

PREDIKCE ODPOVĚDI PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ NA LÉČBU TYROZIN-KINÁZOVÝMI INHIBITORY: *IN VITRO* ANALÝZA VYBRANÝCH SIGNÁLNÍCH MOLEKUL *BCR::ABL1* POZITIVNÍCH LEUKEMICKÝCH BUNĚK



Autor: Lacek M.

Školitel: Divoký V., doc. RNDr. Ph.D. (Ústav biologie), klinický konzultant Faber E., prof. MUDr. CSc. (Hemato-onkologická klinika)

ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) představuje myeloproliferativní onemocnění charakterizované přítomností fúzního genu *BCR::ABL1* a jeho produktu BCR::ABL1 tyrozinkinázy (TK), která je zodpovědná za myeloproliferativní fenotyp. Současná inhibice downstreamových signálních drah je s úspěchem využívána v terapii CML. *BCR::ABL1* signalizuje pomocí adaptorového proteinu Crkl, který kromě jiného odráží s úspěchem monitoring míry inhibice *BCR::ABL1* TK, přičemž komplex BCR-ABL1-Crkl je aktivátor dráhy PI3K-AKT (proliferační, přežívání, diferenciací, ovlivnění autofagie), aktivace komplexem GRB2-SOS (aktivovaný BCR::ABL1) downstreamově aktivizuje MAPK-ERK kaskádu (proliferační efekt). Aberantní aktivací JAK2-STAT5 si leukemické buňky zabezpečují cytokinovou nezávislost; aktivací BCL-XL i antiapoptotický efekt. Stejně tak dochází i k aktivaci SFK kináz (částečně nezávislé na BCR::ABL1) a c-Myc (role v blastické fázi)¹. V současnosti jsou využívány TKI, z kterých byly využity imatinib (inhibitor ABL TK), dasatinib (duální inhibitor ABL TK a SFK family) a LGR-3922, látka syntetizovaná laboratoří růstových faktorů PŘF UP. Pro hodnocení senzitivity a/nebo rezistence patientských buněk na TKI se využívá monitorování fosforylace (p) dvou BCR::ABL1 TK aktivovaných signálních molekul, Crkl a SFK.

CÍLE

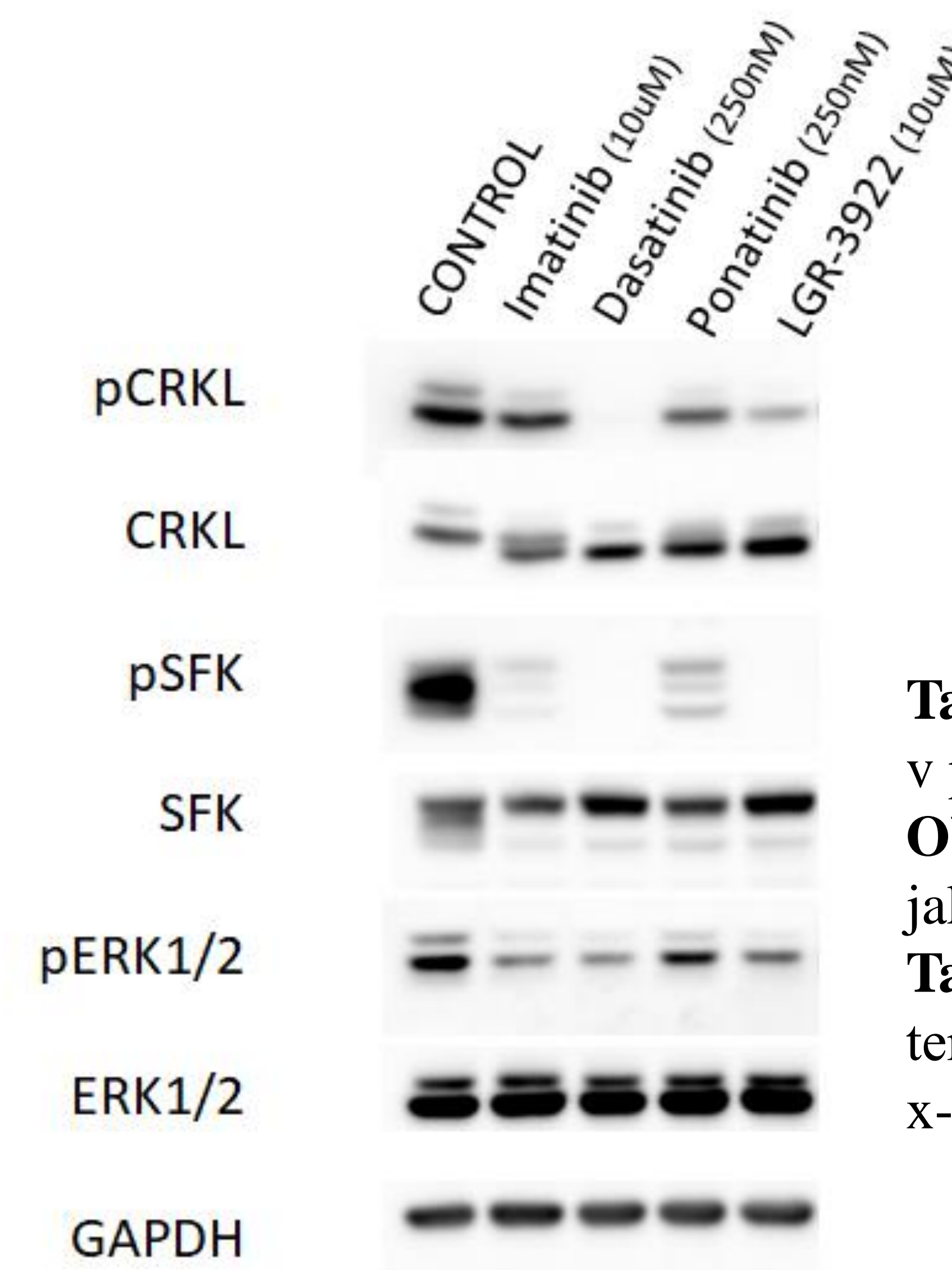
- Zhodnotit senzitivitu BCR::ABL1 leukemických buněk k TKI po jejich *in vitro* kultivaci s inhibitory, s využitím monitorování inhibice pCrkl a pSFK průtokovou cytometrií (PC);
- Porovnat v *in vitro* testech účinnost klinicky používaných TKI imatinibu (IM) a dasatinibu (DAS) s novým experimentálním inhibitorem LGR-3922 (LGR), vyvinutým na PŘF UP.

MATERIÁL A METODY

Pro optimalizaci analýzy pCrkl a pSFK PC *in vitro* byla vybrána BCR::ABL1 pozitivní linie K562. Buňky byly udržovány v RPMI 1640 doplněné o 1% P/S; 10% FBS (Gibco®). Po dosažení buněčnosti 10⁶/mL, bylo 2x10⁶ buněk kultivovaných v 50 ml RPMI/FBS/PS médiu s nebo bez inhibitory. Koncentrace TKI byly stanovené na 10 μM pro IM, LGR-3922 a 250 mM pro DAS.

Na western blot byly po hodinové inkubaci buňky promyty vychlazeným PBS a přeneseny do 30 μl IP pufru s inhibitory proteáz a fosfatáz; inkubovány hodinu na ledě za resuspendace. Po centrifugaci 16 000 rpm, 4°C, 30 minut byl supernatant uschován pro western blot. Proteiny byly rozděleny na SDS-PAGE gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly inkubovány přes noc s primární protilátkou při teplotě 4°C, následně se sekundární hodinu při laboratorní teplotě a vyvolané chemiluminiscenčními roztoky. Jako promývací roztok byl použit TBS s 0,5% Tween 20.

Pro průtokovou cytometrii byly po hodinové inkubaci buňky rozdělené do dvou řad zkumavek (pCrkl, pSFK), každá 12,5 ml, promyty vychlazeným PBS, fixované 2% *p*-formaldehydem a permeabilizované 50% vychlazeným methanolem, následně barvené anti-pCrkl (Tyr207, 1:50 s 5% BSA, rabbit) anebo anti-pSFK (Tyr416, 1:50 s 5% BSA, rabbit) od Cell Signaling Technologies®, promývací roztok byl 1% BSA s 0,5% Tween 20. Sekundární protilátka byla použita Alexa Fluor 488 od Invitrogen® (IgG goat anti-rabbit, 1:1000 s 5% BSA). Pro PC analýzu bylo použito 50 000 buněk z každého vzorku na Cytomics FC 500 cytometru (CXP2.0 software). Leukemické buňky pacientů byly získány z LiHeparin lýzou, promyty Opti-MEM médiem (Gibco®) a kultivovány. Po hodinové inkubaci se leukemické buňky fixovaly 2% *p*-formaldehydem a permeabilizovaly vychlazeným 90% methanolem. X-median byl stanoven z gatingu vybrané populace.



VÝSLEDKY

	pSFK		Aktivita BCR::ABL1 (pCrkl)	
	pSFK - medián	inhibice (%)	pCrkl - medián	inhibice (%)
0	41,3		6,7	
IM	20,0	51,6	3,5	47,8
DAS	7,5	81,8	2,0	70,0
PON	28,0	32,2	4,8	28,4
LGR	5,9	85,7	2,9	57,0

Tab. č. 1,2: Výsledky PC se sledovaným x-mediánu a dopočítané inhibice v procentech pCrkl (aktivita BCR::ABL1 TK), pSFK.

Obr. č. 1: Western blot analýza buněk K562 s detekcí pCRKL/CRKL, pSFK/SFK; jako housekeeping gen byl použit GAPDH.

Tab. č. 3: *In vitro* kultivace leukemických buněk pacientů s TKI se sledováním terapeutické predikce pomocí vyjádření míry inhibice v procentech; vyjádřením x-medián Crkl (**100-75% senzitivny**, **74-25% parciální odpověď**, **24-0% rezistentní**)²

pacient no.	pCrkl (% inhibice)				pSFK (x-medián)				Doplňující data
	0	IM	DAS	LGR	0	IM	DAS	LGR	
1	0	75	85	20	7,2	5,8	5,3	7	CML, optim. odp. na IM, DAS; LGR 250nM
2	0	31	23	36	11	10,6	7,3	9,3	CML, parc. odp. na IM, LGR; LGR 250nM
3	0	45	37	35	11	11	8,6	8,3	CML, parc. odp. na IM, DAS, LGR 250nM
4	0	7	40	34	49	43,6	26,3	18,4	CML, parc. odp. na DAS, LGR; LGR 10μM
5	0	0	18	7	34	14	14	17	CML, rezistence na IM, DAS, LGR; LGR 10μM
6	0	31	10	25	47	38	29	26,3	CML, parc. odp. na IM, LGR; LGR 10μM
7					26	14,7	9,3	10	ALL, LGR 10μM

ZÁVĚR

In vitro kultivace leukemických buněk v přítomnosti TKI a následná PC analýza může být aplikována jako prediktivní nástroj terapeutické odpovědi na TKI u pacientů s CML při dobré optimalizaci fixace a permeabilizace s dosažením dostatečné separace CD15+ (myeloidní buňky, granulocyty) a CD15- populaci pro přesný gating a interpretaci.

LGR-3922 na buněčném modelu K562 uspěl jako inhibitor BCR::ABL1 a SFK, u části pacientů (N=4) vykazoval parciální odpověď pCrkl inhibice, zbylá část pacientů (N=2) byla rezistentní. pSFK aktivita byla výrazně snížena u 3 CML pacientů (při koncentraci 10 μM). U vzorku ALL (N=1) vykázal srovnatelný inhibiční efekt SFK s dasatinibem při koncentraci o 10 μM.

REFERENCE

- Krupkova L, Mojzíkova R, Novotný J, Gazdova J, Divoká M, Skoumalová I, Rohon P, Jarosova M, Indrak K, Faber E, Divoký V. Flow cytometric monitoring of the *in vitro* inhibition of the phosphorylation of CRKL and of SRC family kinases in patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Int J Lab Hematol.* 2015
- Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res.* 2012

Podpořeno grantem IGA_LF_2021_004 a IGA_LF_2022_003.
Čj. Etické komise FNOL 39/18.