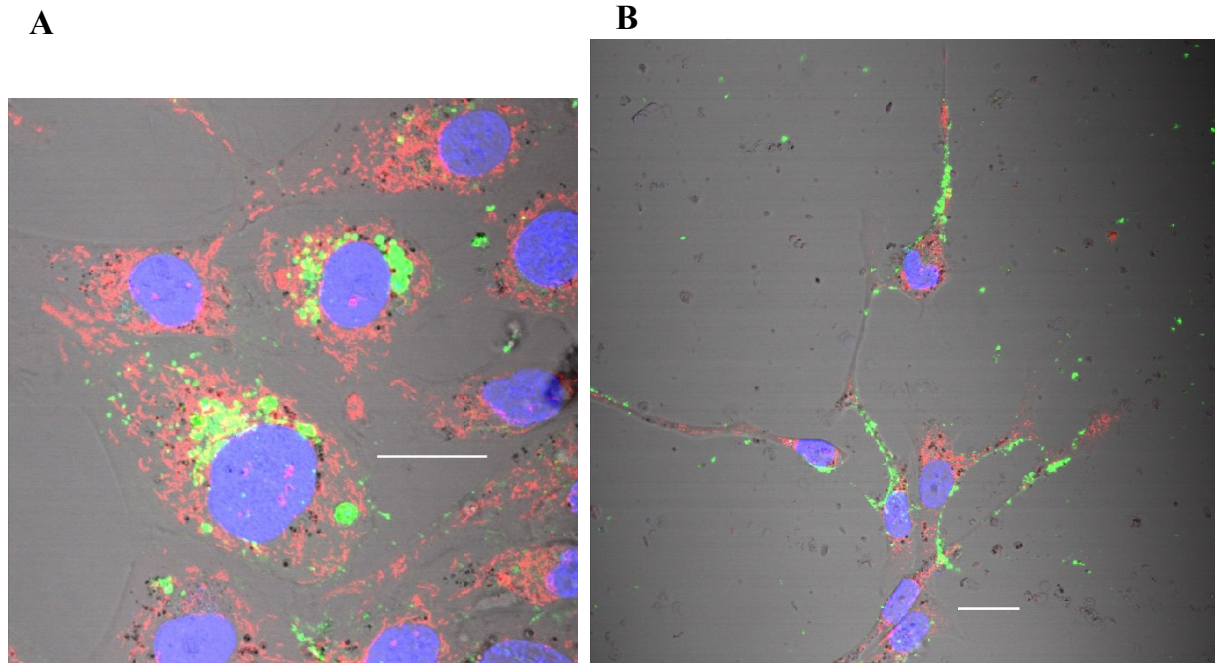
Obrázek 38A ukazuje, že exosomy z MOLM-13 neinternalizují do svých mateřských buněk. Obarvené exosomy se stejně jako exosomy z K562 na buňky přichytí zvenčí a tam pak dlouhodobě zůstávají. Buňky linie K562 naopak internalizují i tyto exosomy (obrázek 38B).



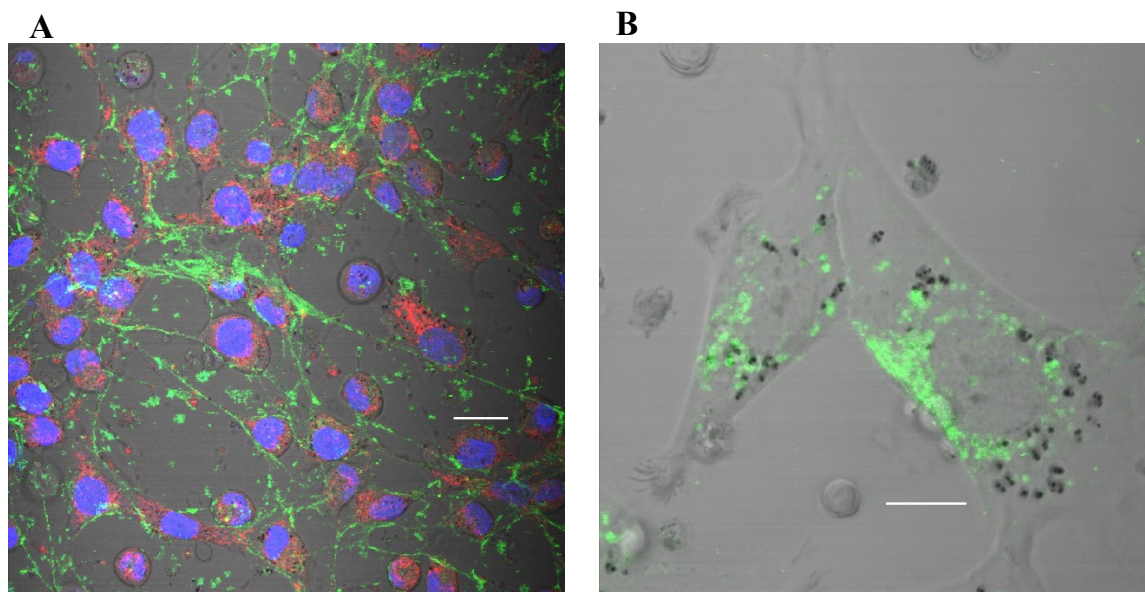
Obrázek 38 – EXO16 Exosomy (obarveny CFSE, zeleně) z MOLM-13 po 20 hod inkubaci s MOLM-13 jsou přichyceny zvenčí na buňkách (A), naopak do linie K562 jsou tyto exosomy internalizovány (B), měřítko 10 μ m.

Exosomy z MOLM-13, stejně jako ty z K562, internalizují do linie HS-5. Pro lepší vizualizaci a charakterizaci subcelulární lokalizace exosomů v těchto buňkách byly většinou vzorků dobarveny jádra a mitochondrie (obrázky 39, 40, 42, 43). Exosomy jsou nejčastěji pozorovány v cytoplazmě (obrázek 39A, 40B, 42, 43), objevují se opět v buněčných výběžcích (obrázek 39B, 40A, 43) v blízkosti cytoplazmatické membrány a někdy jsou také pozorovány přisedlé na membránách. U jednoho vzorku po 48 hod koinkubace exosomů s buňkami HS-5 mění tyto buňky svoji morfologii, zmenšují se a protahují své výběžky, a v těchto výběžcích jsou pozorovány obarvené mitochondrie a exosomy (obrázek 39B). Redistribuce těchto exosomů byla v HS-5 sledována také v různých časových intervalech 10 min, 45 min, 5:30 hod a 22 hod (obrázek 41), po 10 min jsou exosomy u některých buněk pozorovány u membrány, a po 45 min je možné je pozorovat internalizované, v čase 5:30 hod jsou exosomy pozorovány v buňkách ve shlucích. Exosomy z MOLM-13 byly také pozorovány při možné komunikaci s buňkami (obrázek 42). Pro podrobnější sledování lokalizace internalizovaných exosomů byly některé tyto vzorky zfixovány (obrázek 44) a označeny specifickou protilátkou 14-3-3

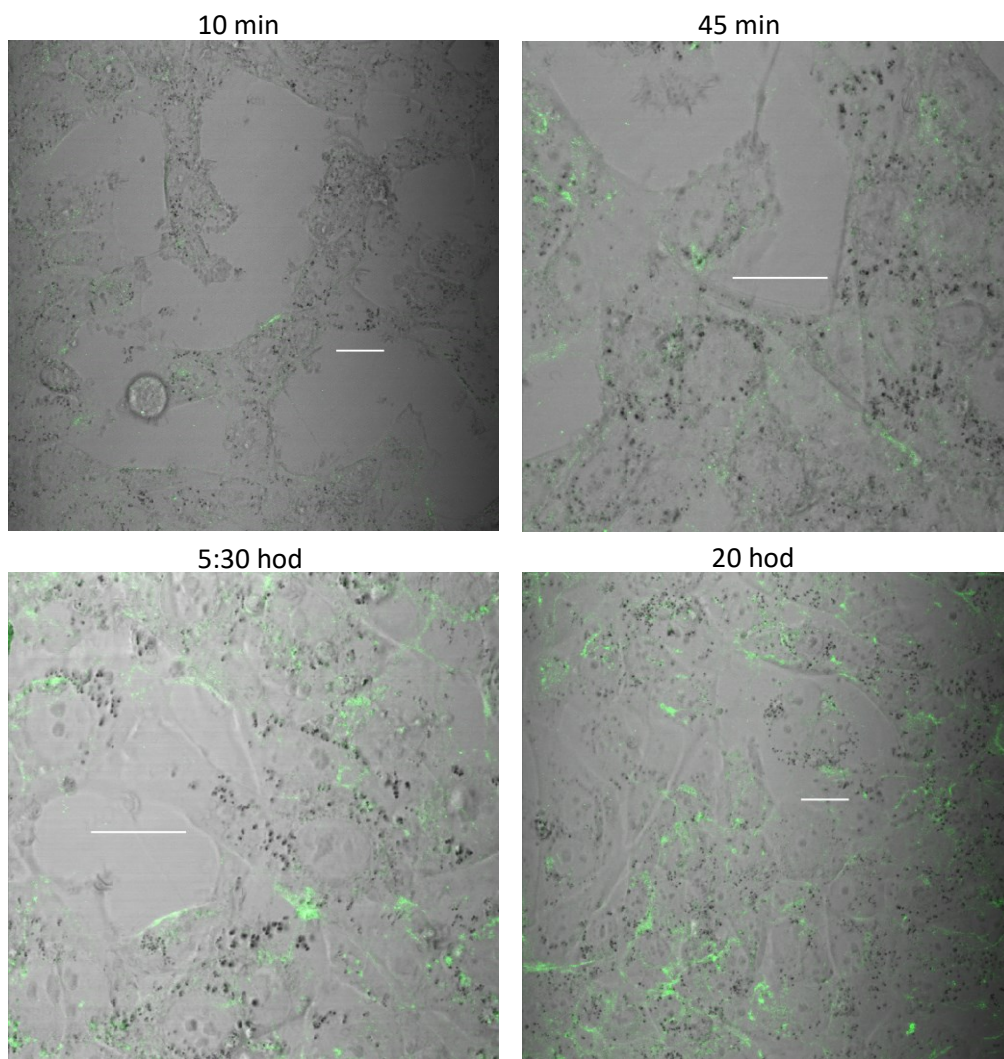
pro mikrotubuly. Opět byly exosomy pozorovány v cytoplazmě mezi jádrem a membránou či ve výběžcích. Tento experiment byl proveden ve 4 biologických opakováních.



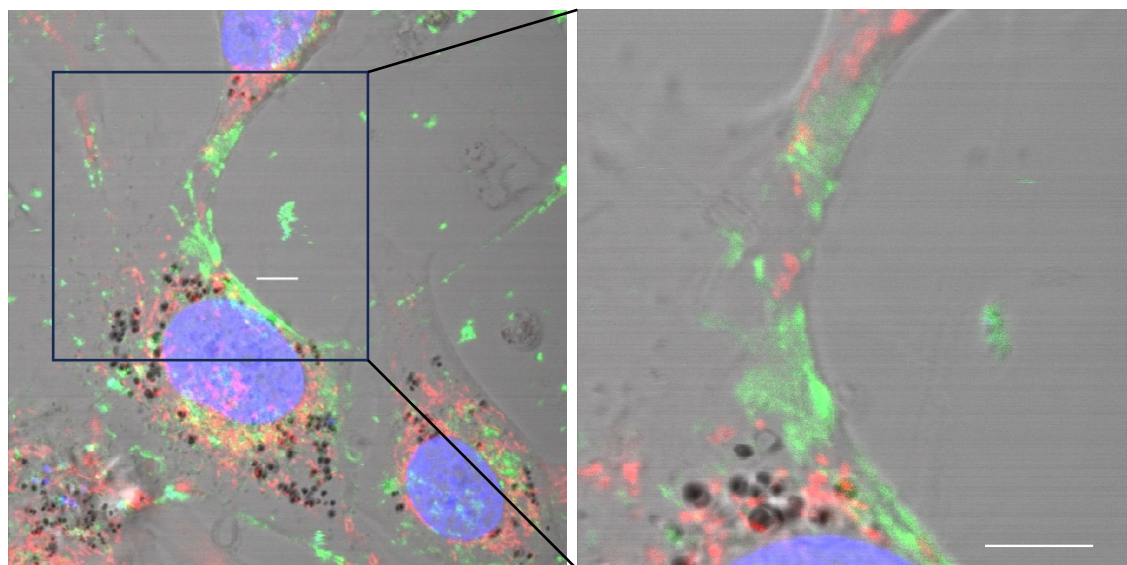
Obrázek 39 - EXO5 Exosomy (obarveny CFSE, zeleně) z MOLM-13 internalizují do HS-5 a jsou lokalizovány v oblasti cytoplazmy (A). Po delší koinkubaci HS-5 s exosomy z MOLM-13 mění buňky svoji morfologii, protahují své výběžky a jsou v nich lokalizovány exosomy a mitochondrie (B). Buněčná jádra obarvena modře (Hoechst33342) a mitochondrie červeně (MitoTracker Red), měřítko 20 μm .



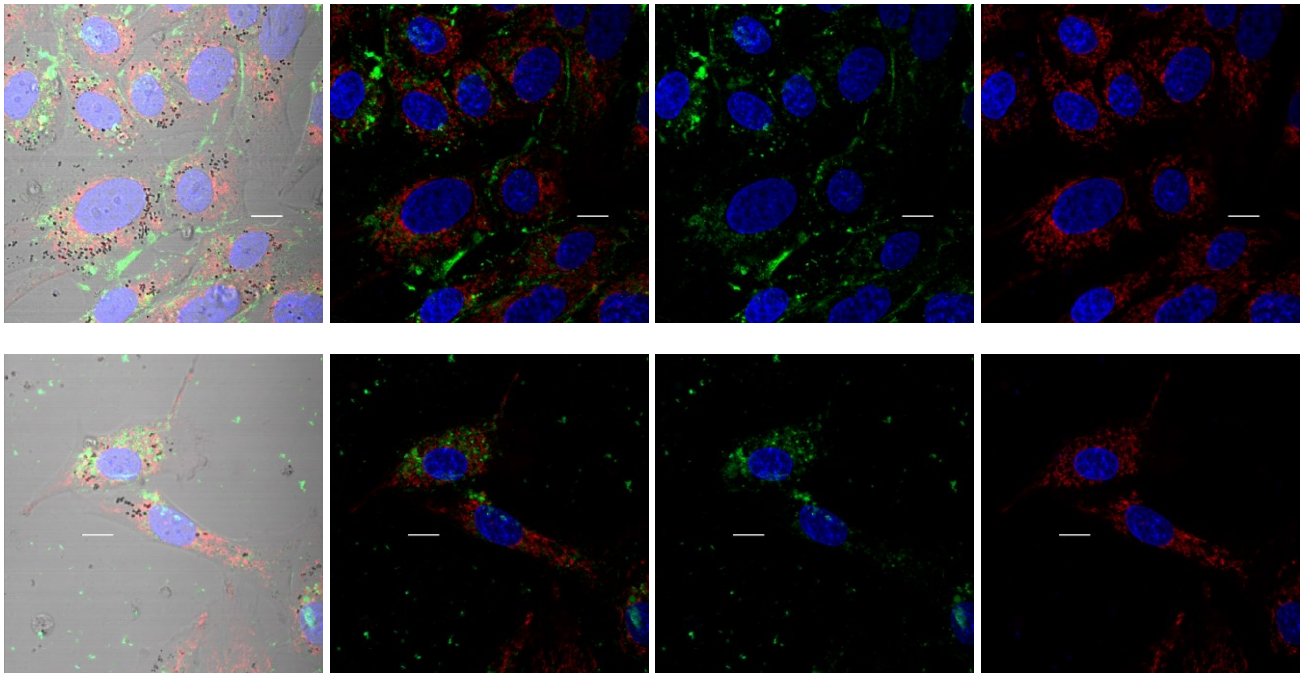
Obrázek 40 - EXO7 Exosomy (obarveny CFSE, zeleně) z MOLM-13 koinkubované s HS-5 po dobu 24 hod. Obarvené exosomy jsou pozorovány především v protruzích. Pro lepší představu o lokalizaci exosomů v buňkách byly obarveny jádra (modře, Hoechst33342) a mitochondrie (červeně, MitoTracker Red), měřítko 20 μm (A). V jiném vzorku téhož pokusu byly exosomy pozorovány spíše v okolí jádra (B, měřítko 10 μm).



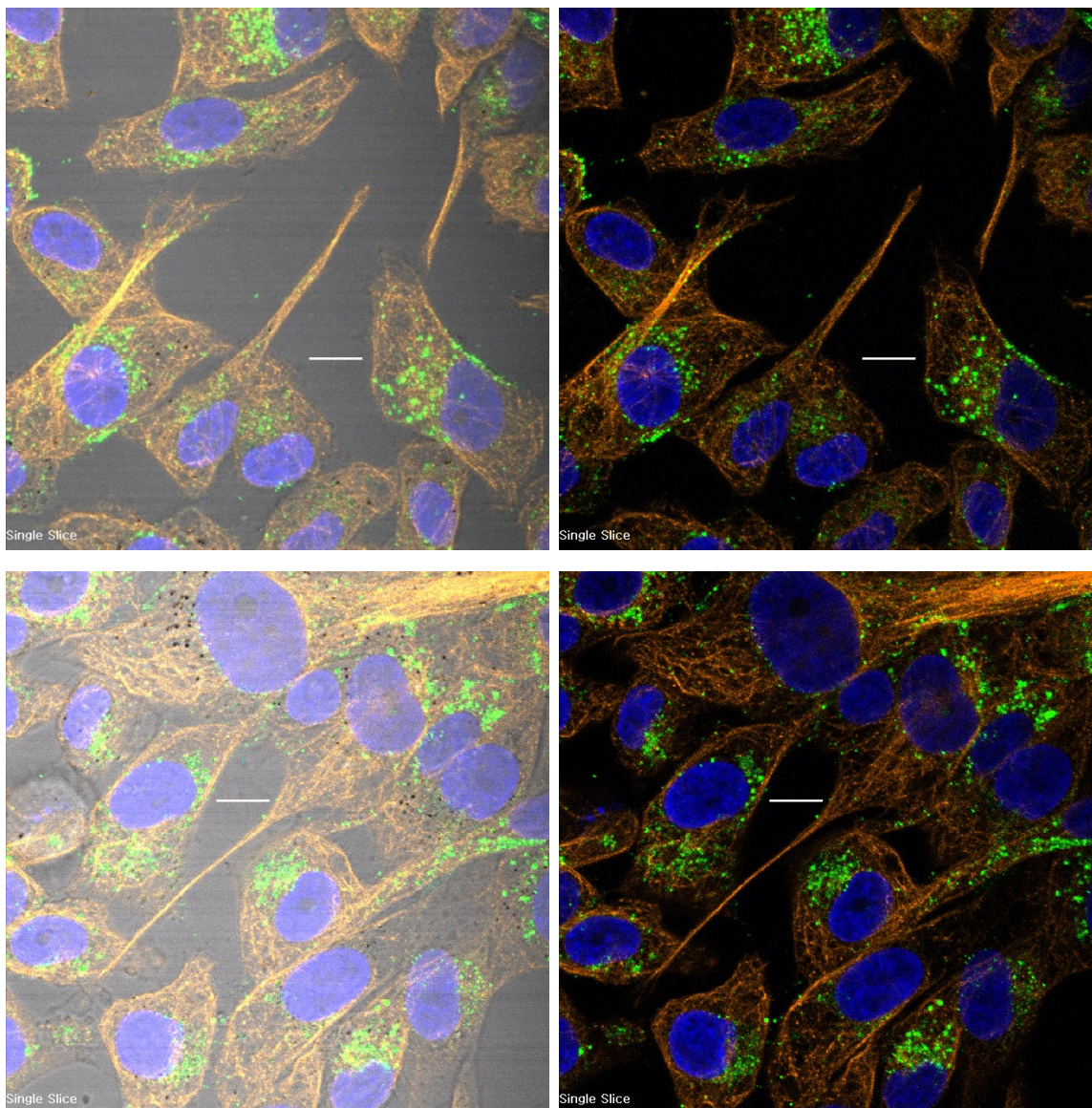
Obrázek 41 - Obarvené exosomy (CFSE, zeleně) z MOLM-13 a jejich snímaná koinkubace s linií HS-5 v různých časových intervalech (10 min, 45 min, 5:30 hod a 22 hod), měřítko 20 μ m.



Obrázek 42 – Exosomy (fluorescenčně značené CFSE, zeleně) z MOLM-13 koinkubované 24 hod s HS-5, jádro obarveno Hoechst33342 (modře) a mitochondrie MitoTracker Red (červeně). Na obrázku je vidět detail komunikace mezi buňkami, které se pravděpodobně účastní i exosomy, měřítko 5 μ m.



Obrázek 43 – EXO7 Exosomy (CFSE, zeleně) z MOLM-13 koinkubované po dobu 24 hod s HS-5 a internalizované v okolí jádra či v protruzích, u každé buňky odlišné. Jádro obarveno Hoechst33342 (modře) a mitochondrie MitoTracker (červeně). Snímky v řadě zobrazují vždy pouze vybrané kombinace spektrálních kanálů, měřítko 10 μ m.

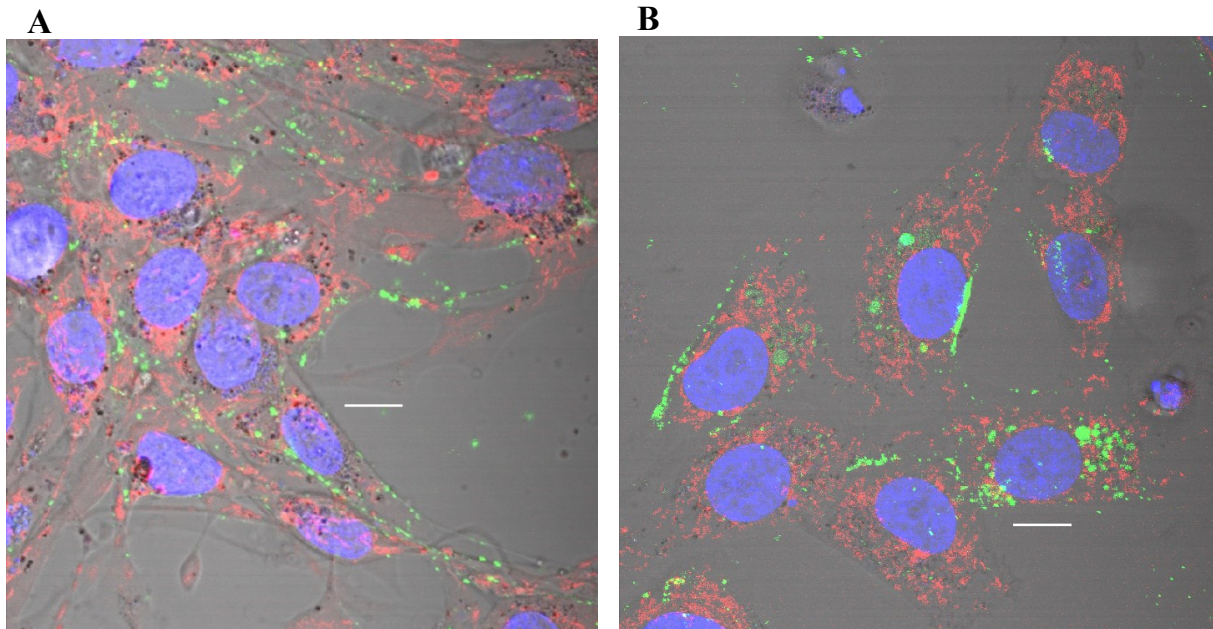


Obrázek 44 - EXO16 Značené exosomy (CFSE, zeleně) z MOLM-13 koinkubované s HS-5 a následně byl vzorek zfixovaný a mikrotubuly označeny 14-3-3 (oranžově). Jádra jsou obarvena Hoechst33342 (modře). Pozorována je různá lokalizace exosomů, tedy mezi jádrem a membránou (blíže jádru či membráně), nebo ve výběžcích buněk. Měřítka 10 μ m. Zobrazeny jsou všechny kanály s procházejícím světlem, případně pro lepší kontrast bez procházejícího světla.

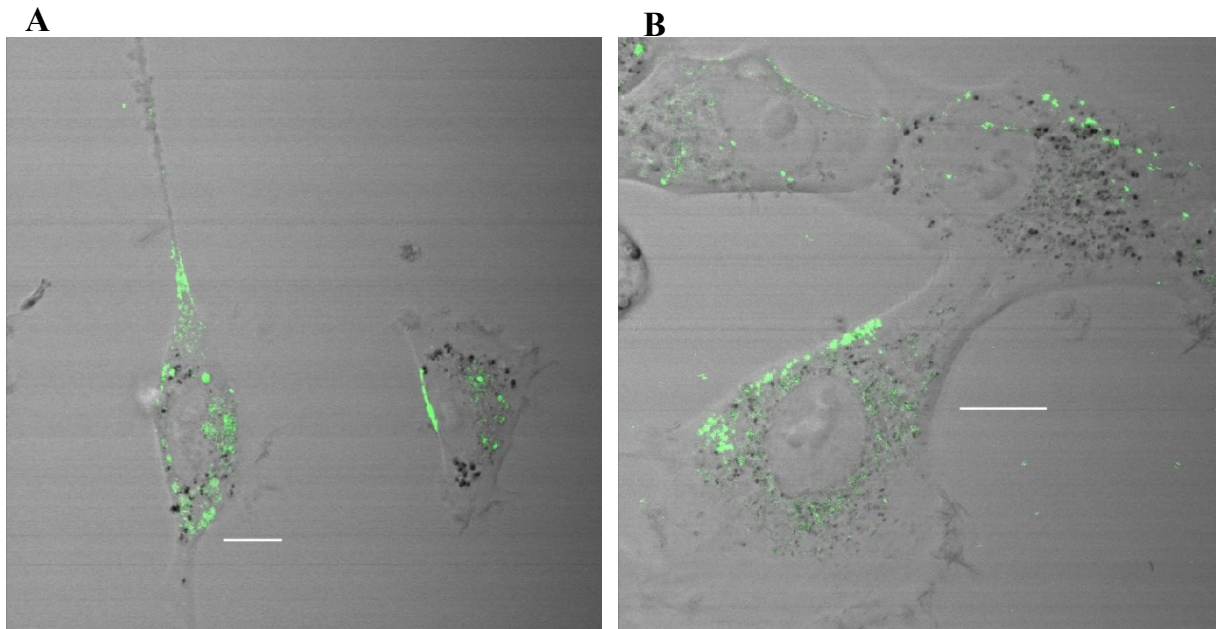
Při inkubaci exosomů z MOLM-13 s primárními AML buňkami nebyly zaznamenány žádné změny, pouze drobné shluky exosomů adherované k membráně z vnější strany buněk. Vzhledem k výsledkům předchozích experimentů tedy předpokládáme, že charakter interakce exosomů s cílovými buňkami závisí na typu cílových buněk.

Pro ověření této hypotézy byl dále sledován osud exosomů z dalších AML linií (MV4-11, OCI-AML2, OCI-AML3, KG-1) po inkubaci s buňkami linie HS-5. Podle předpokladu pozorujeme exosomy ze všech AML linií internalizované v buňkách (obrázek 45-47), jsou lokalizovány v cytoplazmě (v okolí jádra, či blízko membrány) (obrázek 45, 46)

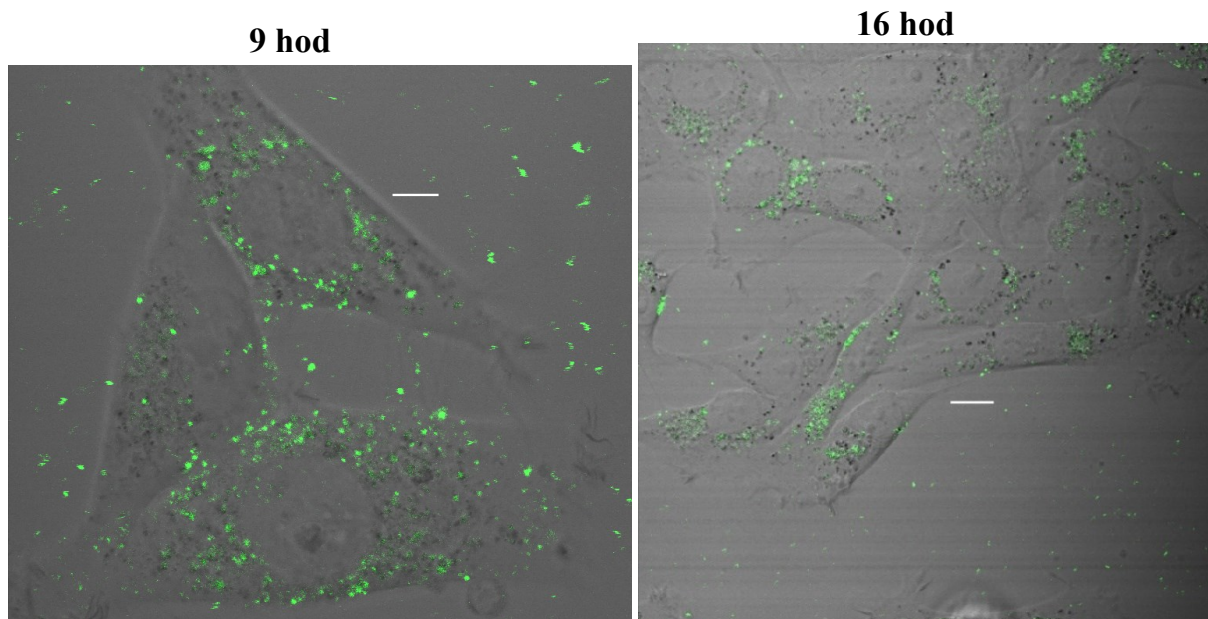
i ve výběžcích těchto buněk (obrázek 45A, 46A). Exosomy z linie KG-1 jsme v HS-5 pozorovali v čase a snímali změny jejich lokalizace v buňkách po dobu 16 hod, snímek po 9 hod a 16 hod znázorněn na obrázku 47. U některých vzorků byly opět pro lepší vizualizaci dobarveny jádra (Hoechst33342) a mitochondrie (MitoTracker Red).



Obrázek 45 - EXO5 Exosomy (obarveny CFSE, zeleně) z MV4-11 pozorovány internalizovány v cytoplasmě (A), případně specificky blíže membráně (B) a výběžcích HS-5 (A). Jádro (modrá, Hoechst33342), mitochondrie (červeně, MitoTracker Red), měřítko 10 μ m. Pozorování po 20 hod inkubaci.



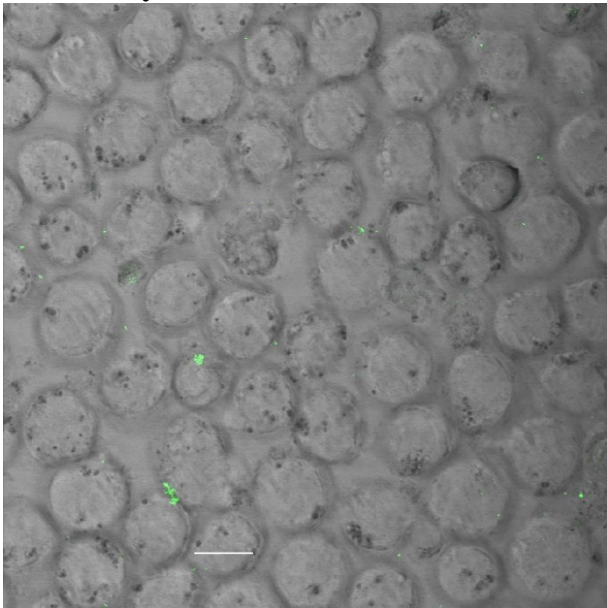
Obrázek 46 - Exosomy (značeny CFSE, zeleně) z OCI-AML2 (A) a OCI-AML3 (B) internalizovány v linii HS-5 po 20 hod inkubaci. Exosomy jsou lokalizovány v okolí jádra, i ve výběžcích, měřítko 10 μ m.



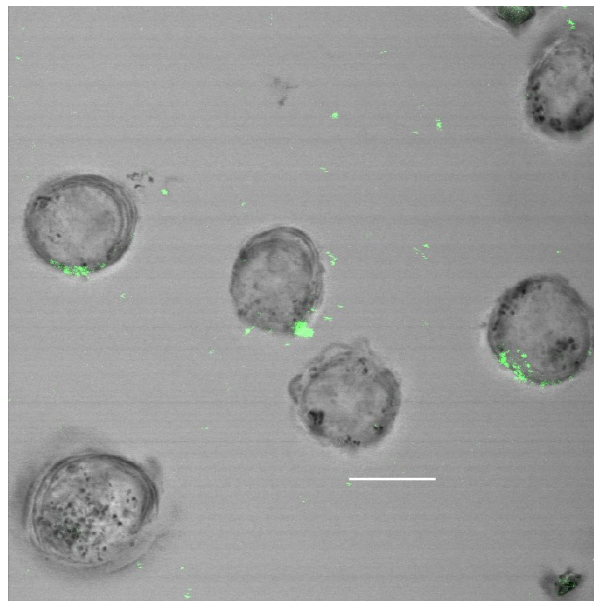
Obrázek 47 - Značené exosomy (CFSE, zeleně) z linie KG-1 byly inkubovány s buňkami HS-5 ve dvou časových intervalech (9 hod a 16 hod), v čase 9 hod jsou exosomy lokalizovány více kolem jádra. Měřítko 5 μm (9 hod) a 10 μm (16 hod).

Pro ověření další části naší hypotézy, tedy že do AML buněk neinternalizují ani exosomy z těchto buněk pocházející, byly exosomy z AML linií MV4-11, OCI-AML2, OCI-AML3 a KG-1 inkubovány se svými mateřskými buňkami, případně s jinými AML liniemi. Bylo potvrzeno, že exosomy neinternalizují do svých mateřských buněk ani do jiných AML linií, ale sporadicky se přichytí na buněčné membráně (obrázek 49), stejně jako bylo popsáno výše pro exosomy z MOLM-13. Konkrétní zorné pole směsi exosomů z OCI-AML2 bylo po 20 hod inkubaci se svými mateřskými buňkami snímáno v časovém intervalu 450 min, a tento shluk zůstal stále v kontaktu s původními buňkami. Stejně jako v případě exosomů z linie K562 zůstávají i tyto exosomy na membráně po stočení buněk (300g, 5 min). Obrázek 50 ukazuje, že ani exosomy z AML linií neinternalizují do jiných AML linií (testováno konkrétně pro exosomy z MV4-11 koinkubovaných s buňkami linie MOLM-13).

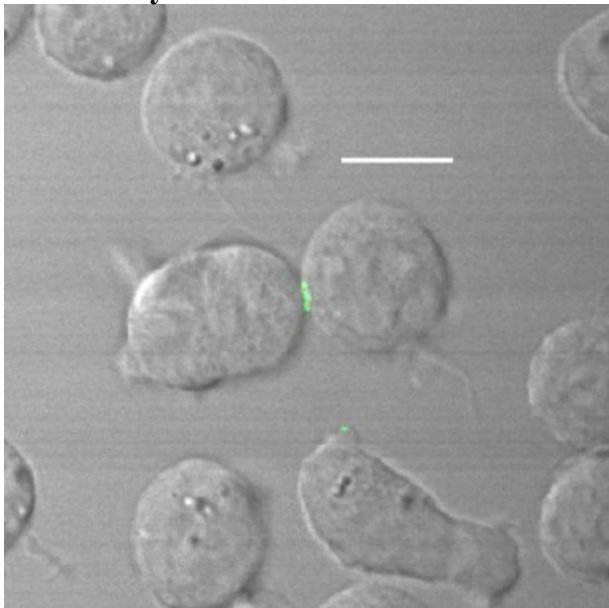
Exosomy z MV4-11



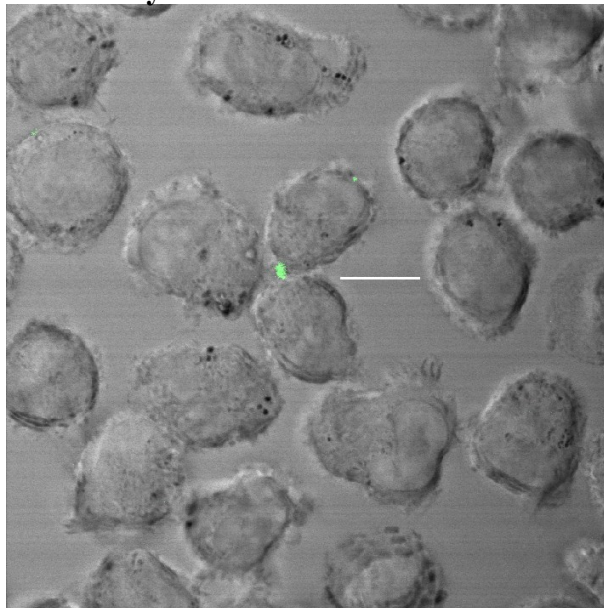
Exosomy z KG-1



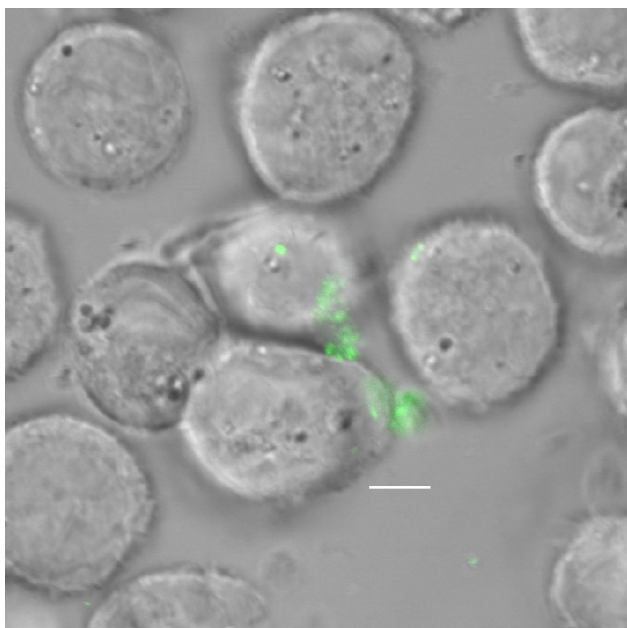
Exosomy z OCI-AML2



Exosomy z OCI-AML3

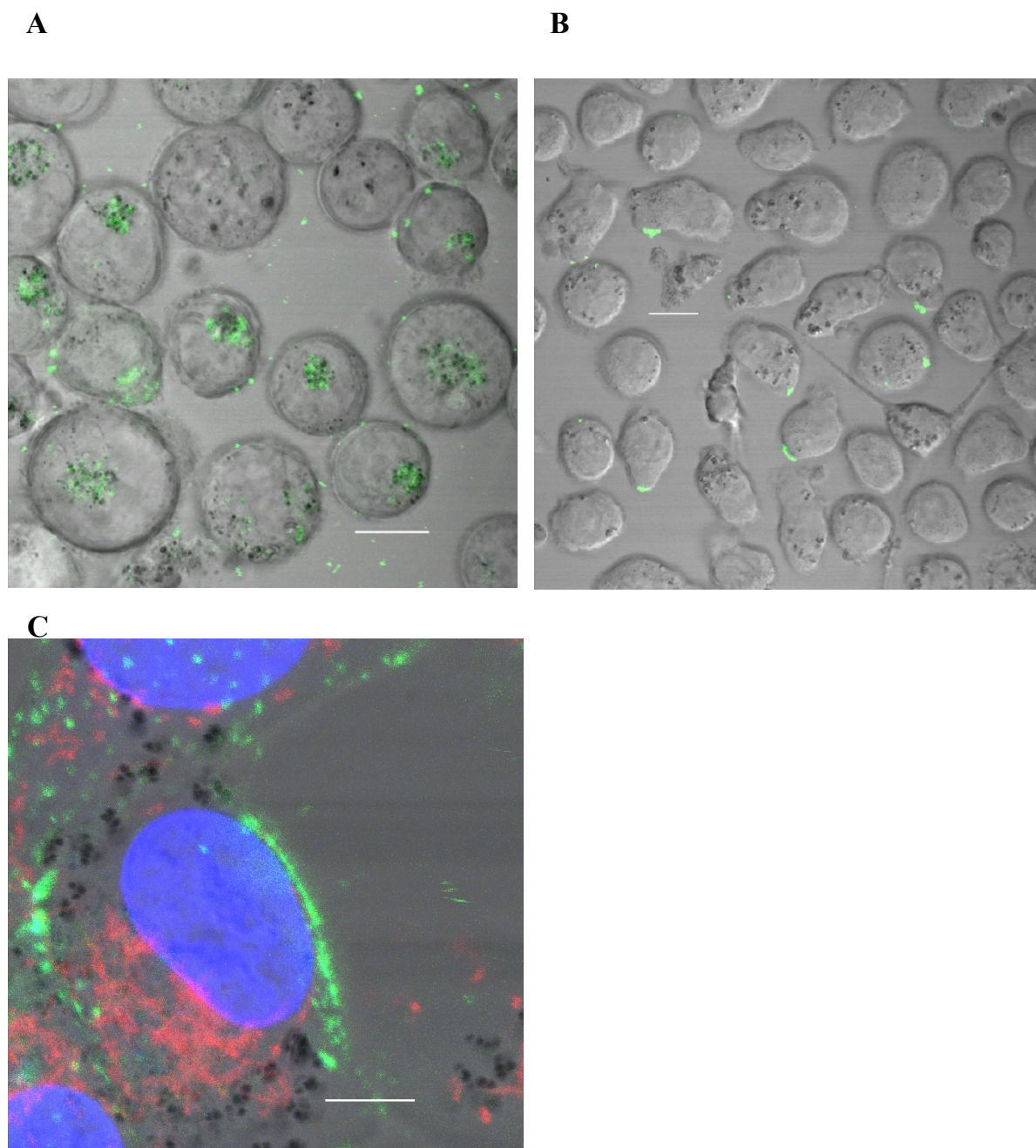


Obrázek 49 - Obarvené exosomy (CFSE, zeleně) z MV4-11, KG-1, OCI-AML2, OCI-AML3 po 20 hod (OCI-AML3 po 48 hod) koinkubaci se svými mateřskými buňkami. Exosomy jsou pozorované nalepené na buňkách, měřítko 10 μ m.



Obrázek 50 - EXO2 Exosomy (obarvené CFSE, zeleně) z MV4-11 přichycené na MOLM-13 linii po 2 hod inkubaci, měřítko 5 μ m.

V dalším experimentu byly jako zdroj exosomů použity primární AML buňky (LD76, LD77, LD78). Také tyto exosomy byly koinkubovány s buňkami linií K562, HS-5, MOLM-13 a OCI-AML3. Stejně jako bylo popsáno výše, exosomy primárních AML buněk internalizují do linií K562 a HS-5 (obrázek 51A, C), zatímco na AML buňky (MOLM-13, OCI-AML3) se exosomy pouze přichytí (obrázek 51B). Časový záznam pak ukázal, že v průběhu cca 2 hod exosomy drží přichycené na jednom místě cytoplazmatické membrány. Jejich lokalizace ale nijak nesouvisí se směrem nebo způsobem pohybu buňky.

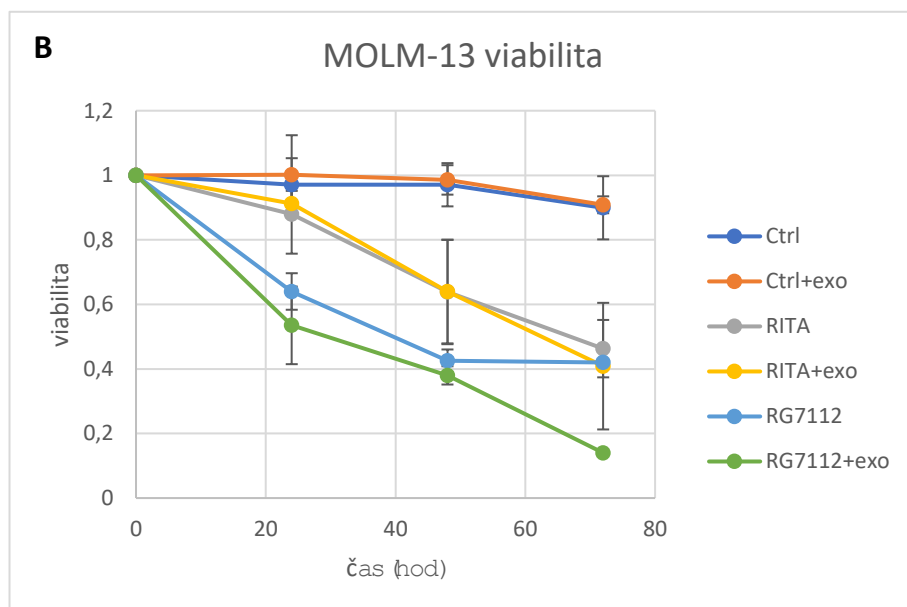
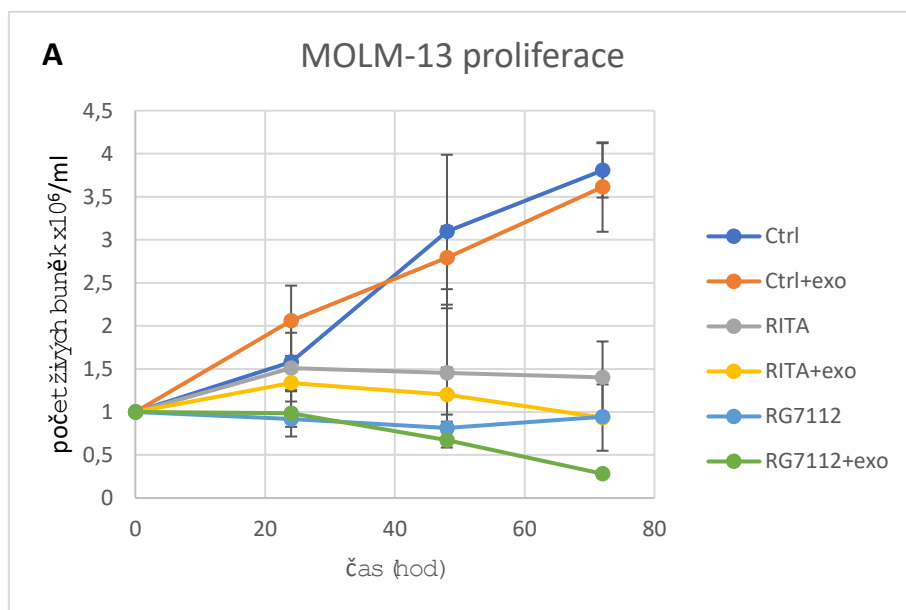


Obrázek 51 – Exosomy (značené CFSE, zeleně) z LD77 po dobu 20 hod inkubované a internalizované do K562 (A) a přichycené na membráně MOLM-13 (B), měřítko 10 μ m. Exosomy z LD76 inkubované 20 hod a internalizované do HS-5 (C), jádro obarveno Hoechst33342 (modře) a mitochondrie MitoTracker Red (červeně), měřítko 5 μ m.

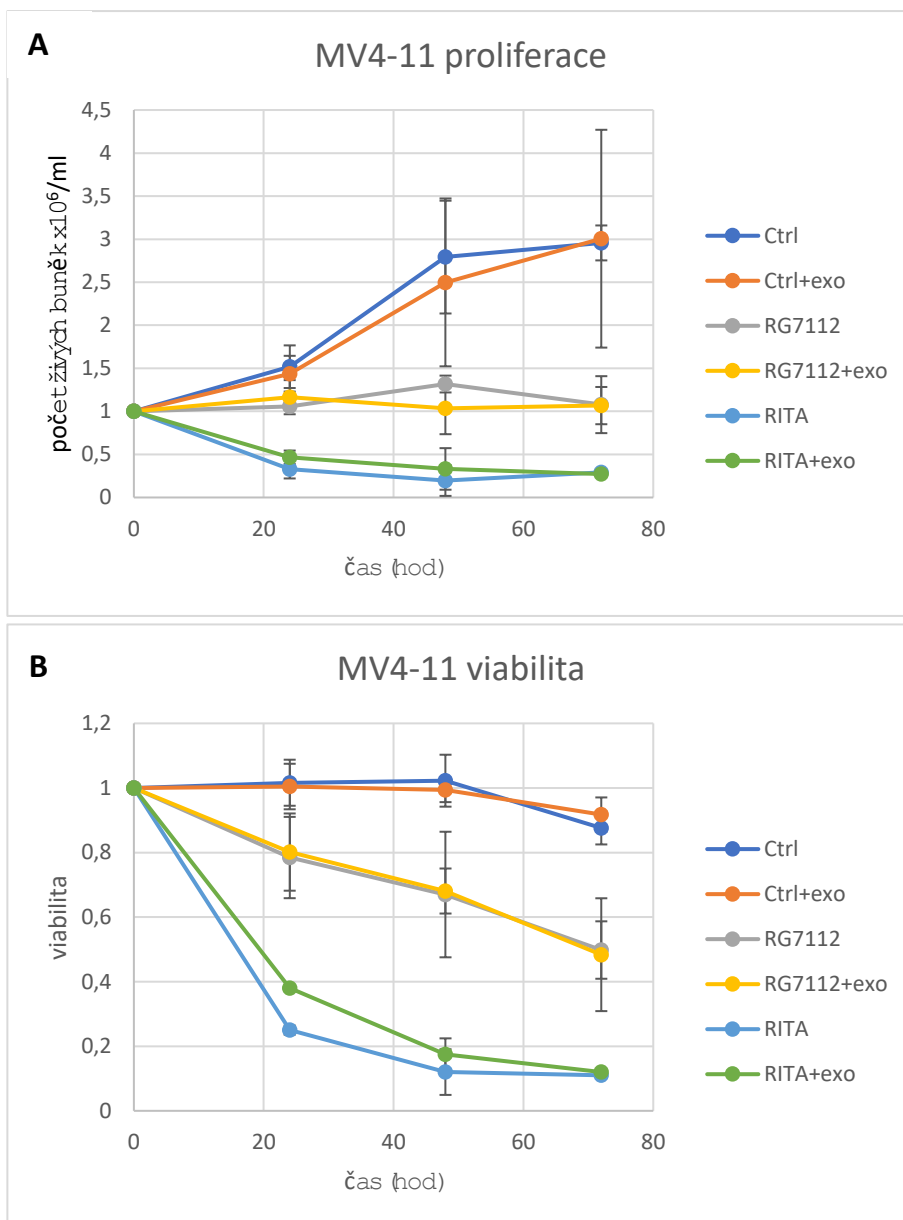
5.3 Vliv přítomnosti exosomů na účinek inhibitorů v AML liniích

Posledním dílčím cílem práce bylo vyšetření vlivu exosomů ze senzitivních AML buněk na účinek inhibitorů RG7112/RITA v rezistentní buněčné kultuře. Tento experiment se zakládá na publikaci (Hrdinova et al. 2021), v níž je popsán exosomy zprostředkovaný přenos rezistence na imatinib v buněčné kultuře K562. Na základě výsledků analýzy účinku inhibitorů u AML linií popsaných v kapitole 5.1. byly pro další experimenty vybrány AML linie s opačnou mírou senzitivity vůči jednotlivým inhibitorům, tedy linie MOLM-13 a MV4-11. Buňky rezistentní

linie jsme inkubovali s exosomy ze senzitivní linie, v čase 0 hod jsme do kultury přidali inhibitor 2 μM RITA nebo 1 μM RG7112 a sledovali proliferaci a viabilitu buněk po dobu nejméně 48 hod. Příslušné kontroly zahrnovaly vzorky bez exosomů i vzorky bez inhibitorů, celkem tedy byly pro každou situaci vytvořeny 4 vzorky: kontrola bez exosomů a inhibitoru, kontrola s exosomy bez inhibitoru, vzorek bez exosomů s inhibitorem a vzorek buněk s exosomy a inhibitorem. V prvních experimentech jsme sledovali pouze kombinace rezistentních buněk + exosomy ze senzitivních buněk, přičemž ve druhém z těchto pokusů (EXO8) byly testovány dvě různé koncentrace exosomů (1x a 4x). V posledních 2 pokusech (označeny MV46, MO26, MV47, MO27) byly z obou linií vytvořeny i opačné kombinace, tedy inhibitor byl přidán do kultury senzitivních buněk s exosomy z rezistentní linie. Vzorky byly kultivovány ve 12-ti jamkových kultivačních destičkách a následně byla každých 24 hod měřena proliferace a viabilita těchto vzorků. Experimenty vyšetřující přenos senzitivity tedy byly provedeny ve 4 biologických opakováních, analýzy přenosu rezistence byly prováděny dvakrát. Výsledné růstové křivky z jednotlivých experimentů (statisticky zhodnocené se směrodatnou odchylkou) jsou znázorněny na obrázcích 52 a 53. V žádné ze studovaných kombinací nebyl pozorován statisticky významný vliv přítomnosti exosomů na proliferaci a viabilitu po ošetření inhibitory u buněčných linií MOLM-13 a MV4-11.



Obrázek 52 - Křivky proliferace (A) a viability (B) AML linie MOLM-13 po koinkubaci s exosomy z linie MV4-11 (označeny „exo“), případně byly buňky v čase 0 hod ošetřeny 1 μ M RG7112 či 2 μ M RITA. Ke každému vzorku byly vždy vyrobeny příslušné kontroly bez exosomů (Ctrl)/bez inhibitoru. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku.

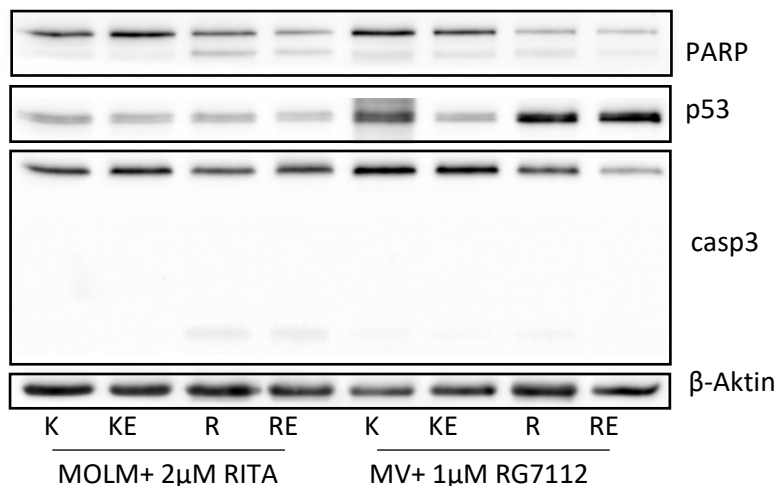


Obrázek 53 – Křivky proliferace (A) a viability (B) AML linie MV4-11 koinkubované s exosomy z MOLM-13 (označeny „exo“). Buňky byly v čase 0 hod ošetřeny 1 μ M RG7112 či 2 μ M RITA. Ke vzorkům byly vyrobeny příslušné kontroly bez exosomů (Ctrl)/bez inhibitoru.

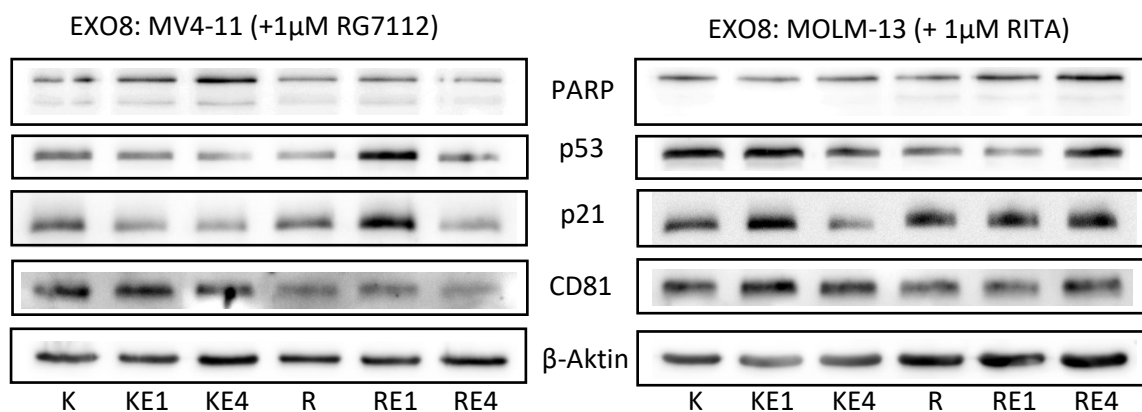
Tyto vzorky byly po 48 nebo 72 hod od přidání inhibitorů a změření hodnot pro růstovou křivku sklizeny do vzorkového pufru a analyzovány metodou western blot. Různé časy pro sklizeň buněk byly u odlišných experimentů (biologických opakování) stanoveny podle procenta přítomných mrtvých buněk. V prvním pokusu byly buňky sklizeny po 72 hod od přidání inhibitorů, ale při analýze bylo zjištěno velké množství mrtvých buněk a nehomogenita mezi jednotlivými vzorky (označeny EXO5, obrázek 54). U dalších pokusů byla upravena počáteční koncentrace nasazených buněk a buňky byly koinkubovány s exosomy po dobu 48-72 hod od přidání inhibitorů a následně sklizeny. Referenčním proteinem pro kontrolu celkové koncentrace vzorků je opět β -Aktin.

Ve většině experimentů byly vyšetřeny hladiny proteinů p53, PARP a kaspázy 3, které poskytují informaci o míře apoptózy ve vzorku, a CD81 jako marker exosomů, který by měl být zvýšen ve vzorcích obsahujících exosomy (obrázky 54-57). Rysy apoptózy detekujeme podobně jako v kapitole 5.1. zejména v buňkách linie MV4-11 po ošetření RITA a v buňkách linie MOLM-13 po ošetření RG7112 (obrázky 56 a 57), bez zjevného efektu přítomnosti exosomů v kultuře. Dokonce je PARP u všech experimentů štěpený u MOLM-13 po ošetření RITA (1 μ M i 2 μ M) v kontrolním vzorku bez exosomů (značeno R či RITA) i po inkubaci s exosomy (označeno RE, RE1, RE4 či RITA + exo), stejně jako kaspáza 3. Hladina p53 je u většiny vzorků zvýšená po ošetření inhibitory, avšak opět bez vlivu přítomnosti exosomů. V množství markeru CD81 rovněž nedetekujeme žádný systematický rozdíl mezi vzorky bez exosomů a s exosomy. Celkově tedy vliv přítomnosti exosomů na reakci buněk po ošetření inhibitory nebyl zaznamenán ani na proteinové úrovni.

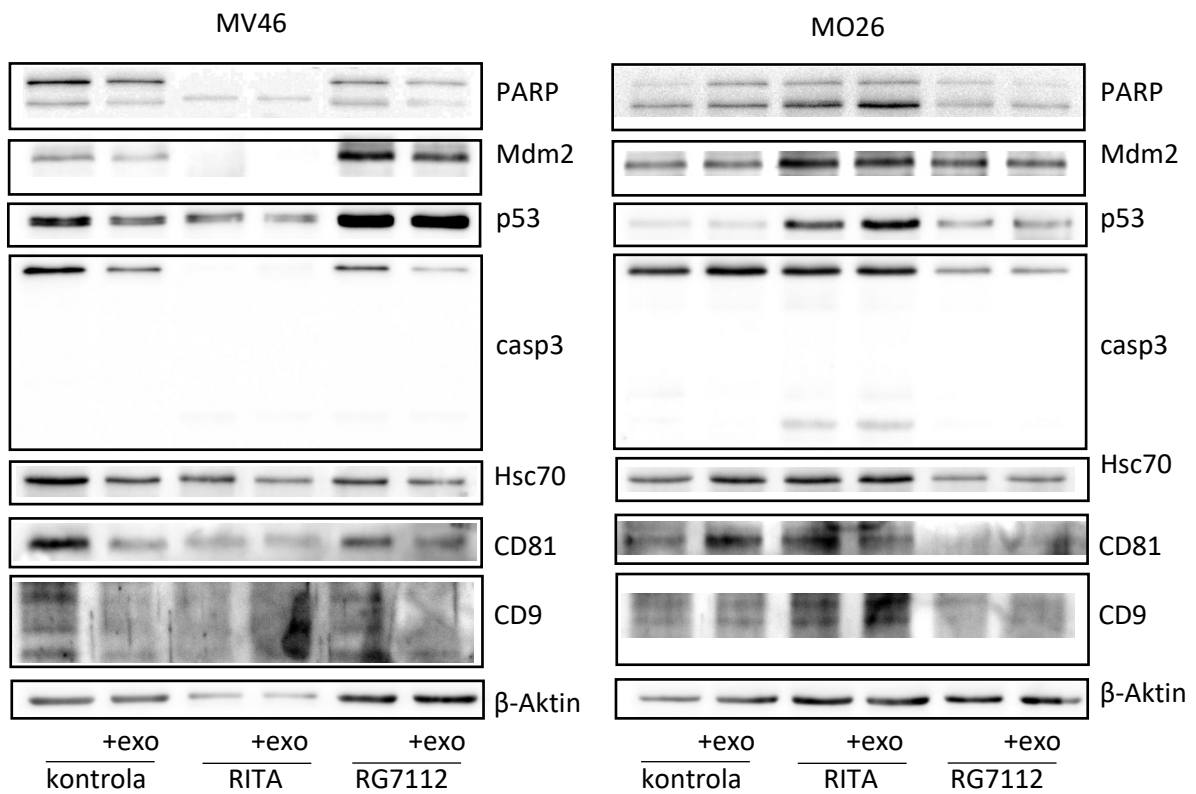
U dvou experimentů, u kterých byly buňky MV4-11 a MOLM-13 ošetřeny oběma inhibitory (označeny MV46, MO26, MV47, MO27, obrázky 56 a 57, popsáno viz výše), byly navíc stanoveny hladiny některých dalších proteinů, konkrétně Mdm2, Bcl-2, CD9. Rozdíl mezi hladinou proteinů u vzorku s exosomy a kontrolního vzorku bez exosomů většinou nebyl zaznamenán, s výjimkou snížené hladiny proteinu Mdm2 u MV4-11 (MV46, MV47) po ošetření RG7112. Ani hladiny CD znaků a Hsc70, dalšího známého proteinu často se vyskytujícího v exosomech, neodrážejí přítomnost exosomů a mezi jednotlivými vzorky se jejich množství liší. Z uvedených dat vyplývá, že v případě AML buněk nedochází prostřednictvím exosomů ke zvýšení senzitivity k léčbě, ale ani k přenosu lékové rezistence.



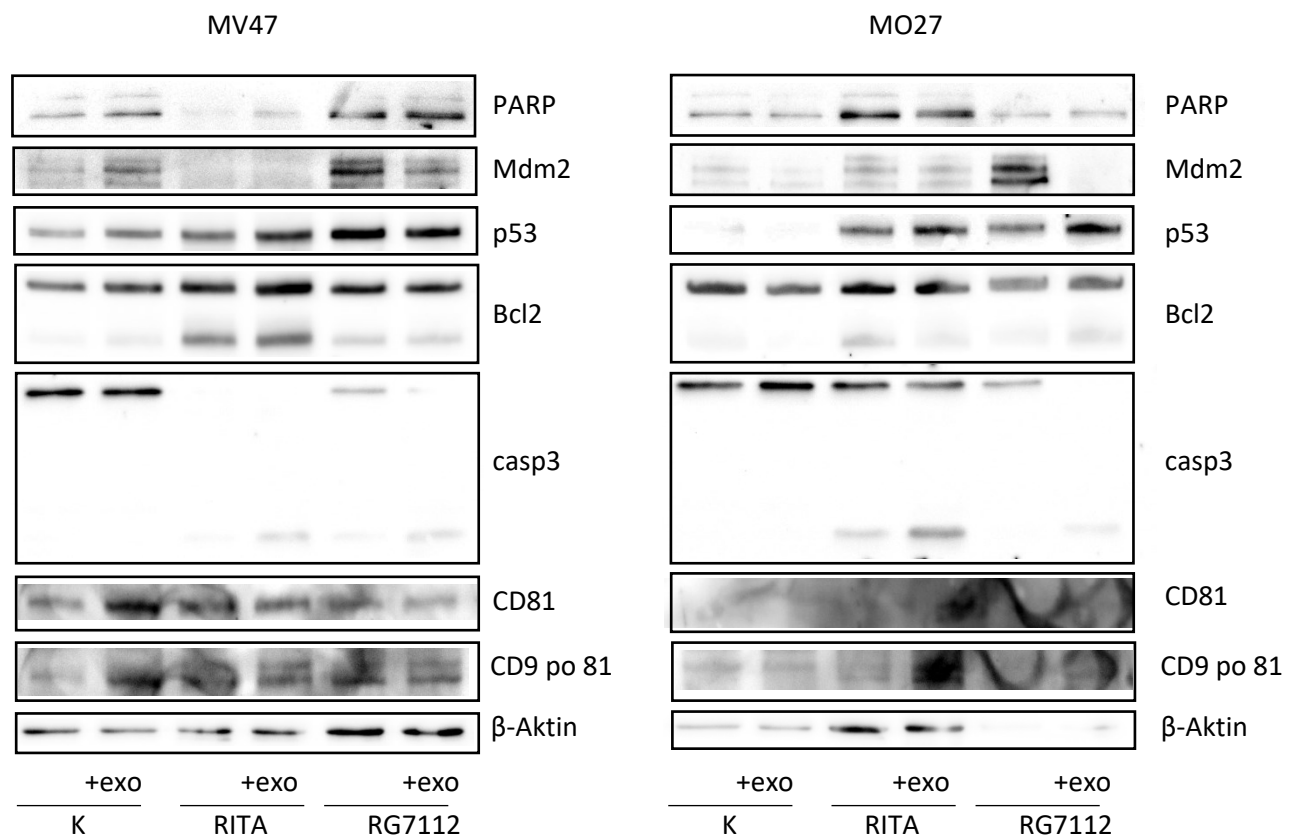
Obrázek 54 – Western blot vzorků EXO5. Buňky MOLM-13 – kontrolní vzorek (K), koinkubovaný s exosomy z MV4-11 (KE), kontrolní po ošetření 2 μM RITA (R), koinkubovaný s exosomy z MV4-11 a ošetřen 2 μM RITA (RE). A western blot AML linie MV4-11 – kontrolní vzorek (K), koinkubovaný s exosomy z MOLM-13 (KE), kontrolní po ošetření 1 μM RG7112 (R), koinkubovaný s exosomy z MOLM-13 a ošetřený 1 μM RG7112 (RE). Byly vyšetřeny hladiny proteinů souvisejících s apoptózou (PARP, kaspáza 3), proteinu p53 a kontrolní β-Aktin.



Obrázek 55 – Hladiny vybraných proteinů (PARP, p53, p21, CD81) u vzorků označených EXO8. Vlevo: Buňky MV4-11: kontrolní vzorek (K), koinkubovaný s menším objemem exosomů z MOLM-13 (KE1), koinkubovaný s větším objemem exosomů z MOLM-13 (KE4), kontrolní vzorek po ošetření 1 μM RG7112 (R), koinkubovaný s menším objemem exosomů z MOLM-13 a ošetřen 1 μM RG7112 (RE1) a vzorek koinkubovaný s větším objemem exosomů z MOLM-13 a ošetřen 1 μM RG7112 (RE4). Vpravo: western blot AML linie MOLM-13 – vzorky byly označeny stejně jako u MV4-11, s tím rozdílem, že byly buňky MOLM-13 koinkubovány s exosomy z MV4-11 a ošetřeny 1 μM RITA. Délka koinkubace byla 48 hod od přidání inhibitorů.



Obrázek 56 – Western blot analýza vzorků buněk MV4-11 (MV46) a MOLM-13 (MO26) kokultivovaných s exosomy z opačné linie (příslušné tratě označeny „+exo“), případně ošetřené inhibitory (1 μ M RG7112, 2 μ M RITA) po dobu 48 hod a jejich příslušné kontroly.



Obrázek 57 – Western blot analýza vzorků buněk MV4-11 (MV47) a MOLM-13 (MO27) kokultivovaných s exosomy (tratě „+exo“), případně ošetřené inhibitory 1 μ M RG7112 a 2 μ M RITA (po dobu 72 hod) a jejich příslušné kontroly.

6 DISKUZE

6.1 Účinek inhibitorů interakce p53-Mdm2 u AML linií

Obě léčiva studovaná v této diplomové práci jsou deklarována jako inhibitory interakce mezi Mdm2 a p53. Pro molekulu RG7112, která je optimalizovanou variantou nutlinových sloučenin, existuje řada studií, které toto tvrzení podporují (Vu et al. 2013; Tovar et al. 2013; Zhong et al. 2015). Druhé léčivo, RITA, skutečně působí jako aktivátor proteinu p53 (Issaeva et al. 2004), z našich koprecipitačních experimentů ale vyplývá, že RITA-indukovaná aktivace p53 není způsobena přímou inhibicí interakce Mdm2-p53. Další experimenty byly proto koncipovány také jako porovnání mechanismu účinku těchto dvou molekul.

Při studiu mechanismu působení léčiv je důležité nejprve určit účinnou koncentraci zkoumané látky, která ve zvolených buňkách vyvolá přiměřenou reakci. To bylo provedeno v rámci přípravných experimentů a pro následné měření proliferace a viability panelu AML linií ošetřených inhibitory RG7112 a RITA (obrázek 9) byly vybrány takové koncentrace, aby bylo buňky možné sledovat po dobu 96 hod, a zároveň aby vliv na měřené parametry byl pro většinu vzorků nezanedbatelný. U některých vzorků byl větší rozptyl hodnot mezi jednotlivými měřeními, výsledky odrážejí heterogenitu populace živých buněk, jejichž viabilita a proliferační aktivita může být ovlivněna různými odchylkami při dlouhodobé kultivaci buněk. Například výraznější směrodatné odchylky u proliferační křivky linie KG-1 mohou být vysvětleny tendencí těchto buněk adherovat, čímž může být ovlivněn počet buněk odebraných pro měření, a tedy také naše výsledné hodnoty. Linie KG-1 je zároveň nejméně ovlivněna působením inhibitorů, pravděpodobně proto, že má mutaci na chromozomu 17, v genu pro *TP53* (konkrétně jde o substituci G za A v intronové oblasti sestřihového místa mRNA, mezi exonem 6 a 7) (Sugimoto et al. 1992). Inhibitory, jejichž účinek je založen především na aktivaci proteinu p53, proto nemají na proliferaci a viabilitu této linie zásadní vliv. Buněčná linie OCI-AML3 po ošetření RG7112 je také málo senzitivní, ačkoliv by se dalo předpokládat že bude díky přítomnosti typické AML mutace v *NPM* reagovat dobře, stejně jako pacienti s mutovaným *NPM*, kteří zároveň nemají mutaci *FLT3-ITD* (Döhner et al. 2005). Jedním z vysvětlení vyšší rezistence linie OCI-AML3 může být souběžná mutace v *DNMT3A*, druhým faktorem může být fakt, že tato linie je kultivována v médiu s 20 % FBS, což jí dává dostatek živin pro přežití v méně příznivých podmínkách. Obě tyto odchylky ovšem platí i pro linii OCI-AML2, která je na RG7112 citlivější. V této rezistenci tedy pravděpodobně budou hrát roli také bazální hladiny proteinů zodpovědných za stresové reakce. Vzhledem k tomu, že linie

OCI-AML3 nebyla vybrána k podrobnějšímu zkoumání, není v možnostech této práce vyšetřovat dále tuto hypotézu.

Analýza exprese jednotlivých genů prostřednictvím qPCR by potřebovala více opakování, abychom dosáhli menších odchylek výsledných hodnot. Jedná se o námět pro další měření, jelikož z důvodu omezeného času vyhrazeného pro pokusy v diplomové práci toto nebylo možné zvládnout, a proto těmto výsledkům nepřisuzujeme v kontextu diplomové práce velkou váhu. Můžeme ale s velkou mírou jistoty potvrdit dřívější zjištění, že v buňkách linií ošetřených inhibitory RG7112 a RITA není zvýšená hladina transkriptu p53, protože reakce a aktivace p53 na obě léčiva je na proteinové úrovni, nikoliv na úrovni transkriptu (Issaeva et al. 2004; Tovar et al. 2013). U dvou vzorků primárních AML buněk jsme zaznamenali zvýšení exprese genu *TP53* po ošetření RITA, nemáme ale dostatečné informace o molekulární charakteristice těchto vzorků a vzhledem k omezenému množství a povaze materiálu není ani možné tato měření s konkrétními vzorky opakovat. Exprese *CDKN1A* je zvýšená u linií MV4-11 i MOLM-13 po léčbě oběma inhibitory, což může souviset s aktivovaným hnRNP K u těchto buněčných linií (Enge et al. 2009). Zvýšená exprese genů *MDM2*, *BBC3*, *BAX* u RG7112 je v souladu s literaturou popisující klinickou studii AML pacientů shrnutou v kapitole 2.2 (Andreeff et al. 2016), naopak *C-MYC* a *BCL-2* jsou po RITA u senzitivnější linie MV4-11 sníženy, což rovněž odpovídá dřívějším studiím (Grinkevich et al. 2009; Zhao et al. 2010). Podle Grinkevich et al. 2009 je pro účinnou apoptózu důležitá i represe onkogenů. Dokonce i na proteinové úrovni jsou sníženy c-Myc a Mcl-1 u linie senzitivní na účinek RITA, což opět souhlasí se závěry Grinkevich et al. 2009 učiněnými z měření na buněčných liniích karcinomu tlustého střeva a karcinomu prsu (Grinkevich et al. 2009). Tento účinek RITA u senzitivní linie totiž indukuje snížení aktivity protein kinázy B (Akt), a tedy i sníženou fosforylaci glykogen syntézy kinázy-3 β (GSK3- β) a tím je spuštěna její aktivace. GSK3- β dále může ovlivnit své substráty c-Myc a Mcl-1 a snížit tak jejich hladinu (Grinkevich et al. 2009).

Podrobněji jsme analyzovali změny indukované zvolenými léčivy na proteinové úrovni. Po působení RG7112 jsme u linií MOLM-13 a MV4-11 pozorovali zvýšenou proteinovou hladinu Mdm2, p53, p21 a NOXA (obrázek 20), stejné výsledky byly publikovány ve člancích po působení nutlinu-3a na AML linie (Kojima et al. 2005; Strachotová et al. 2023). Po ošetření RITA jsme u senzitivnější linie MV4-11 detekovali snížení proteinu p21, tento pokles jsme však nepozorovali u linie MOLM-13 (obrázek 20). To bylo potvrzeno ve stejném časovém intervalu na panelu rezistentních AML linií (Wolfová et al. 2023), linií karcinomu tlustého střeva po dobu 12 hod (Enge et al. 2009), zatímco u neuroblastomu je po 24 hod působení

popsán mírný nárůst hladiny p21 (Burmakin et al. 2013). Změny hladiny proteinu p21 v reakci na inhibitory RG7112 a RITA se liší, což může souviset s odlišným mechanismem jejich účinku. Kromě p53, který je známým regulátorem p21, jsou pravděpodobně zapojeny i další proteiny, konkrétně hnRNP K a Mdm2 (přesný mechanismus popsán v kapitole 2.2.1.3) (Enge et al. 2009). I hladina proteinu Puma se mezi jednotlivými výzkumy po ošetření RITA liší, my jsme ji v našich pokusech pozorovali sníženou u AML senzitivní linie, stejně jako ve studii publikované dříve naší laboratoří (Wolfová et al. 2023). V dalším článku bylo také popsáno snížení proteinu Puma po 24 hod u buněčné linie karcinomu tlustého střeva (Grinkevich et al. 2009). V jiných studiích byla Puma pozorována v nádorových buňkách zvýšená. V publikaci Issaeva et al. to může souviset s použitím vyšší koncentrace RITA (5 a 10 μ M) (Issaeva et al. 2004). Tuto hypotézu však vyvrací výzkum, který ukazuje, že RITA vyvolává zvýšení proapoptického proteinu Puma a indukci apoptózy i u buněčných linií s mutovaným *TP53* (Zhao et al. 2010). Protein Mdm2 jsme po RITA u senzitivní linie MV4-11 pozorovali po 24 hod jako snížený, což je v souladu se studií (Grinkevich et al. 2009) a studií Spinnler et al. 2011 ukazující, že hladina Mdm2 závisí na době působení RITA a druhu buněčné linie (Spinnler et al. 2011). U buněk senzitivních k RITA obvykle dojde ke snížení Mdm2 po 24 hod (Spinnler et al. 2011). To dobře koreluje s našimi zjištěními, že působení RITA nezahrnuje inhibici interakce mezi Mdm2 a p53 a vyšší hladina p53, indikující nižší degradaci proteinu, může souviset právě s nižší expresí jeho regulátoru Mdm2. Zvýšená hladina fosforylovaného proteinu p53 na serinu 15 u linií MV4-11 a MOLM-13 po ošetření RITA, u MV4-11 dokonce i po RG7112, může pravděpodobně změnit terciární konformaci p53, a tedy alternativním způsobem zabránit interakci p53 a Mdm2 (Shieh et al. 1997).

Zajímavé je také vyšetření změn jadérového proteinu NPM. Snížená je hladina fosforylované formy NPM na serinu 4, což v buňkách linie MOLM-13 pravděpodobně souvisí se zástavou buněčného cyklu v přechodu mezi S a G2 fázi, který se projevuje zvýšeným procentem buněk v S a G2/M fázi (viz kapitola 5.1.4, obrázek 22). Tento serin je totiž fosforylován během mitotické fáze a opětovně se defosforyluje v G1 fázi (Wolfová et al. 2023). Tento jev byl potvrzen i v článku naší laboratoře (Wolfová et al. 2023). Toto vysvětlení ovšem neplatí pro linii MV4-11, v níž nedochází k této změně buněčného cyklu (obrázek 23). Článek Wolfová et al. 2023 se dále zabývá možností predikovat účinek RITA na AML buňky prostřednictvím poměru fosforylovaných variant NPM na T199 a na S4 (Wolfová et al. 2023).

U primárních buněk z leukodeplecí jsme pozorovali velkou heterogenitu mezi jednotlivými vzorky, což je pravděpodobně způsobeno heterogenitou samotného

onemocnění AML. Každý vzorek byl proto na genové i proteinové úrovni vyšetřován zvláště, pro statistické zpracování by byla potřeba nashromáždit výrazně vyšší počet vzorků a korelovat získaná data s dalšími charakteristikami pacientů (věk, pohlaví, subtyp onemocnění, přítomnost specifických mutací a změn karyotypu apod.).

6.2 Vyšetření exosomálních proteinů a typu interakce exosomů s cílovými buňkami

Jako metodu izolace exosomů jsme zvolili ultracentrifugaci, která byla ověřena již při získávání exosomů z linie K562 v dřívější publikaci našeho oddělení (Hrdinova et al. 2021). Zároveň byla tato metoda podle Horibe et al. 2018 označena jako nejúčinnější pro detekci množství exosomových markerů (Horibe et al. 2018). Hladiny exosomových markerů (CD9, CD63 a CD81) se mezi jednotlivými vzorky exosomů získanými z různých buněčných linií liší (obrázky 24-25, 27), což bylo potvrzeno i v jiných studiích (Zhang et al. 2018; Horibe et al. 2018). Na množství proteinů v exosomech z nádorových lidských a myších buněčných linií má vliv například i velikost exosomů (Zhang et al. 2018). Odlíšné množství proteinů a exosomových markerů CD81, Hsp70 a Alix napříč myšími liniemi, např. z endoteliálních buněk aorty, embryonálních fibroblastů, myoblastové buněčné linie, melanomové buněčné linie nebo makrofágové buněčné linie indukované virem myši leukemie bylo pozorováno i v další studii (Charoenviriyakul et al. 2017). Množství exosomů rovněž závisí na buněčném typu (Charoenviriyakul et al. 2017). Jinými autory bylo navíc zjištěno, že množství charakteristických proteinů v exosomech, konkrétně Alix a TSG101, nemusí nutně korelovat s množstvím vyizolovaných exosomů (Wiklander et al. 2015). My jsme dále pozorovali, že výtěžky jednotlivých izolací exosomů jsou heterogenní, tedy např. exosomy z téže buněčné linie MV4-11 se liší v množství CD znaků a jadérekových proteinů (izolace EXO1 a kontrolní vzorek EXO20, obrázek 27). Proto jsou, při testování hypotézy o obsahu vyššího množství jadérekových proteinů v exosomech z apoptotických buněk a pro snížení systematické odchylky, kontrolní a ošetřené vzorky izolovány souběžně. V exosomech získaných z apoptotických buněk jsme pozorovali větší množství jadérekových proteinů NPM, NCL a FBL a proapoptického Bax a antiapoptického Bcl-xL (obrázek 28), stejně jako ve většině vzorků exosomů z AML primárních buněk LD76, LD77 a LD78 (obrázek 25 a 27). Přítomnost těchto proteinů v exosomech může souviset s odpovědí na cytostatika. Právě obsah exosomů získaných z apoptoticky senzitivních či rezistentních AML blastů souvisí s mateřskou buňkou (Wojtuszkiewicz et al. 2016). Tato pozorování podporují naši hypotézu, že senzitivita a rezistence vůči působení léčiv může být přenášena pomocí exosomů.

Při analýze internalizace exosomů a jejich kontaktu s buňkami prostřednictvím konfokálního mikroskopu bylo zjištěno, že v některých biologických opakováních internalizace exosomů trvala delší čas a rovněž intenzita měřené fluorescence se pro jednotlivé vzorky lišila. Je tedy zřejmé, že průběh interakce exosomů s cílovými buňkami závisí i na takových faktorech jako je kvalita a množství vyizolovaných exosomů nebo stav buněčné kultury. Konkrétním příkladem je v rámci návazné studentské práce izolace z linie MV4-11 s vysokým výtěžkem, jehož fluorescence po přidání k buněčné kultuře HeLa, které jsou jednou z dalších dobře internalizujících linií, byla velice intenzivní pouze z mezibuněčného prostoru. Při western blot analýze se ukázalo, že tento vzorek v podstatě neobsahuje exosomové markery. Také měření velikosti vyizolovaných částic v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR ukázalo mnohem menší velikost částic než u ostatních vzorků. Tento příklad demonstruje důležitost použití více přístupů ke kontrole kvality vzorku.

Dále jsme zjistili, že typ interakce exosomů z AML buněčných linií a linie K562 s těmito buňkami a buňkami linie HS-5 závisí na druhu cílové buňky a nikoliv buňky mateřské, což bylo potvrzeno i v článku Horibe et al. 2018 zaměřujícího se na internalizaci exosomů z buněčných linií karcinomu tlustého střeva a plic (Horibe et al. 2018). V jiné studii pozorovali exosomy z plazmy AML pacientů na membráně buněčné linie NK-92, což je linie pocházející z NK buněk pacienta s lymfomem, zatímco do primárních NK buněk zdravých dárců byly tyto exosomy internalizovány (Hong et al. 2017). Typ interakce exosomů s buněčnou membránou je pro složitost a náročnost této metody dosud málo prozkoumán. Je ale známo, že při přímém kontaktu exosomů s buněčnou membránou jsou zapojeny jak molekuly na povrchu exosomů, konkrétně ICAM-1, PD-L1 (Wei Zhang et al. 2022) či CD40 a DC-SIGN (Tkach et al. 2017), tak buněčné povrchové molekuly LFA-1 a PD-1 (Wei Zhang et al. 2022) či MHC-II komplex (Tkach et al. 2017). Tento druh kontaktu je nejčastěji pozorován při odpovědi imunitního systému, tedy u exosomů z dendritických buněk (Tkach et al. 2017) či z nádorových buněk v kontaktu s T-lymfocyty (Wei Zhang et al. 2022). Podobný typ interakce byl pozorován u exosomů z plazmy AML pacientů nesoucí TGF- β 1 a pravděpodobně interagující s receptorem TGF β I/II na povrchu NK buněk, což vedlo k ovlivnění signálních drah a potlačení jejich funkce (Hong et al. 2017). Internalizace exosomů do dendritických buněk se pravděpodobně účastní exosomové markery CD9, CD81, fosfatidylserin, CD11a a CD54 (Morelli et al. 2004).

Pro lepší monitorování lokalizace exosomů v buňkách byly dobarveny některé organely v živých buňkách nebo proteiny charakteristické pro subcelulární struktury po fixaci buněk.

Tím byla zároveň testována stabilita interakce mezi exosomy a buňkami, protože při procesu fixace by se exosomy nepevně interagující s povrchem buňky měly odmyt (viz kapitola 4.2.14.3). I přesto exosomy držely přichycené na povrchu fixovaných buněk AML linií (obrázek 35) a to ukazuje na pevný kontakt vyizolovaných exosomů a buněk. Exosomy také zůstaly po fixaci internalizované v CML linii – K562 (obrázek 35) a adherentní fibroblastové linii HS-5 (obrázky 33, 34, 44). Stabilita kontaktu mezi exosomy a buňkou však není jediným ukazatelem specifity kontaktu, protože v článku Hong et al. 2017 byla většina pozorovaných exosomů z povrchu linie NK-92 po promytí odstraněna, přestože tyto exosomy měly vliv na potlačení funkce NK buněk (Hong et al. 2017). Dobarvení buněk s exosomy mělo za cíl zjistit, do jaké struktury exosomy lokalizují. Konkrétně v K562 buňkách totiž exosomy lokalizovaly do oblasti kolem MTOC, kde se sbíhají mikrotubuly, bývají tam soustředěny mitochondrie a je tam lokalizován také Golgiho aparát. Internalizované exosomy v našich experimentech nekolokalizovaly se značením mitochondrií, jader, mikrotubul ani plazmatické membrány, následné experimenty neukázaly kolokalizaci ani se strukturou Golgiho aparátu. Další výzkum, který byl prováděn kolegyní v rámci Středoškolské odborné činnosti, ukázal, že exosomy v buňkách kolokalizují s lysozomy, což odpovídá studiím popisujících experimenty na myších, v nichž byly exosomy detekovány v játrech (Lai et al. 2014; Charoenviriyakul et al. 2017; Lázaro-Ibáñez et al. 2021).

6.3 Vliv přítomnosti exosomů na účinek inhibitorů u AML linií

Absenci efektu exosomů kokultivovaných s buňkami v našich experimentech přisuzujeme zejména nízké četnosti kontaktů buněk s exosomy, což dokazuje i nezměněná hladina exosomových markerů ve srovnání vzorků s exosomy a bez nich (obrázky 55-57). Testovali jsme různé koncentrace exosomů, frekvence interakcí však zůstala nízká i při vyšších dávkách. Kokultivaci exosomů s AML liniemi jsme v jednom opakování zkoušeli i při nižší koncentraci RITA (1 μ M), aby toxicita po RITA u vzorku linie MOLM-13 bez exosomů byla co nejvíce snížena a byl případně více viditelný vliv exosomů ze senzitivní linie MV4-11. Ani v tomto experimentu nebyl pozorován signifikantní vliv exosomů na viabilitu a proliferaci těchto buněk, a tedy nebyl potvrzen přenos senzitivity či rezistence prostřednictvím těchto exosomů. Jedním z vysvětlení může být, jak je uvedeno výše, že oproti exosomům z linie K562 je zde pozorována jiná interakce s buňkami (viz kapitola 5.2.3), exosomy z AML se neinternalizují, ale zůstávají jen řídky přichycené na povrchu. Opačný vliv a přenos rezistence do AML senzitivních buněk byl pozorován prostřednictvím extracelulárních váčků, o velikosti 100-800 nm, získaných z AML rezistentní linie na daunorubicin (Bouvy et al. 2017).

V tomto experimentu zkoušeli inkubaci jednou dávkou extracelulárních váčků, případně 4x opakovaně. Velké rozdíly mezi těmito dávkami nebyly pozorovány, byla zaznamenána pouze vyšší rezistence na nízkou koncentraci daunorubicinu u 4x opakované inkubace (Bouvy et al. 2017). My jsme však významný vliv exosomů nepozorovali ani na proteinové úrovni ve sklizených buňkách ošetřených zvolenými inhibitory.

Na tuto práci lze navázat zkoumáním vlivu AML exosomů na hematopoetické buňky kostní dřeně, ve studii Hornick et al. 2016 byla pozorována internalizace těchto exosomů a následné snížení funkce HSPC buněk (Hornick et al. 2016). Případně by bylo dobré detailněji charakterizovat námi pozorovaný kontakt exosomů z různých buněčných linií s membránou AML buněk, tedy určit, jaké konkrétní molekuly jsou v tomto kontaktu zapojeny, a následně by bylo snazší zjistit, zda má tento kontakt na AML buňky nějaký vliv. Tento výzkum je však náročný nejen časově, ale i dostupností přístrojů a metodicky.

Charakteristika a funkce exosomů jsou stále se rozvíjejícím tématem nejen u nádorových onemocnění a mohou přinést zajímavá zjištění o komunikaci exosomů s buňkami, či o možnostech jejich terapeutického využití.

7 SOUHRN

Vyšetřili jsme vliv inhibitorů RG7112 a RITA na proliferaci a viabilitu vybraných AML linií, z tohoto panelu jsme vybrali 2 reprezentativní linie pro další experimenty. K RITA je nejsenzitivnější linie MV4-11, která je zároveň relativně rezistentní k RG7112. Naopak nejvíce senzitivní k molekule RG7112 a relativně rezistentní k RITA je linie MOLM-13. U těchto linií jsme analyzovali změny v genové expresi po ošetření inhibitory, a přestože vzhledem k nízkému počtu opakování nebyly změny signifikantní, korelují s předpokládanými výsledky. *TP53* na genové úrovni zvýšena nebyla, a naopak byla zvýšena transkripce *MDM2* a dalších genů transkripčně závislých na p53, *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3*. Po RITA u senzitivní linie MV4-11 byla také snížena exprese *C-MYC* a *BCL2*. Důkladně jsme také vyšetřili účinek inhibitorů na proteinové úrovni, kde byla u senzitivních linií pozorována indukce apoptózy pomocí detekce fragmentace kaspázy 3, PARP a Bcl-2. Protein p53 je ve všech případech stabilizován, jeho fosforylované formy jsou zvýšeny. RITA u senzitivní linie snižuje hladinu proteinu p21 zastavujícího buněčný cyklus, onkoproteinu c-Myc a Mcl-1. Po RG7112 jsme pozorovali zvýšenou hladinu proapoptotického proteinu NOXA. Na transkripční i proteinové úrovni jsme analyzovali také vzorky primárních AML buněk, které ale pro svoji heterogenitu musely být vyšetřeny zvlášť. Vyšetřením změn v zastoupení fází buněčného cyklu byly potvrzeny výsledky proliferčních experimentů i transkripčních a proteinových analýz.

V dalších experimentech jsme prozkoumali vybrané hladiny proteinů v exosomech z různých buněčných linií. Zjistili jsme, že jejich exosomové markery CD9, CD63 a CD81 byly detekovány ve všech testovaných vzorcích, přestože jejich hladina se mezi jednotlivými izolacemi liší. Tyto exosomy také přenášejí různá množství jadérekových a apoptotických proteinů. Koinkubace izolovaných exosomů s buňkami přinesla zajímavé výsledky. Zjistili jsme, že typ interakce exosomů s buňkami závisí na druhu cílové buňky a nikoliv na mateřské buňce. Exosomy ze všech linií internalizovaly do CML linie – K562 a linie fibroblastů – HS5, ale ne do AML linií. U buněk AML linií byl pozorován jiný typ interakce, exosomy se přichytily na buněčný povrch a tento kontakt byl natolik pevný, že přetrval i po stočení a fixaci buněk.

V experimentech zabývajících se vlivem přítomnosti exosomů na účinek inhibitorů RG7112 či RITA v liniích MV4-11 a MOLM-13, tedy konkrétně výzkumem přenosu rezistence či senzitivity vůči těmto léčivům prostřednictvím exosomů, nebyl zaznamenán signifikantní účinek na viabilitu a proliferaci těchto buněk, ani nebyla pozorována změna hladin vybraných proteinů.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADMYRE, Charlotte, Sara M. JOHANSSON, Staffan PAULIE a Susanne GABRIELSSON, 2006. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *European Journal of Immunology* [online]. **36**(7), 1772–1781. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.200535615

ANDREEFF, Michael, Kevin R. KELLY, Karen YEE, Sarit ASSOULINE, Roger STRAIR, Leslie POPPLEWELL, David BOWEN, Giovanni MARTINELLI, Mark W. DRUMMOND, Pares VYAS, Mark KIRSCHBAUM, Swaminathan Padmanabhan IYER, Vivian RUVOLO, Graciela M. Nogueras GONZÁLEZ, Xuelin HUANG, Gong CHEN, Bradford GRAVES, Steven BLOTNER, Peter BRIDGE, Lori JUKOFSKY, Steve MIDDLETON, Monica RECKNER, Ruediger RUEGER, Jianguo ZHI, Gwen NICHOLS a Kensuke KOJIMA, 2016. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* [online]. **22**(4), 868–876. ISSN 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0481

*ARBER, Daniel A., Attilio ORAZI, Robert HASSERJIAN, Jürgen THIELE, Michael J. BOROWITZ, Michelle M. LE BEAU, Clara D. BLOOMFIELD, Mario CAZZOLA a James W. VARDIMAN, 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [online]. **127**(20), 2391–2405. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-03-643544

BELLAVIA, Daniele, Stefania RAIMONDO, Giovanna CALABRESE, Stefano FORTE, Marta CRISTALDI, Agostina PATINELLA, Lorenzo MEMEO, Mauro MANNO, Samuele RACCOSTA, Patrizia DIANA, Girolamo CIRRINCIONE, Gianluca GIAVARESI, Francesca MONTELEONE, Simona FONTANA, Giacomo DE LEO a Riccardo ALESSANDRO, 2017. Interleukin 3- receptor targeted exosomes inhibit in vitro and in vivo Chronic Myelogenous Leukemia cell growth. *Theranostics* [online]. **7**(5), 1333–1345. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.17092

BOUVY, Céline, Adeline WANNEZ, Julie LALOY, Christian CHATELAIN a Jean-Michel DOGNÉ, 2017. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo. *Leukemia Research* [online]. **62**, 70–76. ISSN 0145-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2017.09.014

BOWER, H., T. M.-L. ANDERSSON, M. BJÖRKHOLM, P. W. DICKMAN, P. C. LAMBERT a Å R. DEROLF, 2016. Continued improvement in survival of acute myeloid leukemia patients: an application of the loss in expectation of life. *Blood Cancer Journal* [online]. **6**(2), e390. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2016.3

BRUMMELKAMP, Thijn R., Armida W. M. FABIUS, Jasper MULLENDERS, Mandy MADIREDDO, Arno VELDS, Ron M. KERKHOVEN, René BERNARDS a Roderick L. BEIJERSBERGEN, 2006. An shRNA barcode screen provides insight into cancer cell vulnerability to MDM2 inhibitors. *Nature Chemical Biology* [online]. **2**(4), 202–206. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio774

BŘEZINOVÁ, Lenka, 2022. Úloha exosomů u chronické myeloidní leukemie [online]. Praha [vid. 2023-12-08]. bakalářská práce. Univerzita Karlova. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/173318>

BUESO-RAMOS, Carlos E., Yun YANG, Elizabeth DELEON, Patrick MCCOWN, Sanford A. STASS a Maher ALBITAR, 1993. The Human MDM-2 Oncogene Is Overexpressed in Leukemias. *Blood* [online]. **82**(9), 2617–2623. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V82.9.2617.2617

BURMAKIN, Mikhail, Yao SHI, Elisabeth HEDSTRÖM, Per KOGNER a Galina SELIVANOVA, 2013. Dual targeting of wild-type and mutant p53 by small molecule RITA results in the inhibition of N-Myc and key survival oncogenes and kills neuroblastoma cells in vivo and in vitro. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* [online]. **19**(18), 5092–5103. ISSN 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2211

BUSCHOW, Sonja I., Esther N. M. NOLTE-‘T HOEN, Guillaume VAN NIEL, Maaïke S. POLS, Toine TEN BROEKE, Marjolein LAUWEN, Ferry OSSENDORP, Cornelis J. M. MELIEF, Graça RAPOSO, Richard WUBBOLTS, Marca H. M. WAUBEN a Willem STOORVOGEL, 2009. MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic* [online]. **10**(10), 1528–1542. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x

CARTER, Stephanie, Oliver BISCHOF, Anne DEJEAN a Karen H. VOUSDEN, 2007. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nature Cell Biology* [online]. **9**(4), 428–435. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1562

*COLOMBO, Marina, Graça RAPOSO a Clotilde THÉRY, 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **30**(1), 255–289. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

*DE KOUCHKOVSKY, I. a M. ABDUL-HAY, 2016. „Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update". *Blood Cancer Journal* [online]. **6**(7), e441. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2016.50

*DÖHNER, Hartmut, Andrew H. WEI, Frederick R. APPELBAUM, Charles CRADDOCK, Courtney D. DINARDO, Hervé DOMBRET, Benjamin L. EBERT, Pierre FENAUX, Lucy A. GODLEY, Robert P. HASSERJIAN, Richard A. LARSON, Ross L. LEVINE, Yasushi MIYAZAKI, Dietger NIEDERWIESER, Gert OSSENKOPPELE, Christoph RÖLLIG, Jorge SIERRA, Eytan M. STEIN, Martin S. TALLMAN, Hwei-Fang TIEN, Jianxiang WANG, Agnieszka WIERZBOWSKA a Bob LÖWENBERG, 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* [online]. **140**(12), 1345–1377. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2022016867

DÖHNER, Konstanze, Richard F. SCHLENK, Marianne HABDANK, Claudia SCHOLL, Frank G. RÜCKER, Andrea CORBACIOGLU, Lars BULLINGER, Stefan FRÖHLING a Hartmut DÖHNER, 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* [online]. **106**(12), 3740–3746. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-05-2164

ENGE, Martin, Wenjie BAO, Elisabeth HEDSTRÖM, Stephen P. JACKSON, Abdeladim MOUMEN a Galina SELIVANOVA, 2009. MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell* [online]. **15**(3), 171–183. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2009.01.019

- FANG, S., J. P. JENSEN, R. L. LUDWIG, K. H. VOUSDEN a A. M. WEISSMAN, 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(12), 8945–8951. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.275.12.8945
- FENAUX, P., C. PREUDHOMME, I. QUIQUANDON, P. JONVEAUX, J. L. LAÏ, M. VANRUMBEKE, M. H. LOUCHEUX-LEFEBVRE, F. BAUTERS, R. BERGER a J. P. KERCKAERT, 1992. Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* [online]. **80**(2), 178–183. ISSN 0007-1048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.1992.tb08897.x
- FORTNEY, James E., Brett M. HALL, Lindsay BARTRUG a Laura F. GIBSON, 2002. Chemotherapy induces bcl-2 cleavage in lymphoid leukemic cell lines. *Leukemia & Lymphoma* [online]. **43**(11), 2171–2178. ISSN 1042-8194. Dostupné z: doi:10.1080/1042819021000033024
- GIACCIA, A. J. a M. B. KASTAN, 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development* [online]. **12**(19), 2973–2983. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.12.19.2973
- GRINKEVICH, Vera V., Fedor NIKULENKOV, Yao SHI, Martin ENGE, Wenjie BAO, Alena MALJUKOVA, Angela GLUCH, Alexander KEL, Olle SANGFELT a Galina SELIVANOVA, 2009. Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer Cell* [online]. **15**(5), 441–453. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2009.03.021
- GU, Jijie, Hidehiko KAWAI, Linghu NIE, Hiroyuki KITAO, Dmitri WIEDERSCHAIN, Aart G. JOCHEMSEN, John PARANT, Guillermina LOZANO a Zhi-Min YUAN, 2002. Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(22), 19251–19254. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C200150200
- GU, Xiaoyu, Ulrike ERB, Markus W. BÜCHLER a Margot ZÖLLER, 2015. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *International Journal of Cancer* [online]. **136**(4), E74–E84. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.29100
- *GURUNG, Sonam, Dany PEROCHEAU, Loukia TOURAMANIDOU a Julien BARUTEAU, 2021. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell communication and signaling: CCS* [online]. **19**(1), 47. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/s12964-021-00730-1
- HARDING, C., John HEUSER a P. STAHL, 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology* [online]. **97**(2), 329–339. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.97.2.329
- HAZAN-HALEVY, Inbal, Daniel ROSENBLUM, Shiri WEINSTEIN, Osnat BAIREY, Pia RAANANI a Dan PEER, 2015. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Letters* [online]. **364**(1), 59–69. ISSN 1872-7980. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2015.04.026
- HOFFMANN-LA ROCHE, 2016a. *A Multi-center, Open-label, Phase I Study of Single Agent R7112 Administered Orally in Patients With Advanced Malignancies, Except All Forms of Leukaemia* [online]. Clinical trial registration NCT00559533. B.m.: clinicaltrials.gov [vid. 2024-01-01]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00559533>
- HOFFMANN-LA ROCHE, 2016b. *An Open Label Study to Investigate the Maximum Tolerated Dose of RO5045337 in Patients With Acute Myelogenous Leukemia (AML), Acute Lymphocytic Leukemia*

(ALL), Chronic Myelogenous Leukemia (CML) in Blast Phase, or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Cell Lymphocytic Lymphoma (CLL / SCLL) [online]. Clinical trial registration NCT00623870. B.m.: clinicaltrials.gov [vid. 2024-01-01]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00623870>

HOFFMANN-LA ROCHE, 2021. *A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Study of Idasanutlin, an MDM2 Antagonist, With Cytarabine Versus Cytarabine Plus Placebo in Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML)* [online]. Clinical trial registration NCT02545283. B.m.: clinicaltrials.gov [vid. 2024-01-01]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02545283>

HONG, Chang-Sook, Priyanka SHARMA, Saigopalakrishna S. YERNENI, Patricia SIMMS, Edwin K. JACKSON, Theresa L. WHITESIDE a Michael BOYIADZIS, 2017. Circulating exosomes carrying an immunosuppressive cargo interfere with cellular immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 14684. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-017-14661-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-14661-w)

HORIBE, Sayo, Toshihito TANAHASHI, Shoji KAWAUCHI, Yoshiki MURAKAMI a Yoshiyuki RIKITAKE, 2018. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* [online]. **18**(1), 47. ISSN 1471-2407. Dostupné z: [doi:10.1186/s12885-017-3958-1](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3958-1)

HORNICK, Noah I., Ben DORON, Sherif ABDELHAMED, Jianya HUAN, Christina A. HARRINGTON, Rongkun SHEN, Xiaolu A. CAMBRONNE, Santhosh CHAKKARAMAKKIL VERGHESE a Peter KURRE, 2016. AML suppresses hematopoiesis by releasing exosomes that contain microRNAs targeting c-MYB. *Science Signaling* [online]. **9**(444), ra88. ISSN 1937-9145. Dostupné z: [doi:10.1126/scisignal.aaf2797](https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf2797)

HORNICK, Noah I., Jianya HUAN, Ben DORON, Natalya A. GOLOVIZNINA, Jodi LAPIDUS, Bill H. CHANG a Peter KURRE, 2015. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Scientific Reports* [online]. **5**(1), 11295. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/srep11295](https://doi.org/10.1038/srep11295)

HRDINOVA, Tereza, Ondrej TOMAN, Jiri DRESLER, Jana KLIMENTOVA, Barbora SALOVSKA, Petr PAJER, Oldrich BARTOS, Vaclava POLIVKOVA, Jana LINHARTOVA, Katerina MACHOVA POLAKOVA, Hana KABICKOVA, Barbora BRODSKA, Matyas KRIJT, Jan ZIVNY, Daniel VYORAL a Jiri PETRAK, 2021. Exosomes released by imatinib-resistant K562 cells contain specific membrane markers, IFITM3, CD146 and CD36 and increase the survival of imatinib-sensitive cells in the presence of imatinib. *International Journal of Oncology* [online]. **58**(2), 238–250. ISSN 1791-2423. Dostupné z: [doi:10.3892/ijo.2020.5163](https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5163)

HUAN, Jianya, Noah I. HORNICK, Matthew J. SHURTLEFF, Amy M. SKINNER, Natalya A. GOLOVIZNINA, Charles T. ROBERTS Jr a Peter KURRE, 2013. RNA Trafficking by Acute Myelogenous Leukemia Exosomes. *Cancer Research* [online]. **73**(2), 918–929. ISSN 0008-5472. Dostupné z: [doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2184](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2184)

HUANG, Fang, Jiangbo WAN, Siguo HAO, Xiaohui DENG, Linjun CHEN a Liyuan MA, 2017. TGF- β 1-silenced leukemia cell-derived exosomes target dendritic cells to induce potent anti-leukemic immunity in a mouse model. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* [online]. **66**(10), 1321–1331. ISSN 1432-0851. Dostupné z: [doi:10.1007/s00262-017-2028-5](https://doi.org/10.1007/s00262-017-2028-5)

CHAROENVIRIYAKUL, Chonlada, Yuki TAKAHASHI, Masaki MORISHITA, Akihiro MATSUMOTO, Makiya NISHIKAWA a Yoshinobu TAKAKURA, 2017. Cell type-specific and

common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* [online]. **96**, 316–322. ISSN 1879-0720. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2016.10.009

CHEN, Gang, Alexander C. HUANG, Wei ZHANG, Gao ZHANG, Min WU, Wei XU, Zili YU, Jiegang YANG, Beike WANG, Honghong SUN, Houfu XIA, Qiwen MAN, Wenqun ZHONG, Leonardo F. ANTELO, Bin WU, Xuepeng XIONG, Xiaoming LIU, Lei GUAN, Ting LI, Shujing LIU, Ruifeng YANG, Youtao LU, Liyun DONG, Suzanne MCGETTIGAN, Rajasekharan SOMASUNDARAM, Ravi RADHAKRISHNAN, Gordon MILLS, Yiling LU, Junhyong KIM, Youhai H. CHEN, Haidong DONG, Yifang ZHAO, Giorgos C. KARAKOUSIS, Tara C. GANGADHAR, Lynn M. SCHUCHTER, Meenhard HERLYN, E. John WHERRY, Xiaowei XU a Wei GUO, 2018. Exosomal PD-L1 Contributes to Immunosuppression and is Associated with anti-PD-1 Response. *Nature* [online]. **560**(7718), 382–386. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-018-0392-8

CHEN, J., X. WU, J. LIN a A. J. LEVINE, 1996. mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **16**(5), 2445–2452. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.16.5.2445

IMAI, Takafumi, Yuki TAKAHASHI, Makiya NISHIKAWA, Kana KATO, Masaki MORISHITA, Takuma YAMASHITA, Akihiro MATSUMOTO, Chonlada CHAROENVIRIYAKUL a Yoshinobu TAKAKURA, 2015. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **4**, 26238. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v4.26238

ISSAEVA, Natalia, Przemyslaw BOZKO, Martin ENGE, Marina PROTOPOPOVA, Lisette G. G. C. VERHOEF, Maria MASUCCI, Aladdin PRAMANIK a Galina SELIVANOVA, 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature Medicine* [online]. **10**(12), 1321–1328. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1146

*JIMBU, Laura, Oana MESAROS, Cristian POPESCU, Alexandra NEAGA, Iulia BERCEANU, Delia DIMA, Mihaela GAMAN a Mihnea ZDRENGHEA, 2021. Is There a Place for PD-1-PD-L Blockade in Acute Myeloid Leukemia? *Pharmaceuticals* [online]. **14**(4), 288. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph14040288

KADIA, Tapan M., Preetesh JAIN, Farhad RAVANDI, Guillermo GARCIA-MANERO, Michael ANDREEF, Koichi TAKAHASHI, Gautam BORTHAKUR, Elias JABBOUR, Marina KONOPLEVA, Naval G. DAVER, Courtney DINARDO, Sherry PIERCE, Rashmi KANAGAL-SHAMANNA, Keyur PATEL, Zeev ESTROV, Jorge CORTES a Hagop M. KANTARJIAN, 2016. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer* [online]. **122**(22), 3484–3491. ISSN 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/ncr.30203

KANG, Yoon-Tae, Thomas HADLOCK, Shruti JOLLY a Sunitha NAGRATH, 2020. Extracellular Vesicles on Demand (EVOD) chip for screening and quantification of cancer-associated extracellular vesicles. *Biosensors & bioelectronics* [online]. **168**, 112535. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112535

*KHALIFE, Jihane, James F. SANCHEZ a Flavia PICHIORRI, 2020. Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* [online]. **10**(12), 1065. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10121065

KIRSCH, D. G., A. DOSEFF, B. N. CHAU, D. S. LIM, N. C. DE SOUZA-PINTO, R. HANSFORD, M. B. KASTAN, Y. A. LAZEBNIK a J. M. HARDWICK, 1999. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(30), 21155–21161. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.30.21155

KOJIMA, Kensuke, Marina KONOPLEVA, Teresa MCQUEEN, Susan O'BRIEN, William PLUNKETT a Michael ANDREEFF, 2006a. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [online]. **108**(3), 993–1000. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-12-5148

KOJIMA, Kensuke, Marina KONOPLEVA, Ismael J. SAMUDIO, Masato SHIKAMI, Maria CABREIRA-HANSEN, Teresa MCQUEEN, Vivian RUVOLO, Twee TSAO, Zhihong ZENG, Lyubomir T. VASSILEV a Michael ANDREEFF, 2005. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* [online]. **106**(9), 3150–3159. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-02-0553

KOJIMA, Kensuke, Marina KONOPLEVA, Ismael J. SAMUDIO, Wendy D. SCHOBBER, William G. BORNMANN a Michael ANDREEFF, 2006b. Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* [online]. **5**(23), 2778–2786. ISSN 1551-4005. Dostupné z: doi:10.4161/cc.5.23.3520

KRAJEWSKI, Marcin, Przemyslaw OZDOWY, Loyola D'SILVA, Ulli ROTHWEILER a Tad A. HOLAK, 2005. NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nature Medicine* [online]. **11**(11), 1135–1136; author reply 1136-1137. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1105-1135

*KRUSE, Jan-Philipp a Wei GU, 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* [online]. **137**(4), 609–622. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.04.050

KUBBUTAT, M. H., S. N. JONES a K. H. VOUSDEN, 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* [online]. **387**(6630), 299–303. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/387299a0

KUBBUTAT, Michael H. G., Robert L. LUDWIG, Margaret ASHCROFT a Karen H. VOUSDEN, 1998. Regulation of Mdm2-Directed Degradation by the C Terminus of p53. *Molecular and Cellular Biology*. **18**(10), 5690–5698. ISSN 0270-7306.

LAI, Charles P., Osama MARDINI, Maria ERICSSON, Shilpa PRABHAKAR, Casey MAGUIRE, John W. CHEN, Bakhos A. TANNOUS a Xandra O. BREAKEFIELD, 2014. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS nano* [online]. **8**(1), 483–494. ISSN 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/nn404945r

LAI, Z., K. R. AUGER, C. M. MANUBAY a R. A. COPELAND, 2000. Thermodynamics of p53 binding to hdm2(1-126): effects of phosphorylation and p53 peptide length. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **381**(2), 278–284. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.2000.1998

LÁZARO-IBÁÑEZ, Elisa, Farid N. FARUQU, Amer F. SALEH, Andreia M. SILVA, Julie TZU-WEN WANG, Janusz RAK, Khuloud T. AL-JAMAL a Niek DEKKER, 2021. Selection of Fluorescent, Bioluminescent, and Radioactive Tracers to Accurately Reflect Extracellular Vesicle Biodistribution in Vivo. *ACS Nano* [online]. **15**(2), 3212–3227. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.0c09873

LI, Muyang, Christopher L. BROOKS, Foon WU-BAER, Delin CHEN, Richard BAER a Wei GU, 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **302**(5652), 1972–1975. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1091362

LINARES, Laëtitia K., Arnd HENGSTERMANN, Aaron CIECHANOVER, Stefan MÜLLER a Martin SCHEFFNER, 2003. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **100**(21), 12009–12014. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2030930100

LINDSLEY, R. Coleman, Brenton G. MAR, Emanuele MAZZOLA, Peter V. GRAUMAN, Sarah SHAREEF, Steven L. ALLEN, Arnaud PIGNEUX, Meir WETZLER, Robert K. STUART, Harry P. ERBA, Lloyd E. DAMON, Bayard L. POWELL, Neal LINDEMAN, David P. STEENSMA, Martha WADLEIGH, Daniel J. DEANGELO, Donna NEUBERG, Richard M. STONE a Benjamin L. EBERT, 2015. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* [online]. **125**(9), 1367–1376. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-11-610543

LONG, Jianting, Brian PARKIN, Peter OUILLETTE, Dale BIXBY, Kerby SHEDDEN, Harry ERBA, Shaomeng WANG a Sami N. MALEK, 2010. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* [online]. **116**(1), 71–80. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-01-261628

MA, Jianhong, John D. MARTIN, Hong ZHANG, Kurt R. AUGER, Thau F. HO, Robert B. KIRKPATRICK, Michael H. GROOMS, Kyung O. JOHANSON, Peter J. TUMMINO, Robert A. COPELAND a Zhihong LAI, 2006. A second p53 binding site in the central domain of Mdm2 is essential for p53 ubiquitination. *Biochemistry* [online]. **45**(30), 9238–9245. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi060661u

*MASHOURI, Ladan, Hassan YOUSEFI, Amir Reza AREF, Ali Mohammad AHADI, Fatemeh MOLAEI a Suresh K. ALAHARI, 2019. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer* [online]. **18**(1), 75. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-019-0991-5

MAYO, L. D., J. J. TURCHI a S. J. BERBERICH, 1997. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Research*. **57**(22), 5013–5016. ISSN 0008-5472.

MEARS, Rainy, Rachel A. CRAVEN, Sarah HANRAHAN, Nick TOTTY, Carol UPTON, Sarah L. YOUNG, Poulam PATEL, Peter J. SELBY a Rosamonde E. BANKS, 2004. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* [online]. **4**(12), 4019–4031. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200400876

MIHARA, Motohiro, Susan ERSTER, Alexander ZAIKA, Oleksi PETRENKO, Thomas CHITTENDEN, Petr PANCOSKA a Ute M. MOLL, 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* [online]. **11**(3), 577–590. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/s1097-2765(03)00050-9

MIN, Qing-Hua, Xiao-Zhong WANG, Jing ZHANG, Qing-Gen CHEN, Shu-Qi LI, Xiao-Qing LIU, Jing LI, Jing LIU, Wei-Ming YANG, Yu-Huan JIANG, Yan-Mei XU, Jin LIN, Qiu-Fang GAO, Fan SUN, Lei ZHANG a Bo HUANG, 2018. Exosomes derived from imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells mediate a horizontal transfer of drug-resistant trait by delivering miR-365. *Experimental*

Cell Research [online]. **362**(2), 386–393. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2017.12.001

MONTECALVO, Angela, Adriana T. LARREGINA, William J. SHUFESKY, Donna Beer STOLZ, Mara L. G. SULLIVAN, Jenny M. KARLSSON, Catherine J. BATY, Gregory A. GIBSON, Geza ERDOS, Zhiliang WANG, Jadranka MILOSEVIC, Olga A. TKACHEVA, Sherrie J. DIVITO, Rick JORDAN, James LYONS-WEILER, Simon C. WATKINS a Adrian E. MORELLI, 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* [online]. **119**(3), 756–766. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-02-338004

MORELLI, Adrian E., Adriana T. LARREGINA, William J. SHUFESKY, Mara L. G. SULLIVAN, Donna Beer STOLZ, Glenn D. PAPWORTH, Alan F. ZAHORCHAK, Alison J. LOGAR, Zhiliang WANG, Simon C. WATKINS, Louis D. FALO a Angus W. THOMSON, 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* [online]. **104**(10), 3257–3266. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2004-03-0824

NAKANO, Y., T. NAOE, H. KIYOI, K. KITAMURA, S. MINAMI, S. MIYAWAKI, N. ASOU, K. KURIYAMA, S. KUSUMOTO, C. SHIMAZAKI, H. AKIYAMA, K. SAITO, M. NISHIMURA, T. MOTOJI, K. SHINAGAWA, H. SAITO a R. OHNO, 2000. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology* [online]. **65**(1), 23–31. ISSN 0902-4441. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0609.2000.90138.x

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2023. *Acute Myeloid Leukemia (AML) Recent Trends in SEER Age-Adjusted Incidence Rates, 2000-2021* [online]. [vid. 2023-11-13]. Dostupné z: https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=96&data_type=1&graph_type=2&compareBy=age_range&chk_age_range_1=1&chk_age_range_9=9&chk_age_range_141=141&chk_age_range_157=157&hdn_rate_type=1&sex=1&race=1&hdn_stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_count=on&hdn_view=0&advopt_show_apc=on&advopt_display=2#resultsRegion0

NIEVERGALL, Eva, Hayley S. RAMSHAW, Agnes S. M. YONG, Mark BIONDO, Samantha J. BUSFIELD, Gino VAIRO, Angel F. LOPEZ, Timothy P. HUGHES, Deborah L. WHITE a Devendra K. HIWASE, 2014. Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. *Blood* [online]. **123**(8), 1218–1228. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-12-475194

NIKULENKOV, F., C. SPINLER, H. LI, C. TONELLI, Y. SHI, M. TURUNEN, T. KIVIOJA, I. IGNATIEV, A. KEL, J. TAIPALE a G. SELIVANOVA, 2012. Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death and Differentiation* [online]. **19**(12), 1992–2002. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2012.89

NOLTE-'T HOEN, Esther N. M., Sonja I. BUSCHOW, Stephen M. ANDERTON, Willem STOORVOGEL a Marca H. M. WAUBEN, 2009. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* [online]. **113**(9), 1977–1981. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-08-174094

PAROLINI, Isabella, Cristina FEDERICI, Carla RAGGI, Luana LUGINI, Simonetta PALLESCI, Angelo DE MILITO, Carolina COSCIA, Elisabetta IESSI, Mariantonia LOGOZZI, Agnese MOLINARI, Marisa COLONE, Massimo TATTI, Massimo SARGIACOMO a Stefano FAIS, 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of Biological*

Chemistry [online]. **284**(49), 34211–34222. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.041152

PEINADO, Héctor, Maša ALEČKOVIĆ, Simon LAVOTSHKIN, Irina MATEI, Bruno COSTA-SILVA, Gema MORENO-BUENO, Marta HERGUETA-REDONDO, Caitlin WILLIAMS, Guillermo GARCÍA-SANTOS, Cyrus GHAJAR, Ayuko NITADORI-HOSHINO, Caitlin HOFFMAN, Karen BADAL, Benjamin A. GARCIA, Margaret K. CALLAHAN, Jianda YUAN, Vilma R. MARTINS, Johan SKOG, Rosandra N. KAPLAN, Mary S. BRADY, Jedd D. WOLCHOK, Paul B. CHAPMAN, Yibin KANG, Jacqueline BROMBERG a David LYDEN, 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* [online]. **18**(6), 883–891. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.2753

PISITKUN, Trairak, Rong-Fong SHEN a Mark A. KNEPPER, 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **101**(36), 13368–13373. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0403453101

PLESCA, Dragos, Suparna MAZUMDER a Alexandru ALMASAN, 2008. DNA Damage Response and Apoptosis. *Methods in enzymology* [online]. **446**, 107–122. ISSN 0076-6879. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(08)01606-6

POYUROVSKY, Masha V, Christina PRIEST, Alex KENTISIS, Katherine L B BORDEN, Zhen-Qiang PAN, Nikola PAVLETICH a Carol PRIVES, 2007. The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. *The EMBO Journal* [online]. **26**(1), 90–101. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601465

QUINTÁS-CARDAMA, A., C. HU, A. QUTUB, Y. H. QIU, X. ZHANG, S. M. POST, N. ZHANG, K. COOMBES a S. M. KORNBLAU, 2017. p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia* [online]. **31**(6), 1296–1305. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2016.350

RAPOSO, G., H. W. NIJMAN, W. STOOORVOGEL, R. LIEJENDEKKER, C. V. HARDING, C. J. MELIEF a H. J. GEUZE, 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **183**(3), 1161–1172. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.183.3.1161

REIS, Bernhard, Lori JUKOFSKY, Gong CHEN, Giovanni MARTINELLI, Hua ZHONG, W. Venus SO, Michael J. DICKINSON, Mark DRUMMOND, Sarit ASSOULINE, Maneja HASHEMYAN, Michel THERON, Steven BLOTNER, Je-Hwan LEE, Margaret KASNER, Sung-Soo YOON, Ruediger RUEGER, Karen SEITER, Steven A. MIDDLETON, Kevin R. KELLY, Norbert VEY, Karen YEE, Gwen NICHOLS, Lin-Chi CHEN a William E. PIERCEALL, 2016. Acute myeloid leukemia patients' clinical response to idasanutlin (RG7388) is associated with pre-treatment MDM2 protein expression in leukemic blasts. *Haematologica* [online]. **101**(5), e185–e188. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2015.139717

SAKURAI, Kaori, Carsten SCHUBERT a Daniel KAHNE, 2006. Crystallographic analysis of an 8-mer p53 peptide analogue complexed with MDM2. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **128**(34), 11000–11001. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja063102j

*SAULTZ, Jennifer N. a Ramiro GARZON, 2016. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **5**(3), 33. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm5030033

SECCHIERO, Paola, Elisabetta MELLONI, Maria Grazia DI IASIO, Mario TIRIBELLI, Erika RIMONDI, Federica CORALLINI, Valter GATTEI a Giorgio ZAULI, 2009. Nutlin-3 up-regulates the expression of Notch1 in both myeloid and lymphoid leukemic cells, as part of a negative feedback antiapoptotic mechanism. *Blood* [online]. **113**(18), 4300–4308. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-11-187708

*SELIVANOVA, Galina, 2014. Wild type p53 reactivation: from lab bench to clinic. *FEBS letters* [online]. **588**(16), 2628–2638. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2014.03.049

SHIEH, S. Y., M. IKEDA, Y. TAYA a C. PRIVES, 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* [online]. **91**(3), 325–334. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(00)80416-x

SHVARTS, A., W. T. STEEGENGA, N. RITECO, T. VAN LAAR, P. DEKKER, M. BAZUINE, R. C. VAN HAM, W. VAN DER HOUVEN VAN OORDT, G. HATEBOER, A. J. VAN DER EB a A. G. JOCHEMSEN, 1996. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO Journal*. **15**(19), 5349–5357. ISSN 0261-4189.

SCHAGEMAN, Jeffrey, Emily ZERINGER, Mu LI, Tim BARTA, Kristi LEA, Jian GU, Susan MAGDALENO, Robert SETTERQUIST a Alexander V. VLASSOV, 2013. The Complete Exosome Workflow Solution: From Isolation to Characterization of RNA Cargo. *BioMed Research International* [online]. **2013**, 253957. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/253957

SMEENK, Leonie, Simon J. VAN HEERINGEN, Max KOEPEL, Bianca GILBERT, Eva JANSSEN-MEGENS, Hendrik G. STUNNENBERG a Marion LOHRUM, 2011. Role of p53 Serine 46 in p53 Target Gene Regulation. *PLoS ONE* [online]. **6**(3), e17574. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0017574

SPINLER, C., E. HEDSTRÖM, H. LI, J. DE LANGE, F. NIKULENKOV, A. F. A. S. TEUNISSE, M. VERLAAN-DE VRIES, V. GRINKEVICH, A. G. JOCHEMSEN a G. SELIVANOVA, 2011. Abrogation of Wip1 expression by RITA-activated p53 potentiates apoptosis induction via activation of ATM and inhibition of HdmX. *Cell Death and Differentiation* [online]. **18**(11), 1736–1745. ISSN 1350-9047. Dostupné z: doi:10.1038/cdd.2011.45

STOORVOGEL, Willem, Ger J. STROUS, Hans J. GEUZE, Viola OORSCHOT a Alan L. SCHWARTZT, 1991. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* [online]. **65**(3), 417–427. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90459-C

STRACHOTOVÁ, Dita, Aleš HOLOUBEK, Kateřina WOLFOVÁ, Barbora BRODSKÁ a Petr HEŘMAN, 2023. Cytoplasmic localization of Mdm2 in cells expressing mutated NPM is mediated by p53. *The FEBS journal* [online]. **290**(17), 4281–4299. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/febs.16810

STUFFERS, Susanne, Catherine SEM WEGNER, Harald STENMARK a Andreas BRECH, 2009. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* [online]. **10**(7), 925–937. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x

SUGIMOTO, Koichi, Hideo TOYOSHIMA, Ryuichi SAKAI, Kiyoshi MIYAGAWA, Koichi HAGIWARA, Fuyuki ISHIKAWA, Fumimaro TAKAKU, Yoshio YAZAKI a Hisamaru HIRAI, 1992. Frequent Mutations in the p53 Gene in Human Myeloid Leukemia Cell Lines. *Blood* [online]. **79**(9), 2378–2383. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V79.9.2378.2378

THÉRY, Clotilde, Sebastian AMIGORENA, Graça RAPOSO a Aled CLAYTON, 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. **Chapter 3**, Unit 3.22. ISSN 1934-2616. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

TIAN, Tian, Yan-Liang ZHU, Yue-Yuan ZHOU, Gao-Feng LIANG, Yuan-Yuan WANG, Fei-Hu HU a Zhong-Dang XIAO, 2014a. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **289**(32), 22258–22267. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.588046

TIAN, Yanhua, Suping LI, Jian SONG, Tianjiao JI, Motao ZHU, Gregory J. ANDERSON, Jingyan WEI a Guangjun NIE, 2014b. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* [online]. **35**(7), 2383–2390. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.083

TKACH, Mercedes, Joanna KOWAL, Andres E. ZUCCHETTI, Lotte ENSERINK, Mabel JOUVE, Danielle LANKAR, Michael SAITAKIS, Lorena MARTIN-JAULAR a Clotilde THÉRY, 2017. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *The EMBO journal* [online]. **36**(20), 3012–3028. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.15252/embj.201696003

TOVAR, Christian, Bradford GRAVES, Kathryn PACKMAN, Zoran FILIPOVIC, Brian HIGGINS, Mingxuan XIA, Christine TARDELL, Rosario GARRIDO, Edmund LEE, Kenneth KOLINSKY, Kwong-Him TO, Michael LINN, Frank PODLASKI, Peter WOVKULICH, Binh VU a Lyubomir T. VASSILEV, 2013. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Research* [online]. **73**(8), 2587–2597. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2807

TOVAR, Christian, James ROSINSKI, Zoran FILIPOVIC, Brian HIGGINS, Kenneth KOLINSKY, Holly HILTON, Xiaolan ZHAO, Binh T. VU, Weiguo QING, Kathryn PACKMAN, Ola MYKLEBOST, David C. HEIMBROOK a Lyubomir T. VASSILEV, 2006. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **103**(6), 1888–1893. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0507493103

VASSILEV, Lyubomir T., Binh T. VU, Bradford GRAVES, Daisy CARVAJAL, Frank PODLASKI, Zoran FILIPOVIC, Norman KONG, Ursula KAMMLOTT, Christine LUKACS, Christian KLEIN, Nader FOTOUHI a Emily A. LIU, 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **303**(5659), 844–848. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1092472

VU, Binh, Peter WOVKULICH, Giacomo PIZZOLATO, Allen LOVEY, Qingjie DING, Nan JIANG, Jin-Jun LIU, Chunlin ZHAO, Kelli GLENN, Yang WEN, Christian TOVAR, Kathryn PACKMAN, Lyubomir VASSILEV a Bradford GRAVES, 2013. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Medicinal Chemistry Letters* [online]. **4**(5), 466–469. ISSN 1948-5875. Dostupné z: doi:10.1021/ml4000657

WALLACE, Maura, Erin WORRALL, Susanne PETTERSSON, Ted R. HUPP a Kathryn L. BALL, 2006. Dual-site regulation of MDM2 E3-ubiquitin ligase activity. *Molecular Cell* [online]. **23**(2), 251–263. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2006.05.029

WANG, Xinjiang, Junru WANG a Xuejun JIANG, 2011. MdmX Protein Is Essential for Mdm2 Protein-mediated p53 Polyubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(27), 23725–23734. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.213868

WEI ZHANG, Wenqun ZHONG, Beike WANG, Jiegang YANG, Jingbo YANG, Ziyang YU, Zhiyuan QIN, Alex SHI, Wei XU, Cathy ZHENG, Lynn M. SCHUCHTER, Giorgos C. KARAKOUSIS, Tara C. MITCHELL, Ravi AMARAVADI, Meenhard HERLYN, Haidong DONG, Phyllis A. GIMOTTY, George DAABOUL, Xiaowei XU a Wei GUO, 2022. ICAM-1-mediated Adhesion is a Prerequisite for Exosome-induced T Cell Suppression. *Developmental cell* [online]. **57**(3), 329-343.e7. ISSN 1534-5807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2022.01.002

WIKLANDER, Oscar P. B., Joel Z. NORDIN, Aisling O'LOUGHLIN, Ylva GUSTAFSSON, Giulia CORSO, Imre MÄGER, Pieter VADER, Yi LEE, Helena SORK, Yiqi SEOW, Nina HELDRING, Lydia ALVAREZ-ERVITI, C. I. Edvard SMITH, Katarina LE BLANC, Paolo MACCHIARINI, Philipp JUNGEBLUTH, Matthew J. A. WOOD a Samir El ANDALOUSSI, 2015. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **4**, 26316. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v4.26316

WOJTUSZKIEWICZ, Anna, Gerrit J. SCHUURHUIS, Floortje L. KESSLER, Sander R. PIERSMA, Jaco C. KNOL, Thang V. PHAM, Gerrit JANSEN, René J. P. MUSTERS, Johan VAN MEERLOO, Yehuda G. ASSARAF, Gertjan J. L. KASPERS, Sonja ZWEEGMAN, Jacqueline CLOOS a Connie R. JIMENEZ, 2016. Exosomes Secreted by Apoptosis-Resistant Acute Myeloid Leukemia (AML) Blasts Harbor Regulatory Network Proteins Potentially Involved in Antagonism of Apoptosis. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. **15**(4), 1281–1298. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M115.052944

WOLFOVÁ, Kateřina, Petra OTEVŘELOVÁ, Aleš HOLOUBEK a Barbora BRODSKÁ, 2023. Nucleolar phosphoprotein modifications as a marker of apoptosis induced by RITA treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* [online]. **1870**(7), 119501. ISSN 1879-2596. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2023.119501

WU, X., J. H. BAYLE, D. OLSON a A. J. LEVINE, 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development* [online]. **7**(7A), 1126–1132. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.7.7a.1126

YEE, Karen, Giovanni MARTINELLI, Sarit ASSOULINE, Margaret KASNER, Norbert VEY, Kevin R. KELLY, Mark W. DRUMMOND, Michael DENNIS, Karen SEITER, Steven BLOTNER, Lori JUKOFSKY, Steven MIDDLETON, Jianguo ZHI, Gong CHEN, Hua ZHONG a Gwen NICHOLS, 2013. Phase 1b Study Of The MDM2 Antagonist RG7112 In Combination With 2 Doses/Schedules Of Cytarabine. *Blood* [online]. **122**(21), 498. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V122.21.498.498

ZHANG, Haiying, Daniela FREITAS, Han Sang KIM, Kristina FABIJANIC, Zhong LI, Haiyan CHEN, Milica Tesic MARK, Henrik MOLINA, Alberto Benito MARTIN, Linda BOJMAR, Justin FANG, Sham RAMPERSAUD, Ayuko HOSHINO, Irina MATEI, Candia M. KENIFIC, Miho NAKAJIMA, Anders Peter MUTVEI, Pasquale SANSONE, Weston BUEHRING, Huajuan WANG, Juan Pablo JIMENEZ, Leona COHEN-GOULD, Navid PAKNEJAD, Matthew BRENDEL, Katia MANOVA-TODOROVA, Ana MAGALHÃES, José Alexandre FERREIRA, Hugo OSÓRIO, André M. SILVA, Ashish MASSEY, Juan R. CUBILLOS-RUIZ, Giuseppe GALLETI, Paraskevi GIANNAKAKOU, Ana Maria CUERVO, John BLENIS, Robert SCHWARTZ, Mary Sue BRADY, Héctor PEINADO,

Jacqueline BROMBERG, Hiroshi MATSUI, Celso A. REIS a David LYDEN, 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology* [online]. **20**(3), 332–343. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/s41556-018-0040-4

ZHAO, Carolyn Y., Vera V. GRINKEVICH, Fedor NIKULENKOV, Wenjie BAO a Galina SELIVANOVA, 2010. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* [online]. **9**(9), 1847–1855. ISSN 1551-4005. Dostupné z: doi:10.4161/cc.9.9.11545

ZHENG, Yongjiang, Chenggong TU, Jingwen ZHANG a Jinheng WANG, 2019. Inhibition of multiple myeloma-derived exosomes uptake suppresses the functional response in bone marrow stromal cell. *International Journal of Oncology* [online]. **54**(3), 1061–1070. ISSN 1791-2423. Dostupné z: doi:10.3892/ijco.2019.4685

ZHONG, Hua, Gong CHEN, Lori JUKOFSKY, David GEHO, Sung Won HAN, Fabian BIRZELE, Sabine BADER, Lucia HIMMELEIN, James CAI, Zayed ALBERTYN, Mark ROTHE, Laurent ESSIOUX, Helmut BURTSCHER, Steven A. MIDDLETON, Ruediger RUEGER, Lin-Chi CHEN, Markus DANGL, Gwen NICHOLS a William E. PIERCEALL, 2015. MDM2 antagonist clinical response association with a gene expression signature in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* [online]. **171**(3), 432–435. ISSN 1365-2141. Dostupné z: doi:10.1111/bjh.13411

* Review