

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Tereza Kabičková

Potenciální terapeutické cíle u buněk CML rezistentních na TKI léky
Potential Therapeutic Targets in Drug-Resistant CML

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Ondřej Toman, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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, 15.8.2013

Tereza Kabíčková

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Mgr. Ondřejovi Tomanovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost nejen při psaní této diplomové práce. Děkuji také celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji rodině a blízkým lidem za podporu po celou dobu mého studia.

Práce byla vypracována na Oddělení buněčné fyziologie v Ústavu hematologie a krevní transfuze.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Abstrakt | 1 |
| 2. Abstract..... | 2 |
| 3. Seznam zkratek | 3 |
| 4. Úvod | 7 |
| 5. Literární přehled..... | 8 |
| 5.1. Chronická myeloidní leukémie | 8 |
| 5.2. Bcr-Abl kináza a biologické vlastnosti Bcr-Abl ⁺ buněk | 8 |
| 5.3. Terapie CML..... | 11 |
| 5.3.1. Léčba tyrosinkinázovými inhibitory TKI | 11 |
| 5.3.1.1. Inhibitory první generace - Imatinib | 11 |
| 5.3.1.2. Inhibitory druhé generace - Nilotinib a Dasatinib | 12 |
| 5.3.1.3. Další inhibitory | 14 |
| 5.3.2. Rezistence k tyrosinkinázovému inhibitoru imatinibu | 15 |
| 5.3.2.1. Bcr-Abl dependentní mechanismy rezistence k imatinibu | 16 |
| 5.3.2.2. Bcr-Abl independentní mechanismy rezistence k imatinibu | 18 |
| 5.3.3. Leukemické kmenové buňky | 21 |
| 5.4. Potenciální terapeutické cíle u TKI rezistentních CML buněk..... | 22 |
| 5.4.1. Wnt signální dráha | 22 |
| 5.4.1.1. Kanonická Wnt signální dráha..... | 22 |
| 5.4.1.2. Nekanonické Wnt signální dráhy..... | 25 |
| 5.4.1.2.1. Wnt/PCP signální dráha..... | 25 |
| 5.4.1.2.2. Wnt/Ca ²⁺ signální dráha..... | 26 |
| 5.4.2. Další potenciální terapeutické cíle u TKI rezistentních CML buněk | 28 |
| 5.4.2.1. mTOR signální dráha..... | 28 |
| 5.4.2.2. JAK2 kináza..... | 29 |
| 5.4.2.3. p38 MAP kinázy | 29 |
| 6. Materiál..... | 31 |
| 6.1. Modelový organismus – buněčná linie | 31 |
| 6.2. Roztoky pro kultivaci buněk | 31 |
| 6.3. Roztok pro přípravu buněčných lyzátů | 32 |
| 6.4. Roztoky na izolaci jader..... | 32 |
| 6.5. Roztok pro měření koncentrace proteinů | 32 |
| 6.6. Materiál pro SDS-PAGE a Western Blot..... | 32 |
| 6.7. Materiál na MTT esej..... | 36 |
| 6.8. Materiál na 2-DE..... | 36 |
| 7. Metody | 38 |
| 7.1. Kultivace a pasážování buněčných linií..... | 38 |
| 7.2. Vývoj rezistentních linií..... | 38 |
| 7.3. Příprava buněčných lyzátů | 39 |
| 7.4. Izolace buněčných jader..... | 39 |
| 7.5. Determinace/stanovení koncentrace proteinů | 40 |
| 7.6. Příprava vzorků na SDS-PAGE..... | 41 |
| 7.7. SDS-PAGE | 42 |
| 7.8. Western blot..... | 42 |
| 7.9. Imunodetekce..... | 42 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 7.10. | MTT test stanovení procenta živých buněk | 43 |
| 7.11. | Zpracování dat | 44 |
| 7.12. | Vyhodnocení signálů z filmů | 44 |
| 7.13. | Vyhodnocení MTT eseje..... | 44 |
| 7.14. | 2-DE elektroforéza..... | 44 |
| 8. | Výsledky..... | 47 |
| 8.1. | Vývoj rezistentní linie CML-T1 | 47 |
| 8.2. | Proteomická analýza senzitivní a rezistentní CML-T1 linie..... | 48 |
| 8.3. | Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů | 49 |
| 8.4. | Hledání proteinů jako zásahových míst s terapeutickým potenciálem | 51 |
| 8.4.1. | NHERF1: Regulace Mrp2 transportéru | 56 |
| 8.4.2. | NHERF1: Regulace Na ⁺ /H ⁺ přenašeče (NHE-1)..... | 56 |
| 8.4.3. | NHERF1: Napojení na Wnt signalizaci..... | 58 |
| 8.4.3.1. | Proteiny kanonické Wnt signální dráhy..... | 58 |
| 8.4.3.2. | Proteiny (kanonické i) nekanonické Wnt signální dráhy..... | 74 |
| 8.4.3.2.1. | Proteiny Wnt/Ca ²⁺ signální dráhy | 77 |
| 8.4.3.2.2. | Proteiny Wnt/PCP signální dráhy | 78 |
| 8.4.3.3. | Navržení zásahového místa..... | 83 |
| 8.4.3.4. | Cytoplazmatické a jaderné markery použité pro Western blot..... | 85 |
| 8.4.3.5. | Kontrola nanášky proteinů:..... | 85 |
| 9. | Diskuze | 86 |
| 10. | Perspektivy | 96 |
| 11. | Závěr | 97 |
| 11. | Seznam literatury..... | 98 |

1. Abstrakt

Uvedení selektivního tyrosin kinázového inhibitoru (TKI) imatinibu do klinické praxe v léčbě chronické myeloidní leukémie (CML) výrazně zlepšilo prognózu onemocnění u pacientů. Přesto ale u určitých skupin pacientů dochází ke vzniku rezistence na imatinib, ztrátě odpovědi na léčbu a relapsu onemocnění, což limituje terapeutický potenciál tohoto léku.

Dlouhodobým selektivním tlakem zvyšujících se koncentrací imatinibu v kultivačním médiu jsme vytvořili linii buněk lidské CML (CML-T1) rezistentní na imatinib. Proteomickou analýzou byly pomocí dvourozměrné elektroforézy (2-DE) porovnány expresní profily proteinů u CML-T1 buněk senzitivních a rezistentních na imatinib. Použitím MALDI MS bylo u rezistentních buněk identifikováno 11 diferenciatně exprimovaných proteinů. Výrazný nárůst exprese proteinu „Na⁺/H⁺ exchange regulatory cofactor“ (NHERF1) u rezistentních buněk byl následně potvrzen pomocí western blotu. Protein NHERF1 obsahuje interakční vazebné domény účastnící se Wnt signalizace. Byly sledovány změny v expresi proteinů Wnt signálních drah mezi senzitivní a rezistentní linií. U rezistentních buněk byla zjištěna zvýšená exprese proteinu Dishevelled 3 (Dvl 3) a snížená exprese transkripčního faktoru NFAT. Transkripční faktor NFAT je v buňce aktivován defosforylací fosfatázou kalcineurinem, což má za následek jeho translokaci do jádra. Tento buněčný děj byl navržen jako slabé místo v metabolismu rezistentních buněk, které by mohlo být atakováno specifickými klinicky dostupnými inhibitory (cyklosporin A a FK-506) v koncentracích které poškodí výhradně rezistentní buňky. Testovali jsme citlivost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk k těmto inhibitorům a dosáhli jsme selektivní eliminace rezistentních buněk při koncentracích cyklosporinu A 5μM a FK-506 100nM. Tato práce navrhuje defosforylací transkripčního faktoru NFAT jako potenciální zásahové místo s terapeutickým potenciálem u CML-T1 buněk rezistentních na imatinib.

Klíčová slova: CML, rezistence, Bcr-Abl⁺, TKI, imatinib, NFAT, cyklosporin A, Wnt signalizace, 2-DE

2. Abstract

The therapy of common haematological malignancy chronic myeloid leukaemia (CML) has dramatically improved patient prognosis upon approval of selective tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib. However, subset of patients develops resistance to imatinib, which limits its therapeutic potential.

We derived imatinib resistant CML-T1 human cell line by a long term increase of imatinib concentration in growth media. We have compared the protein expression profiles of the imatinib resistant and imatinib sensitive CML-T1 cells using proteomic analysis by 2DE. We have identified 11 differentially expressed proteins in the resistant cell line by MALDI MS. Na^+/H^+ exchange regulatory cofactor (NHERF1) was significantly upregulated in the resistant cells, as confirmed by western blotting. Protein NHERF1 contains interactive binding domains known to be involved in regulation of Wnt signaling. We have uncovered dysregulation in expression levels of proteins involved in Wnt signaling in resistant CML-T1 cells, such as upregulation of Dishevelled 3 (Dvl3) and downregulation of transcription factor NFAT. Phosphatase calcineurin activates NFAT by dephosphorylation, causing subsequential NFAT translocation to the nucleus. We have considered this cellular event as a weak spot in the metabolism of the resistant cells, which could be attacked by some specific, clinically used inhibitors, such as cyclosporine A or FK-506. We have tested the vulnerability of the imatinib resistant cells to these inhibitors and achieved selective elimination of the resistant cells by using cyclosporine A at 5 μM and FK-506 at 100nM concentration. This study suggests NFAT dephosphorylation as a potential therapeutic target in CML-T1 chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib.

Key words: CML, resistance, Bcr-Abl⁺, TKI, imatinib, NFAT, cyclosporin A, Wnt signaling, 2-DE

3. Seznam zkratek

| | |
|--------------------|---|
| 2-DE | dvourozměrná elektroforéza |
| ABCB1 | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 |
| ABCG2 | ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 |
| Abl | Abelson murine leukemia viral oncogene homolog |
| AGP | alpha-1-acid glycoprotein (alfa-1-kyselý glykoprotein) |
| APC | adenomatous polyposis coli |
| ATF-2 | activating transcription factor 2 |
| ATP | adenosine triphosphate (adenosin trifosfát) |
| Axin | axis inhibition protein |
| Bcl-x _L | B-cell lymphoma-extra large |
| Bcr | breakpoint cluster region |
| BSA | bovine serum albumin (bovinní sérový albumin) |
| β-TrCP | β-transducin repeat-containing E3 ubiquitin ligase |
| CaMKII | calmodulin-dependent protein kinase II (kalmodulin dependentní kináza II) |
| cDNA | complementary DNA |
| Cdc42 | small GTPase of Rho family |
| CK | casein kinase (kasein kináza) |
| CML | chronic myeloid leukemia (chronická myeloidní leukémie) |
| c-Myc | cellular myelocytomatosis oncogene |
| COX-1/2 | cyclooxygenase 1/2 (cyklooxygenáza 1/2) |
| Crkl | v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like |
| CsA | cyclosporin A (cyklosporin A) |
| Daam1 | Disheveled-associated activator of morphogenesis 1 |
| DCB | 3,4-dichlorobenzamil hydrochloride |
| DEP | Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| DNA | deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina) |
| Dvl | dishevelled |
| DTT | dithiothreitol |

| | |
|----------------|---|
| EIPA | 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride |
| FoxO | Forkhead box |
| Fzd | frizzled family receptor |
| Fyn | Src family tyrosine-protein kinase |
| Gab2 | GRB2-associated-binding protein 2 |
| GMP | granulocyte-macrophage progenitor |
| GSK3 β | glycogen synthase kinase 3 β (glykogen syntáza kináza 3 β) |
| Hck | hematopoietic cell kinase |
| hOCT1 | human organic cation transporter 1 |
| Hsp | heat shock protein |
| HRP | horseradish peroxidase (křenová peroxidáza) |
| JAK | Janus kinase |
| JNK/SAPK | c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase |
| LEF | lymphoid enhancer factor |
| LRP5/6 | low density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein 5/6 |
| LSC | leukemia stem cell (leukemická kmenová buňka) |
| Lyn | Lck/Yes-related novel protein tyrosin kinase |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase (mitogenem aktivovaná protein kináza) |
| MAPKKK/MEKK1-4 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase |
| MDR | multidrug resistance |
| MKK4/SEK1 | mitogen-activated kinase kinase |
| MKK7 | mitogen-activated kinase kinase |
| MMP-7 | matrix metalloproteinase-7 (matrix metaloproteináza-7) |
| mRNA | messenger RNA (mediátorová mRNA) |
| Mrp2 | Multidrug resistance-associated protein 2 |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| mTORC1/2 | mTOR complex 1/2 |
| NCX | sodium/calcium antiporter |
| NFAT | nuclear factor of activated T-cells |
| NF κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |

| | |
|----------|---|
| NHE-1 | sodium/hydrogen antiporter 1 |
| NHERF1 | Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory factor 1 |
| NLK | Nemo-like kinase |
| OD | optical density (optická hustota, absorbance) |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCP | planar cell polarity (planární buněčná polarita) |
| PDE6 | phosphodiesterase 6 (fosfodiesteráza 6) |
| PDZ | post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1) |
| Ph | Philadelphia chromosome |
| PI3-K | phosphatidylinositide 3-kinase (fosfatidylinositol 3-kináza) |
| PKB/AKT | protein kinase B/AKT8 virus oncogene cellular homolog (protein kináza B) |
| PKC | protein kinase C (protein kináza C) |
| P-LRP6 | fosforylovaná forma LRP6 |
| p38 MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| Rac | small GTPase of Rho family |
| Ras | small GTPase of Ras superfamily |
| Rho | small GTPase of Rho family |
| RNA | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina) |
| ROCK | Rho-associated protein kinase |
| RT-PCR | reverse transcription-polymerase chain reaction |
| SAPK/JNK | Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminální kináza) |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| siRNA | small interfering RNA |
| Src | Rous sarcoma oncogene cellular homolog, non-receptor tyrosine kinase |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| SH2 | Src homology domain 2 (Src homologní doména 2) |

| | |
|--------|---|
| SH3 | Src homology domain 3 (Src homologní doména 3) |
| TAK1 | TGF-beta activated kinase 1 |
| TCF | T-cell factor |
| TKI | tyrosin kinase inhibitor (tyrosin kinázový inhibitor) |
| Wnt | Wingless/Int-1 |
| 4E-BP1 | Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein |

Zkratky vysvětleny v anglickém jazyce, případný český název v závorce.

V textu jsou dále používány jednopísmenné a trojpísmenné názvy aminokyselin.

4. Úvod

Chronická myeloidní leukémie (CML) patří mezi čtyři základní typy leukémií. CML je charakterizovaná přítomností leukemického fúzního genu „breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“ (BCR-ABL) a u většiny nemocných také nálezem Philadelphského chromozomu. Bcr-Abl je konstitutivně aktivní tyrosin kináza ovlivňující řadu signalizačních drah v buňce. Výzkum role Bcr-Abl v patogenezi CML přispěl k vývoji tyrosin kinázových inhibitorů (TKI) (Druker and Lydon, 2000). Prvním z těchto TKI léků je imatinib, který významně zlepšil prognózu pacientů s CML. U některých pacientů ale dochází k obnovení (relapsu) onemocnění následkem vzniku rezistence k imatinibu podmíněné různými mechanizmy, např. bodovými mutacemi v Bcr-Abl kináze. Byly proto vyvinuty další inhibitory této kinázy, jako např. dasatinib a nilotinib. Oba jsou účinnější než imatinib a inhibují většinu mutovaných variant kinázy Bcr-Abl.

Léčba CML, kdy v případě selhání imatinibu je aplikován nilotinib nebo dasatinib, může mít za následek vznik křížové rezistence na tyto inhibitory (Sawyers, 2013). Rezistence na TKI léky významně ovlivňuje léčbu pacientů s CML a vede k zavádění nových terapeutických strategií. Jednou z možností je vývoj nových TKI cílených na mutované Bcr-Abl kinázy. Vystává ovšem i otázka finančního aspektu léčby CML. Kombinovaná terapie pomocí několika TKI léků je nákladná.

Dalším možným přístupem terapie nemocných, rezistentních na TKI, je inhibice alternativních signalizačních drah ovlivňujících přežívání TKI rezistentních buněk. Rezistence na TKI léky je totiž doprovázena změnami na molekulární úrovni, např. v genomu a proteomu rezistentních buněk. Detailní znalost těchto změn, např. na úrovni proteomu, by mohla pomoci identifikovat potenciální zásahové místo u buněk rezistentních na TKI a následně toto místo pomocí vhodných inhibitorů atakovat.

Cílem této práce byl vývoj linií CML-T1 buněk rezistentních na TKI metodou dlouhodobého selekčního tlaku zvyšující se koncentrace TKI léků v médiu. Naším záměrem bylo na základě proteomické analýzy imatinib rezistentní linie CML-T1 buněk navrhnout a testovat zásahová místa s terapeutickým potenciálem, tedy nalézt takový protein, který u rezistentní linie představuje buněčnou slabinu a jehož inhibicí by došlo k selektivní eliminaci rezistentních buněk (Petrák et al., 2009).

5. Literární přehled

5.1. Chronická myeloidní leukémie

CML je klonální myeloproliferativní onemocnění, jehož příčinou je transformace hematopoetické kmenové buňky. CML představuje přibližně 14% všech leukemií (Jemal et al., 2004) a dle progresu se dělí do třech fází. Z chronické fáze onemocnění během přibližně pěti let vlivem vzniku dalších mutací (nestability genomu) přechází do fáze akcelerované a následně fáze blastické krize (Deininger et al., 2000). Onemocnění má nespecifické a heterogenní příznaky, mezi hlavní patří úbytek hmotnosti, hepatosplenomegalie, zvýšený počet bílých krvinek (Kantarjian et al., 1985), poruchy imunity, krvácivost, anémie a únava.

CML je první maligní onemocnění, u kterého byla objevena patogenetická abnormalita – nová kináza Bcr-Abl, která vzniká v důsledku přestavby chromozómů. Objev Philadelphského chromozomu (Nowell and Hungerford, 1960) jako první stálé genetické abnormality asociované se specifickým typem leukémie byl průlomem ve výzkumu rakoviny. V roce 1973 bylo zjištěno, že tento abnormální chromozom je výsledkem reciproké translokace (9;22) (q34;q11) (Rowley, 1973), která zahrnuje ABL (lidský homolog genu Abelsonova viru myši leukémie; Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) protoonkogen na chromozomu 9 (Bartram et al., 1983) a BCR (breakpoint cluster region) gen na chromozomu 9 (Groffen et al., 1984). Fúzní gen BCR-ABL kóduje fúzní protein Bcr-Abl s deregulovanou tyrosin kinázovou aktivitou (Lugo et al., 1990).

5.2. Bcr-Abl kináza a biologické vlastnosti Bcr-Abl⁺ buněk

Mezi hlavní mechanismy uplatňující se v maligní transformaci Bcr-Abl onkogenem patří změna adheze ke stromálním buňkám a extracelulární matrix (Gordon et al., 1987), aktivace mitogenní signalizace prostřednictvím Ras proteinu (Puil et al., 1994) a snížená apoptóza (Bedi et al., 1994).

CML progenitorové buňky vykazují sníženou adhezivitu ke stromálním buňkám kostní dřeně. Je známo, že adheze ke stromatu negativně reguluje proliferaci a CML buňky

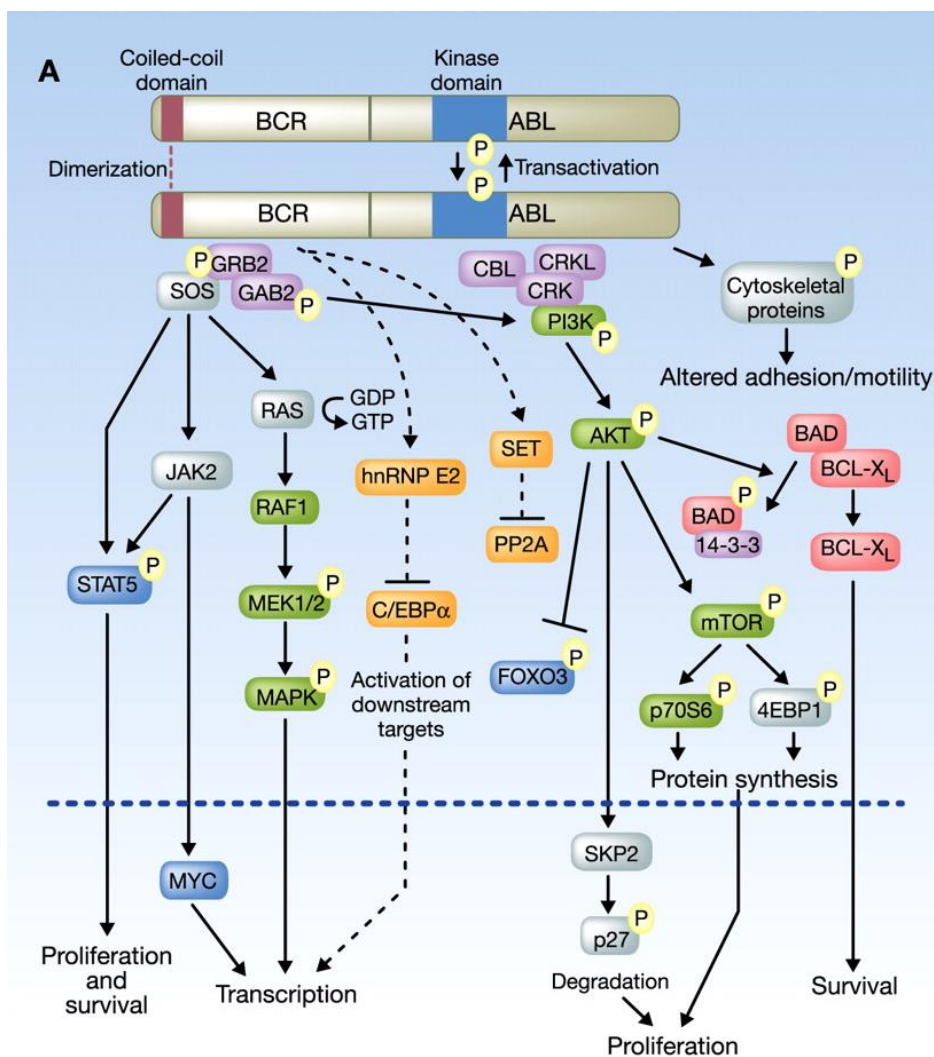
unikají této regulaci na základě jejich změněných adhezivních vlastností (Gordon et al., 1987).

Bcr-Abl aktivuje v buňce mnoho signálních drah (Obr. 1), mezi nejvýznamnější patří např. Ras a mitogenem-aktivovaná protein kinázová dráha (MAP-kinázová dráha), fosfatidylinositol 3-kinázová dráha (PI3-kinázová dráha) a dráha „Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription“ (JAK-STAT). Autofosforylovaný tyrosin 177 na Bcr-Abl kináze je důležitý pro aktivaci kinázy PI3K, která zprostředkovává aktivaci protein kinázy B (PKB/AKT; protein kinase B), a proteinu Ras (Chu et al., 2007). Ras protein dále aktivuje MAP-kinázovou signální dráhu a dochází tak k abnormální buněčné proliferaci. Bcr-Abl reguluje PI3-kinázovou signální dráhu, jejíž aktivita je potřebná pro proliferaci Ph pozitivních buněk (Skorski et al., 1995). PI3K/AKT signální dráha se podílí na leukemogenezi hematopoetických buněk (Skorski et al., 1997). PKB/AKT kináza podporuje přežívání buněk potlačením aktivity FoxO transkripčních faktorů (Brunet et al., 1999), zvyšuje proliferaci buněk indukci proteazomální degradace inhibitoru cyklin-dependentních kináz p27 (Andreu et al., 2005) a aktivuje „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) dráhu (Ly et al., 2003).

Transkripční faktory STAT (STAT1, STAT3, STAT5) jsou konstitutivně aktivní v Bcr-Abl pozitivních buněčných liniích i v mononukleárních buňkách izolovaných z periferní krve několika pacientů s CML (Ilaria et al., 1996). Transkripční faktory STAT jsou aktivovány fosforylací prostřednictvím „Janus kinase 2“ (JAK2 kinázy), ale v případě CML buněk dochází k jejich fosforylaci i přímo prostřednictvím Bcr-Abl kinázy (Carlesso et al., 1996; Ilaria et al., 1996) nebo nepřímo fosforylací kinázou Hck (Klejman et al., 2002). Aktivace transkripčního faktoru STAT5 přispívá k maligní transformaci CML buněk (de Groot et al., 1999; Sillaber et al., 2000). Transkripční faktor STAT5 má v hematopoetických buňkách řadu pleiotropních funkcí, reguluje proliferaci, diferenciaci, ale i apoptózu (Nosaka et al., 1999). Funkce STAT5 v Bcr-Abl transformovaných buňkách je primárně antiapoptotická, protože STAT5 indukuje expresi antiapoptotického proteinu Bcl-x_L (Horita et al., 2000).

Dalším důležitým cílem Bcr-Abl kinázové signalizace je transkripční faktor c-Myc. Bcr-Abl kináza zvyšuje expresi c-Myc protoonkogenu prostřednictvím aktivace JAK2 kinázy. Aktivovaná JAK2 kináza nejen zvyšuje expresi c-Myc mRNA, ale také zabraňuje

degradaci c-Myc proteinu ubiquitin/26S proteazomální dráhou. Zvýšená exprese c-Myc je inhibována imatinibem, případně inhibitorem JAK2 kinázy. (Xie et al., 2002). V přítomnosti imatinibu c-Myc indukuje aberantní syntézu DNA přispívající ke genetické nestabilitě CML buněk. Exprese c-Myc proteinu je vyšší u neléčených pacientů a pacientů neodpovídajících na léčbu, což podporuje roli proteinu c-Myc během progresu CML pravděpodobně prostřednictvím indukce genetické nestability (Albajar et al., 2011).



Obr. 1 Zjednodušené schéma signálních drah aktivovaných Bcr-Abl kinázou.

Dimerizace Bcr-Abl spouští autofosforylaci této kinázy, která ji aktivuje a dochází k vytvoření vazebných míst pro adaptorové proteiny (fialově) jako je GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2). Signální dráhy ovlivněné Bcr-Abl kinázou zahrnují zvýšenou proliferaci, inhibici apoptózy a změny v buněčné adhezi a migraci. Některé z těchto drah a jejich součásti jsou zde ukázány - transkripční faktory (modře), serin threoninové kinázy (zeleně), proteiny spojované s apoptózou (červeně). Dráhy spojované u udržení CML kmenových buněk a Bcr-Abl zprostředkovanou transformací (oranžově). (Převzato a upraveno z O'Hare et al., 2011).

5.3. Terapie CML

Vývoj léků cílených na Bcr-Abl kinázu dramaticky změnil terapeutické strategie a prognózu pacientů s nově diagnostikovanou CML (Pavlovsky et al., 2009). Předtím byly jediné používané terapeutické možnosti u pacientů s CML interferon alfa či transplantace kostní dřeně. V současné době transplantace kostní dřeně stále zůstává potenciální léčebnou metodou využívanou zejména u pacientů, kteří náležitě neodpovídají na léčbu TKI. Nicméně nárůst molekulárně cílené terapie TKI během poslední doby odstartovaný objevem imatinibu dlouhodobě změnil terapeutický přístup k CML (Quintás-Cardama and Cortes, 2006).

5.3.1. Léčba tyrosinkinázovými inhibitory TKI

TKI blokují hlavní transformační vlastnost onkoproteinu Bcr-Abl proteinu, která spočívá v konstitutivní tyrosin kinázové aktivitě, a proto přímá inhibice této aktivity je nejlogičtější prostředkem vyřazení tohoto onkoproteinu z činnosti (Deininger et al., 2000).

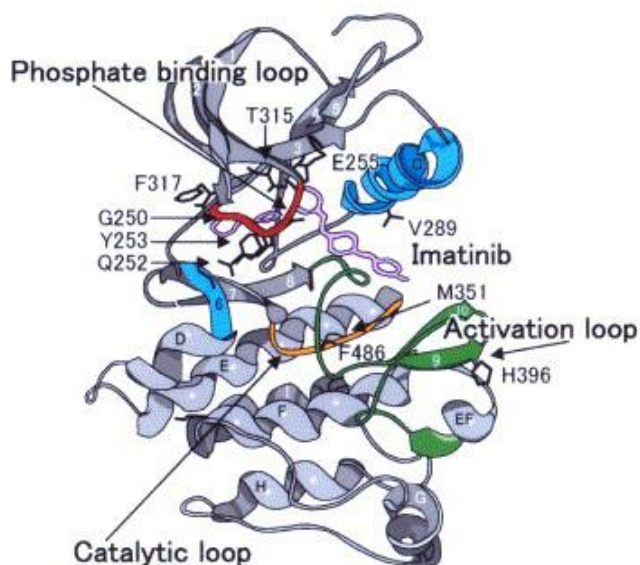
5.3.1.1. Inhibitory první generace - Imatinib

Imatinib je příkladem prvního léku, který byl cíleně navržen při léčbě rakovinového krevního onemocnění; inhibuje funkci specifického proteinu (Bcr-Abl tyrosin kinázy), jež má vliv na patogenezi specifického onemocnění - chronické myeloidní leukémie (Druker et al., 1996). Předpokládalo se, že takto cílená terapie mířená na mechanismus onemocnění bude více efektivní a méně toxická (Druker et al., 1996).

Imatinib se částečně váže do adenosin trifosfát (ATP) vazebného místa Bcr-Abl kinázy a pro vazbu inhibitoru je důležité, aby kináza byla v inaktivní (monomerní) konformaci, ve které je centrálně umístěná aktivační smyčka nefosforylovaná (Obr. 2) (Schindler et al., 2000).

Imatinib selektivně potlačuje růst CML primárních buněk a buněčných linií *in vitro*, ale i *in vivo* (Druker et al., 1996). Imatinib byl poprvé testován na jaře roku 1998, kdy byla zvyšujícími se koncentracemi imatinibu zahájena první fáze klinických testů u CML pacientů, u kterých selhala léčba interferonem. Ukázalo se, že imatinib je málo toxický, má minimální vedlejší účinky a je vysoce efektivní (Druker et al., 2001). Těmito testy byla

potvrzena esenciální role Bcr-Abl kinázové aktivity v případě CML, což vytvořilo potenciál pro další vývoj protirakovinových léků založených na inhibici specifické molekulární abnormality formou cílené terapie (Druker et al., 2001). Vysoká účinnost a bezpečnost užívání imatinibu byla potvrzena klinickými studiemi fáze 2 a 3. Dávka 400 mg/den byla vybrána do druhé fáze klinických testů a byla podávána interferon rezistentním či intolerantním pacientům v (pozdní) chronické fázi (Kantarjian et al., 2002). Ve třetí fázi testů byla u pacientů s nově diagnostikovanou CML v chronické fázi účinnost léčby imatinibem porovnávána s původní léčebnou kombinací interferonu alfa a nízkými dávkami cytorabinu. Bylo vyhodnoceno, že imatinib je lepší jako terapie první volby (O'Brien et al., 2003).



Obr. 2 Abl kináza v komplexu s imatinibem (růžově) s vyznačenými některými pozicemi mutací. Phosphate binding loop-fosfát vazebná smyčka, Catalytic loop-katalytická smyčka, Activation loop-aktivační smyčka (Převzato a upraveno z Tauchi and Ohyashiki, 2004).

5.3.1.2. Inhibitory druhé generace - Nilotinib a Dasatinib

Zavedení léčby CML imatinibem znamenalo průlom v efektivitě terapie, z dlouhodobého hlediska však začaly být zaznamenávány případy selhání léčby a regrese onemocnění následkem vzniku rezistence (viz. kapitola 5.3.2). Snaha překonat rezistenci k imatinibu a zlepšit tak prognózu pacientů s CML vedla k vývoji inhibitorů nové generace

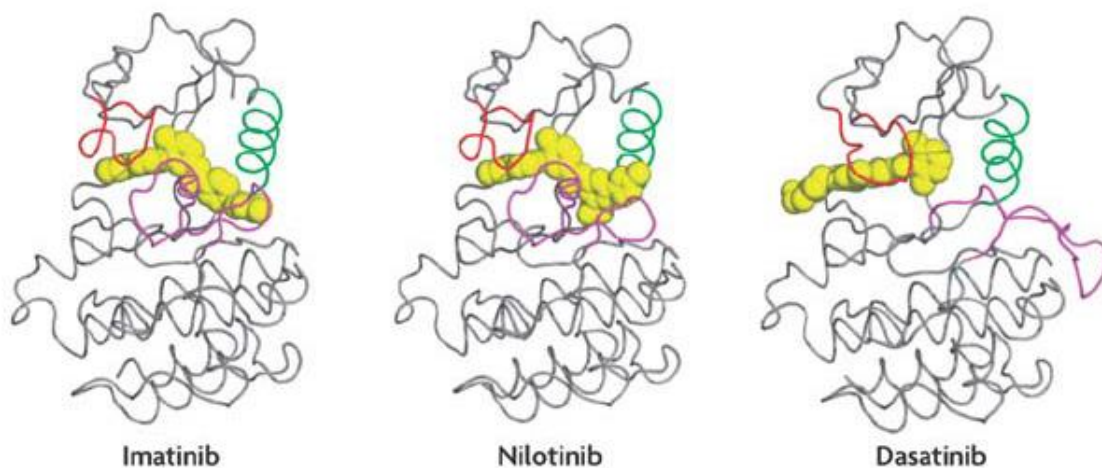
(Cilloni and Saglio, 2012). Nové inhibitory byly vyvíjeny tak, aby byly účinnější, měly méně striktní vazebné požadavky na Bcr-Abl a v některých případech, aby byly schopné inhibovat i jiné kinázy přispívající k rezistenci. Mezi tyto inhibitory druhé generace patří nilotinib a duální inhibitor Bcr-Abl i Src kináz dasatinib (Cilloni and Saglio, 2012). Nilotinib se (podobně) jako imatinib váže na inaktivní konformaci Bcr-Abl kinázy, s P smyčkou složenou přes ATP vazebné místo, a aktivační smyčkou blokující substrát vazebné místo (Obr. 3). Svou vazbou narušuje ATP vazebné místo, blokuje aktivaci Bcr-Abl kinázy a vyřazuje tak katalytickou aktivitu enzymu (Manley et al., 2005; Weisberg et al., 2006). Nilotinib je 20x účinnější než imatinib a inhibuje Bcr-Abl kinázovou aktivitu většiny klinicky významných Bcr-Abl mutantů kromě mutace T315I (O'Hare et al., 2005).

Strukturní studie duálních Src/Abl inhibitorů pyrido[2,3-d]pyrimidinové třídy ukázaly, že tyto látky váží ATP vazebné místo bez ohledu na pozici aktivační smyčky, která může být v aktivní nebo inaktivní konformaci (Nagar et al., 2002). Dasatinib je tedy ATP kompetitivní, duálně specifický Src/Abl kinázový inhibitor (Lombardo et al., 2004), který je 325x účinnější než imatinib (O'Hare et al., 2005). Dasatinib je schopen inhibovat všechny imatinib-rezistentní Bcr-Abl mutace kromě T315I (Shah et al., 2004).

Inhibitory druhé generace (nilotinib a dasatinib) přispěly k individualizaci léčby s ohledem na stadium nemoci a mutace v Bcr-Abl kináze. Zdá se, že použití inhibitorů druhé generace jako léků první volby v terapii CML bude hlavním cílem klinického výzkumu v následujících letech. Vzhledem k dosavadním výsledkům při použití inhibitorů druhé generace jako léků první volby zůstává stále několik oblastí, které by mohly optimalizovat léčbu CML (Cilloni and Saglio, 2012).

Hlavním předmětem zájmu jsou mutantní klony Bcr-Abl včetně mutace T315I, které jsou rezistentní i k druhé generaci TKI. Ačkoliv tyto nesenzitivní klony vznikají zřídka, malý zlomek pacientů, u kterého k jejich vzniku dojde, selhává v odpovědi na léčbu a dojde u nich k progresi onemocnění (O'Hare et al., 2011; Cilloni and Saglio, 2012).

Dalším cílem je kompletně zlikvidovat leukemické kmenové buňky (LSC, leukemia stem cells), které jsou rezistentní k TKI a představují zdroj/rezervoár, ze kterého může leukémie znovu propuknout, když je léčba TKI zastavena (Carter et al., 2010).



Obr. 3 Porovnání vazby různých Abl inhibitorů, imatinibu, nilotinibu a dasatinibu.

Imatinib (vlevo) a nilotinib (uprostřed) a dasatinib (vpravo). Pozice P smyčky (červeně), A smyčky (fialová) se liší podle toho, zda je kináza v aktivní nebo inaktivní konformaci. Imatinib a nilotinib váží Bcr-Abl kinázu v inaktivní konformaci. Pozice C helixu (zeleně) se mění podle toho, zda je kináza v aktivní nebo inaktivní konformaci. (Převzato a upraveno z Weisberg et al., 2007).

5.3.1.3. Další inhibitory

Široké spektrum nově vyvíjených TKI inhibitorů je v dnešní době v preklinické fázi testování a u některých bylo klinické vyhodnocení nedávno dokončeno (Quintás-Cardama and Cortes, 2006; Bixby and Talpaz, 2009; O'Hare et al., 2011). Mezi tyto sloučeniny patří např. Bosutinib (SKI-606) a Ponatinib.

Bosutinib byl vyvinut jako inhibitor Src kináz při léčbě pevných nádorů, ale podobně jako dasatinib je schopen inhibovat i Bcr-Abl kinázu. Jeho antiproliferační a proapoptotické účinky u rakovinových buněk byly prokázány *in vitro* i *in vivo* (Golas et al., 2003). Bosutinib kromě inhibice Bcr-Abl kinázy zabraňuje i fosforylaci transkripčního faktoru STAT5 (Golas et al., 2003). Byla také prokázána jeho účinnost i proti některým dalším mutacím Bcr-Abl kinázy kromě T315I (Puttini et al., 2006).

Ponatinib je nová látka, která by potenciálně mohla být efektivní při léčbě CML včetně pacientů neodpovídajících na stávající terapii imatinibem, dasatinibem nebo nilotinibem. Ponatinib je schopen inhibovat jak nativní Bcr-Abl kinázu, tak i mutované formy tohoto enzymu včetně T315I mutace (O'Hare et al., 2009).

Některé látky blokující Bcr-Abl kinázu ATP-nekompetitivním způsobem mohou představovat alternativu pro pacienty, u kterých vzniknou imatinib insenzitivní Bcr-Abl mutace (Quintás-Cardama and Cortes, 2006). Mezi tyto látky patří např. ON12380 (Onconova Therapeutics). Inhibitor ON12380 a imatinib synergisticky inhibují nativní Bcr-Abl, což naznačuje, že se ON12380 váže na jiné místo Bcr-Abl než imatinib. Inhibitor ON12380 se váže do substrát-vazebného místa Bcr-Abl a soutěží tak s přirozenými substráty tohoto enzymu jako je např. protein kináza Crkl. Účinnost inhibitoru ON12380 byla potvrzena *in vivo* na myších, kterým byla indukována leukémie intravenózní injekcí buněk exprimujících mutaci T315I Bcr-Abl kinázy (Gumireddy et al., 2005).

5.3.2. Rezistence k tyrosinkinázovému inhibitoru imatinibu

Progresi onemocnění u imatinib rezistentních pacientů lze zabránit přechodem na léčbu inhibitory tyrosin kináz druhé generace - nilotinib a dasatinib. Přesto ale riziko vzniku nových bodových mutací, které ovlivňují vazbu léku, expresi Bcr-Abl nebo jeho aktivitu při dlouhodobé léčbě, stále existuje. Existuje snaha o vývoj komplexního pan-Bcr-Abl inhibitoru, který by inhiboval široké spektrum imatinib-rezistentních bodových mutací v Bcr-Abl kináze (včetně T315I) (Weisberg et al., 2007). Předpokládá se i používání kombinace více než jednoho Bcr-Abl inhibitoru (Weisberg et al., 2007).

Objasnění mechanismů rezistence má velký význam pro vývoj pokročilejších terapeutických strategií, jako např. kombinace imatinibu s konvenčními cytotoxickými léky, popř. v kombinaci s jinými inhibitory signální transdukce (Deininger et al., 2000). Použití specifických signálních transdukčních inhibitorů v kombinaci s Bcr-Abl inhibitory je vyžadováno za účelem dosáhnout efektivnější terapie se sníženým potenciálem k vývoji rezistence (Weisberg et al., 2007).

Pokroky ve výzkumu usnadnily vývoj impozantního množství malých molekul inhibitorů směřovaných na mutace v Bcr-Abl kináze nebo na alternativní kinázové dráhy, které zprostředkovávají rezistenci. Výzvy v léčbě CML pokračují a nadále se rozvíjí i výzkum v různých oblastech včetně vývoje nových terapeutických strategií, jak léčit nejen primární, ale i sekundární rezistenci (Bixby and Talpaz, 2009).

Zatímco v případě primární rezistence pacienti neodpovídají účinně na TKI od počátku léčby, v případě sekundární rezistence pacienti zpočátku odpovídající na léčbu přestanou po určité době na léčbu reagovat (Quintás-Cardama et al., 2009b).

5.3.2.1. Bcr-Abl dependentní mechanismy rezistence k imatinibu

Amplifikace BCR-ABL genu a zvýšená exprese Bcr-Abl kinázy

Amplifikace BCR-ABL genu spojená se zvýšenou expresí Bcr-Abl proteinu byla poprvé pozorována *in vitro* u rezistentních buněčných linií, které byly vytvořeny postupně se zvyšujícími dávkami imatinibu (Mahon et al., 2000). Tato studie byla provedena na vzorcích *in vitro* a nemusí představovat skutečný způsob vzniku klinické rezistence (Bixby and Talpaz, 2009). Bylo však prokázáno, že i ve vzorcích získaných přímo z imatinib rezistentních pacientů dochází k duplikaci BCR-ABL genu (Gorre et al., 2001). Zdá se, že hladina proteinu Bcr-Abl je těsně spojená se vznikem imatinib rezistentních mutantních subklonů. U buněk obsahujících vyšší hladiny Bcr-Abl proteinu (jako je tomu v blastické fázi CML) bylo pozorováno, že jsou méně senzitivní k imatinibu a mnohem rychleji vyvinou imatinib rezistentní mutantní subklony než buňky exprimující méně Bcr-Abl proteinu (Barnes et al., 2005).

Sledováním klinických patientských vzorků bylo zjištěno, že amplifikace BCR-ABL genu nepatří mezi nejčastější příčiny imatinibové rezistence, protože bodové mutace v kináze Bcr-Abl jsou mnohem častější (Hochhaus et al., 2002).

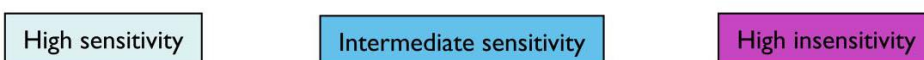
Bcr-Abl mutace

Bodové mutace v Abl kinázové doméně proteinu Bcr-Abl jsou nejčastější příčinou vývoje rezistence u pacientů, kteří původně odpovídali na léčbu imatinibem (Hochhaus et al., 2002). Mutace spadají do dvou skupin. Do první skupiny patří mutace, které ovlivňují aminokyseliny přímo vázající imatinib, druhou skupinu tvoří mutace, které zabraňují Bcr-Abl kináze dosažení inaktivní konformace nezbytné pro vazbu imatinibu (Shah et al., 2002). Mutace v Bcr-Abl kináze se vyskytují v imatinib vazebných místech, v P smyčce, A smyčce a v katalytické doméně (Obr. 4) (Shah et al., 2002). Vysoká frekvence bodových mutací je v P smyčce, která slouží jako vazebné místo pro ATP (Branford et al., 2002). Některé studie uvádějí, že mutace v P smyčce jsou spojeny s horší

prognózou (Branford et al., 2003), jiné práce toto pozorování nepotvrdily (Jabbour et al., 2006). Nicméně je možné, že rozdíly ve výsledcích byly způsobeny použitím inhibitorů druhé generace, které dříve nebyly dostupné pro pacienty, u kterých léčba imatinibem selhávala (Jabbour et al., 2006).

Skupina kolem Gorrea v r. 2001 dokumentovala (jako první) mutaci spojenou s rezistencí k imatinibu, která byla způsobena jednonukleotidovou substitucí C→ T na pozici 944 v ABL genu, která má za následek substituci treoninu za isoleucin (T315I) na 315 pozici aminokyselinové sekvence. Nedochází tak k tvorbě kritické vodíkové vazby mezi T315 a imatinibem a dále tato aminokyselinová substituce vytváří sterickou překážku pro vazbu tohoto inhibitoru (Gorre et al., 2001). Mutace T315I je příčinou rezistence nejen k imatinibu (Gorre et al., 2001), ale i k inhibitorům druhé generace nilotinibu (O'Hare et al., 2005) a dasatinibu (Shah et al., 2004), což představuje klíčový problém v léčbě CML (Ramirez et al., 2008). Uvedené tři inhibitory potřebují vytvořit vodíkovou vazbu s treoninem na pozici 315, aby se mohly vázat na svůj cíl. Je proto vynaloženo značné úsilí na nalezení léků, které by tuto mutaci překonaly (An et al., 2010).

| | Imatinib (nM) | Nilotinib (nM) | Dasatinib (nM) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Native BCR-ABL1 | 260 | 13 | 0.8 |
| M244V | 2000 | 38 | 1.3 |
| G250E | 1350 | 48 | 1.8 |
| Q252H | 1325 | 70 | 3.4 |
| Y253H | >6400 | 450 | 1.3 |
| Y253F | 3475 | 125 | 1.4 |
| E255K | 5200 | 200 | 5.6 |
| E255V | >6400 | 430 | 11 |
| V299L | 540 | NA | 18 |
| F311L | 480 | 23 | 1.3 |
| T315I | >6400 | >2000 | >200 |
| T315A | 971 | 61 | 125 |
| F317L | 1050 | 50 | 7.4 |
| F317V | 350 | NA | 53 |
| M351T | 880 | 15 | 1.1 |
| E355G | 2300 | NA | 1.8 |
| F359V | 1825 | 175 | 2.2 |
| V379I | 1630 | 51 | 0.8 |
| L387M | 1000 | 49 | 2 |
| H396R | 1750 | 41 | 1.3 |
| H396P | 850 | 41 | 0.6 |



Obr. 4 IC_{50} hodnoty (relativní koncentrace sloučeniny, která inhibuje 50% enzymatické aktivity) pro imatinib, nilotinib a dasatinib proti vybraným mutovaným formám Bcr-Abl kinázy exprimovaných v Ba/F3 buňkách. Native Bcr-Abl-nemutovaná Bcr-Abl; NA (not applicable)-nestanoveno; high sensitivity-vysoká citlivost; intermediate sensitivity-střední citlivost; high insensitivity-vysoká necitlivost. (Převzato a upraveno z Quintás-Cardama and Cortes, 2009a).

5.3.2.2. Bcr-Abl independentní mechanismy rezistence k imatinibu

Bcr-Abl dependentní mechanismy rezistence jsou primárně zodpovědné za vznik sekundární rezistence, existují ale další mechanismy imatinibové rezistence, které jsou popsány v nejrůznějších modelových systémech, nicméně ani jeden z nich nebyl jasně identifikován jako výhradní příčina klinické rezistence. Mezi tyto mechanismy patří

transport imatinibu z buňky či naopak do buňky, vazba imatinibu na alfa-1-kyselý glykoprotein a mnohé další (Bixby and Talpaz, 2009).

Transport imatinibu ven z buňky

ABC transportéry

„ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1“ (ABCB1) a „ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2“ (ABCG2) jsou ATP dependentní transportéry účastníci se transportu látek ven přes buněčnou membránu (Gottesman, 2002). Bylo zjištěno, že imatinib je substrátem pro ABCB1 transportér (Hamada et al., 2003; Thomas et al., 2004). Zvýšená exprese ABCB1 transportéru byla prokázána v Bcr-Abl pozitivní buněčné linii LAMA84-r (Mahon et al., 2000), nicméně u této linie byla prokázána i amplifikace Bcr-Abl genového produktu (Mahon et al., 2000) a nebylo zde rozlišeno mezi rezistencí k imatinibu způsobenou Bcr-Abl amplifikací nebo zvýšenou expresí ABCB1 (Bixby and Talpaz, 2009). Nadměrná exprese ABCB1 by mohla být spojena MDR fenotypem (rozvoj křížové rezistence ke strukturně nepříbuzným látkám včetně imatinibu – multidrug resistance) (Mahon et al., 2003; Assef et al., 2009) a přispívat k imatinibové rezistenci u buněčných linií (Mahon et al., 2003; Assef et al., 2009). Význam zvýšené exprese ABCB1 v případě klinické rezistence zůstává nejasný (Mahon et al., 2003). Zvýšená exprese ABCB1 by mohla hrát důležitou roli při vzniku rezistence v případě, kdy onemocnění není plně pod kontrolou, např. při progresi onemocnění či v prvních měsících terapie imatinibem (Galimberti et al., 2005). Role ABCB1 pumpy v rezistenci k imatinibu zůstává zatím nejasná; nadměrná exprese tohoto membránového transportéru v buněčné linii K-562 *in vitro* rezistenci k imatinibu nevyvolává a nelze vyloučit, že imatinib je nevhodným substrátem pro ABCB1 (Ferrao et al., 2003).

Dosud ne zcela objasněný vztah mezi ABCG2 transportérem a imatinibem je zdrojem kontroverzí. Podle některých autorů (Burger et al., 2004) je imatinib vhodný substrát pro ABCG2 transportér, podle jiných (Houghton et al., 2004) je inhibitorem tohoto transportéru.

Transport imatinibu do buňky „human organic cation transporter 1” (hOCT1)

Transport imatinibu do buňky prostřednictvím hOCT1 je také považován za důležitý faktor regulující intracelulární dostupnost imatinibu (Thomas et al., 2004). Diferenciální exprese nebo funkce tohoto transportéru v různých CML buněčných liniích ovlivňuje hladinu imatinibu v buňce. Použití specifických inhibitorů tohoto transportéru vyvolalo snížení transportu imatinibu do buňky (Thomas et al., 2004). Nicméně chybí zde prokázání korelace mezi sníženou hladinou imatinibu a jeho nižší účinností v buňce (Bixby and Talpaz, 2009). Polymorfismus hOCT1 transportéru ovlivňuje transport imatinibu do buňky a je tedy významným činitelem v pacientově odpovědi na imatinib, avšak omezené množství klinických vzorků je limitujícím faktorem této studie (White et al., 2006).

Alfa-1-kyselý glykoprotein (AGP)

Alfa-1-kyselý glykoprotein (AGP, alpha-1-acid glycoprotein) váže imatinib a zabraňuje tak jeho schopnosti inhibovat Bcr-Abl kinázovou aktivitu, přičemž tento efekt je možno zvrátit erythromycinem (Gambacorti-Passerini et al., 2000). Látky jako např. erythromycin soutěžící s imatinibem o vazebné místo na AGP mohou zvýšit koncentraci volného imatinibu a tím i jeho terapeutický potenciál. Erythromycinem indukované uvolnění imatinibu z AGP zvyšuje distribuci imatinibu do leukemických buněk (Gambacorti-Passerini et al., 2000). AGP ovlivňuje farmakokinetiku, plasmatické koncentrace i intracelulární distribuci imatinibu u CML pacientů. Plasmatické koncentrace imatinibu měřené u pacientů s CML tak nejsou spolehlivým indikátorem jeho koncentrace uvnitř leukemických buněk, které představují cíl imatinibové aktivity (Gambacorti-Passerini et al., 2003). V jedné studii byly plasmatické hladiny AGP u CML pacientů zvýšené, nicméně vazba imatinibu na AGP nebyla potvrzena. Možnou příčinou tohoto pozorování je odlišnost metod použitých k izolaci a přípravě AGP (Jørgensen et al., 2002).

Další mechanismy vzniku imatinibové rezistence

Mezi další mechanismy vzniku rezistence by se dala zařadit i aktivace alternativních signálních drah ovlivňujících buněčnou signalizaci, regulaci buněčného cyklu a proliferaci

hematopoetických progenitorových buněk prostřednictvím nejrůznějších (růst podporujících) systémů i v případě Bcr-Abl inhibice (Bixby and Taplaz, 2009; Ramirez and DiPersio, 2008). Mezi tyto dráhy patří i PI3K/AKT/mTOR dráha, která je konstitutivně aktivní u Ph⁺ buněčných linií a způsobuje rezistenci k imatinibu. Inhibice AKT narozdíl od inhibice mTORC1 komplexu indukuje apoptózu u imatinib rezistentních buněčných linií (Quentmeier et al., 2011). Dalším mechanismem je aktivace kináz ze Src rodiny. Kinázy ze Src rodiny fosforylují „Src homology domain 2“ (SH2) a „Src homology domain 3“ (SH3) domény Bcr-Abl kinázy a uplatňují se tak na udržování aktivní konformace této kinázy, tedy konformace, která není schopná vázat imatinib. Tato fosforylace může zvyšovat aktivitu Bcr-Abl kinázy a ovlivňovat tak buněčnou signalizaci (Meyn et al., 2006). Některé rezistentní buňky mají zvýšenou expresi kinázy Lyn. Ke zvýšení exprese Lyn kinázy dochází i během progresu onemocnění. Vyšší hladiny Lyn kinázy mohou mít za následek rezistenci k imatinibu nezávisle na Bcr-Abl kináze (Donato et al., 2003). Tato pozorování vysvětlují účinnost Src selektivních inhibitorů a duálních Src/Abl inhibitorů v léčbě CML (Meyn et al., 2006).

Další možností vzniku imatinibové rezistence jsou alternace v úrovni acetylace nehistonových proteinů (např. transkripčního faktoru p53, proteinu Ku70 a Hsp90), které mohou podporovat abnormální proliferaci a rezistenci k apoptóze, což jsou důležité buněčné změny při rozvoji leukémie. Změna rovnováhy mezi různými třídami histondeacetyláz a histonacetyltransferáz vede ke snížení acetylace proteinů p53, Ku70 a zvýšení acetylace proteinu Hsp90 a přispívá k Bcr-Abl independentní rezistenci k TKI (Lee et al., 2007).

5.3.3. Leukemické kmenové buňky

Klidové leukemické buňky v kostní dřeni vykazují rezistenci k imatinibu (Graham et al., 2002; Holtz et al., 2005). Bylo navrženo několik možných příčin této imatinibové rezistence: vysoká exprese BCR-ABL mRNA i proteinu, nízká exprese transportéru hOCT1 či zvýšená exprese mRNA pro ABCB1 a ABCG2 transportéry (Jiang et al., 2007). Později bylo zjištěno, že imatinib inhibuje Bcr-Abl kinázu u těchto buněk, což dokládá, že schopnost klidových leukemických buněk přežít v přítomnosti imatinibu nezávisí na Bcr-

Abl kinázové aktivitě (Corbin et al., 2011). Progrese CML do blastické fáze CML je asociovaná s expanzí granulocyt-makrofágových progenitorů v důsledku získání schopnosti sebeobnovy následkem aktivace beta-kateninu a dalších změn u těchto buněk (Jamieson et al., 2004). Beta-katenin je esenciální i pro přežívání LSC v případě inhibice Bcr-Abl kinázy imatinibem (Hu et al., 2009). Aktivací beta-kateninové signální dráhy v granulocyt-makrofágových progenitorech (GMP) z pacientů s CML v akcelerované fázi, blastické fázi a u pacientů neodpovídajících na léčbu imatinibem získávají tyto buňky schopnost sebeobnovy, klíčovou pro LSC (Jamieson et al., 2004). Hypoteticky by tedy v případě blastické fáze CML mohly koexistovat dvě rozdílné populace LSC se schopností sebeobnovy. Jedna populace GMP by exprimovala více BCR-ABL transkriptů a měla aktivovaný beta-katenin v jádře, zatímco druhá populace buněk by zahrnovala klidové LSC (Quintás-Cardama and Cortes, 2009a). Beta-katenin je protein s duální funkcí, má klíčovou roli v kanonické Wnt signalizaci a zároveň se účastní buněčné adheze.

Rezistence klidových CML progenitorových buněk k imatinibu přispívá k přetrvávání maligních progenitorů u pacientů léčených imatinibem (Holtz et al., 2005). Farmakologická nebo genetická inhibice beta-kateninu v kombinaci s imatinibem je efektivní terapie proti LCS, které zůstanou po léčbě samotným imatinibem (Heidel et al., 2012).

5.4. Potenciální terapeutické cíle u TKI rezistentních CML buněk

5.4.1. Wnt signální dráha

5.4.1.1. Kanonická Wnt signální dráha

Wnt signální dráha přenáší signály z aktivovaných „Frizzled“ (Fzd) receptorů na plazmatické membráně do jádra, kde následně dochází k ovlivnění transkripce genů účastnících se buněčné proliferace a diferenciaci (Logan and Nusse, 2004). Dělíme ji na kanonickou Wnt signální dráhu a několik druhů nekanonických Wnt signálních drah (Obr. 5). Význam Wnt signalizace v léčbě rakovinových onemocnění narůstá. Mutace v proteinech účastnících se Wnt signalizace a následná dysregulace Wnt signalizace byly prokázány u některých rakovin, např. kolorektálního karcinomu (Sparks et al., 1998; Polakis, 2000). Klíčovou molekulou v kanonické Wnt signální dráze je beta-katenin, který

funguje jako koaktivátor „lymphoid enhancer factor/T-cell factor“ (LEF/TCF) transkripčních faktorů (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996) nebo jako adaptorový protein v adhezních spojích (McCrea et al., 1991).

Aktivace Wnt signální dráhy vazbou Wnt ligandu na Fz3 receptor a koreceptory „low density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein 5/6“ (LRP5/6) (Tamai et al., 2004) inhibuje fosforylaci beta-kateninu, která ho značí k degradaci (Tolwinski and Wieschaus, 2004). Po vazbě Wnt ligandu na LRP6 koreceptor je LRP6 fosforylován kasein kinázou I (CK I, casein kinase I) a kinázou glykogen syntázy 3 β (GSK3 β , glykogen synthase kinase 3 β) (Tamai et al., 2004; Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005). Fosforylovaný LRP6 vyvazuje axin a pravděpodobně tím aktivuje beta-kateninovou signalizaci (Tamai et al., 2004; Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005) prostřednictvím proteinu „Dishevelled“ (Dvl), jehož funkcí je interpretace signálů přicházejících z aktivovaných Fz3 receptorů a třídění těchto signálů do různých signálních drah (Wallingford and Habas, 2005).

Aktivovaný beta-katenin je fosforylován na Ser552 a Ser675 a translokován do jádra (Hino et al., 2005; Taurin et al., 2006; Fang et al., 2007; He et al., 2007), kde vytváří komplexy s transkripčními faktory LEF/TCF (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Cílovými geny Wnt signální dráhy jsou např. protoonkogen c-Myc (He et al., 1998) a cyklin D (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999), matrix metaloproteináza MMP-7 (Brabletz et al., 1999), povrchový glykoproteinový adhezní receptor CD44 (Wielenga et al., 1999), tyrosin kináza Met (Boon et al., 2002), ephrin receptory - EphB (Batlle et al., 2002) a negativní regulátor Wnt dráhy axin (Jho et al., 2002).

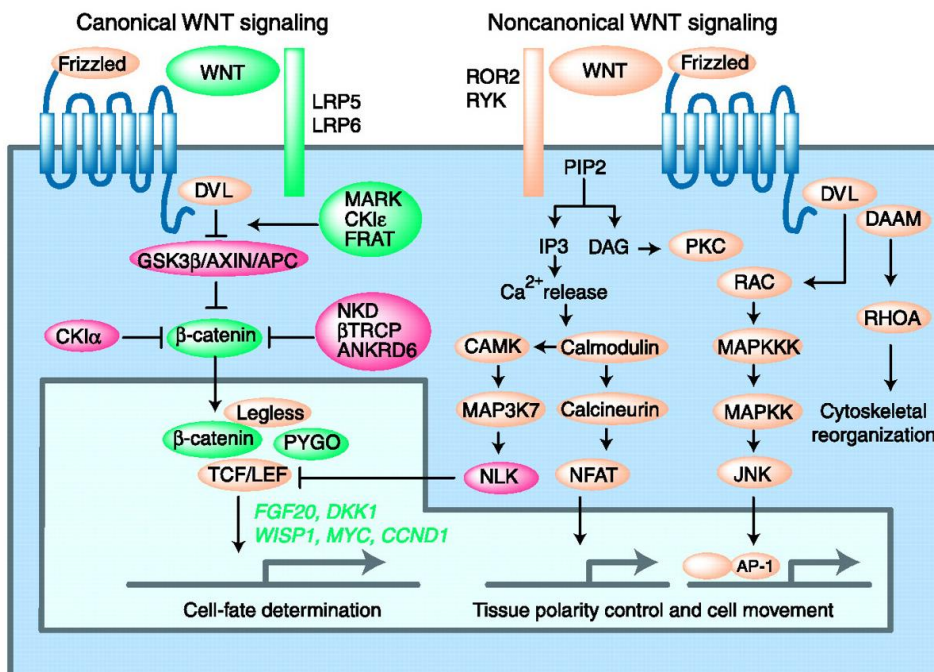
V nepřítomnosti signálu pro kanonickou Wnt signální dráhu je beta-katenin fosforylován kinázami CK I α na Ser45 (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002) a GSK3 β na Ser33/Ser37/Thr41 (Yost et al., 1996; Liu et al., 2002). Interakce mezi těmito kinázami a beta-kateninem je usnadněna proteiny (fungujícími jako lešení) Axin a APC (Rubinfeld et al., 1996; Hart et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Kishida et al., 1998). Tyto proteiny vytváří beta-katenin degradační komplex, který umožňuje, aby byl fosforylovaný beta-katenin rozpoznán ubiquitin ligázou β -TrCP, ubiquitinylován a degradován proteazomem (Aberle et al., 1997; Latres et al., 1999; Liu et al., 1999).

O roli Wnt/beta-kateninové signální dráhy v případě CML je toho známo málo. Wnt/beta-kateninová signální dráha má význam při sebeobnovování HSCs (Reya et al.,

2003), ale i CML kmenových buněk (Zhao et al., 2007) a GMP (Jamieson et al., 2004). Delece beta-kateninu u myši snižuje schopnost vyvinout Bcr-Abl indukovanou CML, což poukazuje na důležitost beta-kateninu při sebeobnově CML kmenových buněk (Zhao et al., 2007). V případě CML bylo prokázáno, že kináza Bcr-Abl fyzicky interaguje s beta-kateninem a fosforyluje ho na tyrosinech Y86 a Y654. Touto fosforylací dochází ke stabilizaci beta-kateninu, který neinteraguje s Axin/GSK3 β komplexem, ale je translokován do jádra a váže TCF4 transkripční faktor (Coluccia et al., 2007). Během progresu CML dochází ke změně exprese genů účastnících se Wnt/beta-kateninové signální dráhy jako např. genu pro receptor Fzd2 a genu LRP6 (Radich et al., 2006).

Wnt/beta-kateninová signální dráha reguluje transkripci ABCB1 genu u CML buněk. Beta-katenin byl prokázán v proteinovém komplexu na bazálním promotoru genu ABCB1 jak u MDR-rezistentní (zvýšená exprese ABCB1 transportéru) tak i u senzitivní buněčné linie, ale jeho vazba byla výraznější u rezistentních buněk, které také vykazovaly vyšší hladiny beta-kateninu (Corrêa et al., 2012).

Inhibice beta-kateninu prostřednictvím siRNA inhibuje proliferaci a klonogenicitu Bcr-Abl⁺ CML buněk současně s imatinibem (Coluccia et al., 2007). Inhibitor Wnt/beta-kateninové signální dráhy AV-65 snižuje hladinu beta-kateninu v CML buňkách v závislosti na čase a dávce. Dochází tak k potlačení proliferace imatinib senzitivních i imatinib rezistentních CML buněk. AV-65 je aktivní i vůči buňkám exprimujícím různé mutované formy Bcr-Abl kinázy včetně T315I mutace (Nagao et al., 2011).



Obr. 5 Schéma kanonické Wnt signální dráhy a nekanonických Wnt signálních drah - Wnt/Ca²⁺ a Wnt/PCP (Wnt/Planární buněčná polarita). (Převzato a upraveno z Katoh and Katoh, 2007).

5.4.1.2. Nekanonické Wnt signální dráhy

Nekanonické Wnt signální dráhy zahrnují dvě hlavní intracelulární signální kaskády nazývané se Wnt/PCP (Wnt/Planární buněčná polarita) a Wnt/Ca²⁺ signální dráha.

5.4.1.2.1. Wnt/PCP signální dráha

Buněčná polarita a pohyb jsou regulovány Wnt/PCP signální drahou prostřednictvím aktivace Rho GTPázy (Habas et al., 2001) a c-Jun N-terminální kinázy (JNK/SAPK; c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) (Yamanaka et al., 2002). Wnt proteiny se váží na Fzd receptory na plazmatické membráně. Následně prostřednictvím proteinu Dvl dochází k aktivaci malých GTPáz Rac (Habas et al., 2003) a Rho (Habas et al., 2001).

GTPáza Rho je aktivována po vytvoření komplexu proteinů Dvl a „Dishevelled associated activator of morphogenesis 1“ (Daam1) prostřednictvím „Rho guanine exchange factoru WGEF“ (Habas et al., 2001; Tanegashima et al., 2008). Wnt Rho signální dráha aktivuje Rho asociovanou kinázu ROCK, která zprostředkovává reorganizaci cytoskeletu (Winter et al., 2001; Marlow et al., 2002).

GTPáza Rac je aktivována přímo proteinem Dvl a není závislá na Daam1 proteinu (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003). Aktivovaná Rac GTPáza následně stimuluje JNK kinázovou aktivitu (Habas et al., 2003). JNK kinázová aktivita je stimulována nejen GTPázou Rac, ale i Rho a Cdc42 GTPázami (Bikkavilli et al., 2008a). Malé GTPázy z Rho rodiny jsou spojeny s aktivací JNK kinázy prostřednictvím MAP-kinázové signální dráhy. Rho, Rac a Cdc42 GTPázy přenášejí signály na „mitogen-activated protein kinase kinase kinase“ (MAPKKK/MEKK1-4) (Bikkavilli et al., 2008a). MAPKKK/MEKK1-4 fosforyluje a aktivuje „mitogen-activated protein kinase kinase“ (MKK4/SEK1) nebo MKK7, které následně fosforylují a aktivují SAPK/JNK (Yan et al., 1994). Transkripční faktory ATF-2 a c-Jun fungující v této dráze jsou fosforylovány a aktivovány např. pomocí SAPK/JNK kinázy (Hibi et al., 1993; Gupta et al., 1995). Oba tyto transkripční faktory se uplatňují při transkripci genů regulujících progresi buněčného cyklu, např. cyklinu D (Lewis et al., 2005; Wisdom et al., 1999) a mají také antiapoptotickou funkci, jednak regulací transkripce genů uplatňujících se v apoptóze (Ma et al., 2007) či kooperují s „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (NFκB) signalizací, aby zabránily apoptóze (Wisdom et al., 1999).

5.4.1.2.2. Wnt/Ca²⁺ signální dráha

Vápenaté ionty byly identifikovány jako druhý posel Wnt signální dráhy poté, co bylo zjištěno, že injekcí Wnt5a mRNA do jednobuněčného embrya *Danio rerio* dochází ke zvýšení frekvence intracelulárních změn koncentrace vápenatých iontů (Slusarski et al., 1997a). Ektopická exprese potkaního receptoru Fzd2 v embryech *Danio rerio* také způsobuje zvýšené uvolnění intracelulárních vápenatých iontů, které je zvýšeno koexpresí Wnt5a (Slusarski et al., 1997b). Ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů dochází prostřednictvím aktivace heterotrimerních G proteinů, které stimulují fosfatidylinositolovou signalizaci (Slusarski et al., 1997b). Zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů indukované Wnt5a či Fzd2 aktivuje vápník-senzitivní proteiny kalmodulin dependentní kinázu II (CaMKII, calmodulin-dependent protein kinase II) (Kühl et al., 2000) a protein kinázu C (PKC, protein kinase C) (Sheldahl et al., 1999). Transkripční faktor „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT), regulovaný kalcium/kalmodulin-dependentní protein fosfatázou kalcineurinem, je po ektopické expresi

Wnt5a a Fzd2 v embryu *Xenopus leavis* translokován do jádra (Saneyoshi et al., 2002). Jeho akumulaci v jádře snižuje cyklosporin A (CsA) (Shaw et al., 1995).

Wnt/Ca²⁺ signální dráha aktivovaná Wnt5a ligandem antagonizuje Wnt/beta-kateninovou dráhu prostřednictvím aktivace „TGF-beta activated kinase 1–Nemo-like kinase“ (TAK1-NLK) MAP-kinázové kaskády. Aktivovaná CaMKII stimuluje TAK1-NLK dráhu (Ishitani et al., 2003).

Signální specifita je zachována prostřednictvím různých koreceptorů; LRP5 a LRP6 se angažují ve Wnt/beta-kateninové signální dráze, zatímco Knypek (Topczewski et al., 2001) a Ror2 (Hikasa et al., 2002) fungují jako koreceptory ve Wnt/Ca²⁺ a Wnt/PCP signální dráze.

Wnt5a může fungovat jako tumor supresor nebo protonkogen (McDonald et al., 2009). Tumor supresorová role Wnt5a byla prokázána i v leukemogenezi. Wnt5a se váže na koreceptor Ror2 a aktivuje nekanonickou Wnt signální dráhu, která potlačuje beta-katenin/TCF-dependentní transkripční aktivitu a dochází ke snížení exprese cyklinu D, který je cílem kanonické Wnt signální dráhy (Yuan et al., 2011). Wnt/Ca²⁺ dráha hraje roli v rezistenci CML buněk k TKI, protože podporuje přežívání Bcr-Abl⁺ leukemických buněk navzdory inhibici Bcr-Abl (Gregory et al., 2010). Inhibice fosfatázy kalcineurinu aktivující transkripční faktor NFAT uplatňující se v této dráze pomocí cyklosporinu A vede k narušení NFAT aktivity, snížení produkce cytokinů a ke zvýšení senzitivity leukemických buněk k TKI inhibitorům imatinibu a dasatinibu (Gregory et al., 2010).

NHERF1 protein

Protein NHERF1 obsahuje dvě „post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)“ (PDZ) domény (Reczek et al., 1997). PDZ domény jsou nezbytné při Wnt buněčné signalizaci (Subbaiah et al., 2011). Nedávno bylo prokázáno, že protein NHERF1 interaguje PDZ 2 doménou s Fzd receptorem v rámci Wnt signalizace (Wheeler et al., 2011). Absence NHERF1 proteinu zvýšila podíl aktivovaného beta-kateninu následkem aktivace kanonické Wnt signalizace a prokázala negativní korelaci mezi expresí NHERF1 proteinu a aktivací beta-kateninu (Wheeler et al., 2011).

Protein NHERF1 váže „multidrug resistance-associated protein 2“ (Mrp2 transportér) a reguluje jeho expresi a funkci jak bylo prokázáno u jaterních buněk, kde u NHERF1 deficientních buněk dochází ke snížení exprese Mrp2 proteinu (Li et al., 2010). Mrp2 protein patří do skupiny ABC transportérů, které se účastní transportu nejrůznějších molekul ven z buněk, např. protirakovinových léků (König et al., 1999).

Protein NHERF1 reguluje aktivitu Na^+/H^+ přenašeče (Cardone et al., 2007). Bylo prokázáno, že leukemické buňky exprimující NHE-1 přenašeč (Na^+/H^+) mají vyšší intracelulární pH než normální hematopoetické buňky a v případě inhibice NHE-1 přenašeče pomocí amiloridu docházelo k jejich apoptóze (Rich et al., 2000). Inhibice NHE-1 přenašeče a současně i NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) přenašeče selektivně zabíjí gliomové buňky, neboť u nich dochází ke zvýšení již tak vyšší intracelulární hladiny Ca^{2+} k cytotoxické úrovni (Harley et al., 2010). Rychle proliferující buňky, např. nádorové, preferují produkci ATP pomocí aerobní glykolýzy a dochází tak ke vzniku laktátu a okyselení cytosolu (tzv. Warburgův efekt, Warburg, 1956). U rychle proliferujících buněk vzniká konstitutivně vyšší pH následkem aktivace NHE-1 přenašeče (Rich et al., 2000). Na^+/H^+ přenašeč je potřebný pro růst nádorových buněk (Rotin et al., 1989). Metody, které by vedly ke snižování pH by mohly mít význam v nádorové terapii, např. inhibice NHE-1 přenašeče (Rich et al., 2000), případně současné použití NHE-1 a NCX inhibitorů (Harley et al., 2010). Mezi tyto inhibitory patří amilorid, EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride) a DCB (3,4-dichlorobenzamil). Amilorid a EIPA inhibují Na^+/H^+ přenašeč (NHE-1) kompeticí s Na^+ ionty (Paris and Pouysségur, 1983; Vigne et al., 1983) a amilorid je i slabým inhibitorem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ přenašeče (NCX) (Kaczorowski et al., 1985). DCB inhibuje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ přenašeč kompeticí s Na^+ ionty (Siegl et al., 1984; Kaczorowski et al., 1985).

5.4.2. Další potenciální terapeutické cíle u TKI rezistentních CML buněk

5.4.2.1. mTOR signální dráha

PI3K/AKT/mTOR signální dráha reguluje nejrůznější buněčné funkce včetně proliferace, růstu a přežívání buněk (Vivanco and Sawyers, 2002). Signální dráha mTOR v CML buňkách je konstitutivně aktivována prostřednictvím Bcr-Abl kinázy a její dva

substráty - ribozomální protein S6 a 4E-BP1, jsou konstitutivně fosforylovány Bcr-Abl dependentním způsobem (Ly et al., 2003). Dráha PI3K/AKT/mTOR je aktivována v buňkách vystavených imatinibu a zprostředkovává přežívání buněk během počátečních fází vývoje imatinibové rezistence než dojde k projevu Bcr-Abl dependentní imatinibové rezistence, jako jsou např. mutace v Bcr-Abl kináze (Burchert et al., 2005).

Inhibice komplexu mTORC1 pomocí rapamycinu zvyšuje zabíjení buněk v kombinaci s imatinibem a překonává imatinibovou rezistenci způsobenou amplifikací genu BCR-ABL *in vitro* (Ly et al., 2003) i mutacemi v Bcr-Abl kináze *in vitro* a *in vivo* (Sillaber et al., 2008). Některé výsledky ukazují, že rapamycin je schopen inhibovat růst buněk s T315I mutací (Sillaber et al., 2008), jiné, že nikoliv (Ly et al., 2003). Navzdory rozsáhlému výzkumu rapamycin senzitivních mTORC1 komplexů mnohem méně je známo o roli rapamycin insenzitivních komplexů mTORC2 v Bcr-Abl leukemogenezi. Duální mTORC1/mTORC2 inhibitor OSI-027 projevuje silný antileukemický efekt na CML buňky včetně těch, které mají mutaci T315I v Bcr-Abl kináze (Carayol et al., 2010).

5.4.2.2. JAK2 kináza

JAK2 tyrosin kináza patří do rodiny nerekceptorových tyrosin kináz, které přenášejí signály zprostředkované cytokiny prostřednictvím JAK-STAT signální dráhy. JAK2 kináza je fosforylována a aktivována prostřednictvím Bcr-Abl kinázy. Dochází k tvorbě komplexu Bcr-Abl kinázy s proteiny JAK2 (Xie et al., 2001), GRB2-associated protein 2 (Gab2), PKB/AKT a GSK3 β (Samanta et al., 2006). Signální transdukce prostřednictvím Bcr-Abl/JAK2 proteinového komplexu má za následek fosforylaci a aktivaci PKB/AKT, která fosforyluje a inhibuje GSK3 β , dochází tak ke stabilizaci c-Myc proteinu. Aktivuje také NF κ B, což má za následek zvýšení transkripce c-Myc (Samanta et al., 2006). Inhibice JAK2 kinázy pomocí inhibitoru AG490 v buňkách exprimujících imatinib rezistentní mutace T315I a E255K má za následek apoptózu těchto buněk. Tyto výsledky ukazují JAK2 jako potenciální terapeutický cíl v CML (Samanta et al., 2006).

5.4.2.3. p38 MAP kinázy

p38 MAP kinázy ovlivňují mnoho nejrůznějších buněčných odpovědí od zánětlivé odpovědi přes regulaci buněčného cyklu, apoptózu (buněčnou smrt), vývoj, diferenciaci,

senescenci a tumorigenezi (Coulthard et al., 2009). p38 MAP kinázová dráha má často tumorsupresorovou funkci (Coulthard et al., 2009). MAP kináza p38 α potlačuje proliferaci normálních i rakovinových buněk tím, že antagonizuje JNK-c-Jun signální dráhu (Hui et al., 2007). V souladu s protinádorovou funkcí p38 MAP kináz je indukce apoptózy různými chemoterapeutiky částečně uskutečněna prostřednictvím aktivace p38 MAPK. Bylo tak prokázáno i v případě Bcr-Abl⁺ buněk, kdy imatinib indukuje fosforylaci a aktivaci p38 MAP kinázy a kde naopak inhibice této kinázy zvrátila inhibiční efekt imatinibu na GMP z CML pacientů (Parmar et al., 2004). Působení p38 MAPK a jejích níže ležících cílů je tedy nezbytné pro antileukemickou odpověď zprostředkovanou imatinibem (Parmar et al., 2004), ale i dasatinibem (Dumka et al., 2009). Je možné, že rezistence k imatinibu může vzniknout i následkem vadné aktivace p38 MAP kinázové dráhy v určitých případech CML (Parmar et al., 2004).

p38 MAP kináza se účastní regulace nekanonické Wnt/Ca²⁺ signalizace. p38 MAPK je aktivována nezávisle na Dvl proteinu a je nezbytná pro aktivaci PDE6 (fosfodiesterázy 6) a následně transkripčního faktoru NFAT jako odpověď na vazbu Wnt5a na Fzd2 receptor (Ma and Wang, 2007). p38 MAPK hraje roli i v kanonické Wnt signalizaci, kdy Wnt3a indukuje aktivaci p38 MAP kinázy prostřednictvím G proteinů a Dvl3 proteinu. Aktivovaná p38 MAP kináza následně inhibuje kinázu GSK3 β , což má za následek akumulaci β -kateninu a aktivaci transkripce TCF/LEF senzitivních genů (Bikkavilli et al., 2008b).

6. Materiál

6.1. Modelový organismus – buněčná linie

CML-T1 – lidská chronická myeloidní leukémie, Bcr-Abl⁺ (Leibniz institute DSMZ)

6.2. Roztoky pro kultivaci buněk

Kompletní médium RPMI 1640

400 ml RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) + HEPES + L-glutamin, Phenol Red (Gibco, Invitrogen)

40 ml 10% fetální hovězí sérum (FBS) (Gibco, Invitrogen)

11 ml NaHCO₃ 7,5% (hydrogenuhličitan sodný) (Sigma-Aldrich)

8 ml antibiotika Penicilin-Streptomycin 100x (10 000 U/ml penicilin a 10 000 µg/ml streptomycin) (Sigma-Aldrich)

Inhibitory Bcr-Abl

Imatinib (Gleevec) – inhibitor Bcr-Abl kinázy (Novartis)

Nilotinib (Tasigna) – inhibitor Bcr-Abl kinázy (Bristol Myers Squibb)

Dasatinib (Sprycel) – duální inhibitor Bcr-Abl a Src kináz (Bristol Myers Squibb)

Další inhibitory

Cyclosporin/Cyklosporin A – inhibitor fosfatázy calcineurinu/kalcineurinu (Cell Signaling)

FK-506 – inhibitor fosfatázy calcineurinu/kalcineurinu (Cell Signaling)

Indomethacin – inhibitor cyklooxygenázy 1/2 (COX-1/2) (Sigma-Aldrich)

Amiloride hydrochloride hydrate – inhibitor sodného kanálu a Na⁺/H⁺ přenašeče (NHE-1) (Sigma-Aldrich)

EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride) – inhibitor Na⁺/H⁺ přenašeče (NHE-1) (Sigma-Aldrich)

DCB (3,4-dichlorobenzamil hydrochloride) – inhibitor Na⁺/Ca²⁺ přenašeče (Sigma-Aldrich)

chemikálie na rozpuštění inhibitorů:

H₂O/RPMI: Amiloride hydrochloride hydrate

Methanol (Sigma-Aldrich): EIPA

DMSO (Dimethyl sulfoxid) (Sigma-Aldrich): DCB, Indomethacin, FK-506,

Cyclosporin A, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib

Další roztoky

PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4

PBS 10x: 1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄

6.3. Roztok pro přípravu buněčných lyzátů

Lyzační pufr: CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent for mammalian tissues (Sigma-Aldrich)
inhibitory proteáz (Protease inhibitor cocktail tablets) (Roche) – 1 tableta na 7 ml lyzačního pufru

6.4. Roztoky na izolaci jader

NE-PER Nuclear Protein Extraction Kit (Pierce)

6.5. Roztok pro měření koncentrace proteinů

Protein Assay Kit II (Bio-Rad)

6.6. Materiál pro SDS-PAGE a Western Blot

Vzorkový pufr: premixed 4x Laemmli protein sample buffer for SDS-PAGE (Bio-Rad)
obsahuje 62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1% LDS, 0.005% Bromophenol Blue, pH 6.8
2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

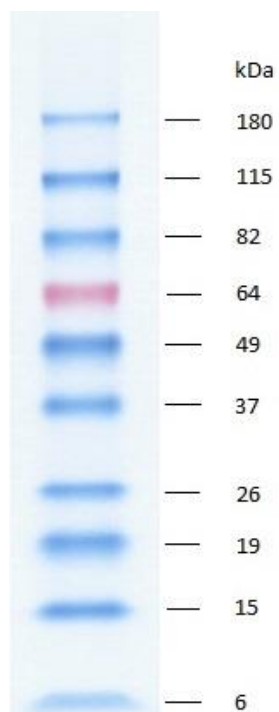
Vzorkový pufr vznikne smícháním 950 µl 4x Laemmli protein sample buffer for SDS-PAGE (Bio-Rad) a 50 µl 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce.

SDS-PAGE running pufr (elektrodový pufr)

10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad) obsahuje 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

SDS-PAGE gely: 4-15% gradient Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (Bio-Rad)

Proteinový marker: BenchMark Prestained protein Ladder (6 - 180 kDa) (Invitrogen)



Obr. 6 Proteinový marker. The BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder – standard molekulové hmotnosti proteinů. Skládá se z deseti proteinů majících molekulovou hmotnost mezi 6-180 kDa.

Barvicí roztok

SimplyBlue® SafeStain (Invitrogen)

Blokovací roztok

5% (w/v) mléko v PBS-T

5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich) v PBS-T

SuperBlock (Thermo Scientific, Pierce)

PBS-T (phosphate buffered saline with Tween 20)

PBS (phosphate-buffered saline)

0,1% Tween 20 (v/v) (Sigma-Aldrich)

Western Blot

iBlot® 7-Minute Blotting System (Invitrogen)

membrány: iBlot® Transfer Stack, PVDF Regular (Invitrogen)

Roztok pro ředění primárních a sekundárních protilátek

PBS-T

Vyvíjecí roztok

Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology)

Seznam protilátek

Primární protilátky

Tabulka 1 Použité primární protilátky

| Cell Signaling: | | | |
|--|--------------------|-------------------------|---------------|
| protilátka | specifikace | velikost na gelu | ředění |
| NFAT1 | Rabbit monocl. | 140 kDa | 1:3000 |
| Beta-catenin | Rabbit monocl. | 92 kDa | 1:3000 |
| Phospho-Beta-catenin (Ser 552) | Rabbit polycl. | 92 kDa | 1:3000 |
| Phospho-Beta-catenin (Ser 675) | Rabbit monocl. | 92 kDa | 1:3000 |
| Phospho-Beta-catenin (Ser 33/37/Thr41) | Rabbit polycl. | 92 kDa | 1:3000 |
| Phospho c-jun (Ser63) | Rabbit monocl. | 48 kDa | 1:3000 |
| LRP6 | Rabbit monocl. | 180-210 kDa | 1:3000 |
| Phospho-LRP6 | Rabbit polycl. | 180-210 kDa | 1:3000 |
| Dvl2 | Rabbit monocl. | 90-95 kDa | 1:3000 |
| Dvl3 | Rabbit polycl. | 88-93 kDa | 1:3000 |
| Histone 2A | Rabbit monocl. | 14 kDa | 1:3000 |
| Cyclin D1 | Mouse monocl. | 36 kDa | 1:3000 |

| | | | |
|----------------------------------|----------------|-----------|--------|
| c-Jun | Rabbit monocl. | 48 kDa | 1:3000 |
| LEF1 | Rabbit monocl. | 25-58 kDa | 1:3000 |
| Met | Rabbit monocl. | 170 kDa | 1:3000 |
| c-Myc | Rabbit monocl. | 57-65 kDa | 1:3000 |
| TCF1 | Rabbit monocl. | 50 kDa | 1:3000 |
| Phospho-SEK1/MKK4 (Ser257) | Rabbit monocl. | 44 kDa | 1:3000 |
| Phospho-ATF-2 (Thr71) | Rabbit monocl. | 70 kDa | 1:3000 |
| Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) | Rabbit monocl. | 46-54 kDa | 1:3000 |
| Phospho-c-Jun (Ser63) | Rabbit monocl. | 48 kDa | 1:3000 |
| Santa Cruz Biotechnology | | | |
| NHERF1 | Mouse monocl. | 50kDa | 1:3000 |
| HP1 alpha | Mouse monocl. | 22 kDa | 1:3000 |
| Sigma-Aldrich | | | |
| GAPDH | Mouse monocl. | 37 kDa | 1:3000 |
| Beta-actin | Mouse monocl. | 42 kDa | 1:3000 |

pozn. monocl. = monoklonální, polycl. = polyklonální

Sekundární protilátky

Tabulka 2 Použité sekundární protilátky

| Cell Signaling | | |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------|
| protilátka | specifikace | ředění |
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody | Goat | 1:3000 - 1:50 000 |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody | Horse | 1:3000 - 1:20 000 |
| Santa Cruz Biotechnology | | |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody | Donkey | 1:10 000 - 1:30 000 |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody | Goat | 1:10 000 - 1:40 000 |

6.7. Materiál na MTT esej

Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen)

PBS

HCl (Sigma-Aldrich)

6.8. Materiál na 2-DE

Rehydratační pufr

7M urea (Sigma-Aldrich), 2M thiourea (Sigma-Aldrich), 4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) (Sigma-Aldrich), 60mM DTT (Sigma-Aldrich), 1% amfolity/ampholytes (IPG buffer pH 4–7, Amersham), inhibitory proteáz/protease inhibitor cocktail (EDTA Free, Roche Diagnostics)

Ekvilibrační pufr s DTT (dithiotheitol)

6M urea (Sigma-Aldrich), 50mM Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich), 30% glycerol (Bio-Rad), 2% SDS (Sigma-Aldrich) a 100mg DTT (Sigma-Aldrich) na 10 ml pufru

Ekvilibrační pufr s iodacetamidem

6M urea (Sigma-Aldrich), 50mM Tris pH 8.8 (Sigma-Aldrich), 30% glycerol (Bio-Rad), 2% SDS (Sigma-Aldrich) a 240 mg iodacetamidu (Sigma-Aldrich) na 10 ml pufru.

stripy

Immobiline DryStrip pH 4-7, 24 cm (GE Healthcare)

SDS-PAGE gely

10% gel, objem pro 12 gelů, 1L

Tabulka 3 Složení SDS-PAGE gelů.

| chemikálie | objem |
|--|--------------|
| ddH ₂ O | 400 ml |
| 30% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad) | 334 ml |
| 1,5M Tris pH 8,8 | 250 ml |
| 20% Sodium dodecyl sulphate SDS (Bio-Rad) | 5 ml |
| 10% ammonium persulphate APS (Sigma-Aldrich) | 10 ml |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich) | 400 µl |

SDS-PAGE running pufr (elektrodový pufr)

10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad) obsahuje 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0.1% SDS, pH 8.3

další materiál a chemikálie potřebné pro 2-DE

electrode wicks (podložky pod stripy) (Bio-Rad)

minerální olej (Bio-Rad)

Low Melting agarose (Sigma-Aldrich)

Bromophenol blue (Bio-Rad)

NaCl (Sigma-Aldrich)

Isobutanol (Lachema)

kyselina octová (Lachema)

7. Metody

7.1. Kultivace a pasážování buněčných linií

Buněčná linie i její odvozené rezistentní linie byly kultivovány ve standardních podmínkách v 37°C a 5% CO₂ v kultivačních lahvích v 10 ml média RPMI 1640, v případě rezistentních linií v médiu RPMI 1640 s přidavkem příslušného TKI nebo jejich kombinace. V závislosti na nárůstu populace buněk byly buňky pasážovány po 2 až 4 dnech. Kulturu jsme pravidelně kontrolovali pod mikroskopem, abychom sledovali nárůst populace buněk a případné kontaminace.

7.2. Vývoj rezistentních linií

Pomocí dlouhodobého selekčního tlaku narůstajících koncentrací příslušných TKI léků (imatinib, nilotinib, dasatinib) v médiu byly získány rezistentní linie buněk (Mahon et al., 2000). Bylo vyseto 10 000 buněk/ml do mikrotitrační destičky, kde byla připravena koncentrační řada pro daný TKI, v tomto případě pro imatinib 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 μM. Po třech dnech bylo pomocí MTT testu (viz. kap MTT test 7.10) stanoveno IC₅₀, tj koncentrace inhibitoru, při které přežije 50% buněk, na 0,45 μM imatinib. Přežívající buňky byly z jamky o koncentraci 0,2 μM přepipetovány do kultivační lahve a kultivovány. Podle nárůstu a stavu byla přežívající populace buněk přepasážována do média s dvojnásobnou koncentrací inhibitoru přibližně jednou za 10 dní. Tyto koncentrace byly pro imatinib 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8; 16; 20 μM, nilotinib 40; 80; 150; 200; 400; 1000; 2000 nM a dasatinib 8; 16; 32; 64; 100 nM. Tímto způsobem byly vytvořeny linie buněk CML-T1 rezistentních na 20 μM imatinib, 2 μM nilotinib a 100 nM dasatinib. IC₅₀ koncentrace TKI na začátku byly 0,45 μM imatinib, 400 nM nilotinib (linie CML-T1 má mutaci Y253H v Bcr-Abl kináze semirezistentní na nilotinib, za normálních okolností by byla IC₅₀ 40 nM nilotinib) a 4 nM dasatinib.

V případě vývoje křížově rezistentních buněk byly buňky nejprve vystaveny selekčnímu tlaku imatinibu, poté nilotinibu a nakonec dasatinibu (koncentrace TKI byly shodné jako v případě jednotlivých rezistentů). Přežívající populace křížově rezistentních buněk byly přepasážovány do média s dvojnásobnou koncentrací inhibitoru přibližně jednou za 14 až 21 dní dle jejich stavu a nárůstu. V případě křížové rezistence byly

vytvořeny linie CML-T1 linie buněk rezistentních na 20 μ M imatinib 2 μ M nilotinib, 20 μ M imatinib 2 μ M nilotinib 100nM dasatinib. Linie CML-T1 buněk křížově rezistentní na 20 μ M imatinib 2 μ M nilotinib byl vytvořen z buněk rezistentních na 20 μ M imatinib, které jsme pasážovali do média s postupně se zvyšující se koncentrací nilotinibu s počáteční koncentrací 400nM nilotinib, na konečnou koncentraci 2 μ M nilotinib. V případě linie křížově rezistentní na všechny tři TKI (20 μ M imatinib 2 μ M nilotinib 100nM dasatinib) jsme vycházeli z buněk rezistentních na 20 μ M imatinib 2 μ M nilotinib, do média jsme přidali 8nM dasatinib a postupně jeho koncentraci zvyšovali až na 100nM.

Rezistence byla stanovena jako 10x až 40x násobek IC_{50} . Konečné koncentrace TKI léků v médiu jsou u CML-T1 rezistentních buněk 20 μ M imatinib, 2 μ M nilotinib a 100nM dasatinib.

Původní senzitivní linie byly kultivovány paralelně v kultuře bez TKI léků (imatinib, nilotinib, dasatinib) a sloužily jako kontrola.

7.3. Příprava buněčných lyzátů

Buňky byly nejprve centrifugovány (500 g), abychom odstranili médium a buněčný debris, a poté byly resuspendovány a třikrát promyty v 30 ml PBS (500 g). Po odstranění PBS byla peleta resuspendována v lyzačním puftru a po inkubaci na ledu (10-15 min) byly buňky centrifugovány (500 g) a supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky. Lyzáty byly uchovávány při -20 °C nebo z nich byly přímo připraveny vzorky na SDS-PAGE. Z lyzátů byly odebrány aliqouty na stanovení koncentrace proteinů.

7.4. Izolace buněčných jader

Na izolaci buněčných jader byl použit NE-PER Nuclear Protein Extraction Kit (Pierce) na bázi postupné solubilizace proteinů detergenty a postupovali jsme podle návodu výrobce s drobnou úpravou, kdy jsme před přidáním NER peletu obsahující jádra třikrát promyli PBS. Poznámka: měřítkem v tomto protokolu je objem buněčné pelety (Tabulka 4), který je důležitý pro zachování příslušného objemu CER I:CER II:NER činidel v poměru 200:11:100 μ L.

Suspenní buňky byly nejprve centrifugovány (500 g) po dobu 5 minut a bylo tak odstraněno médium. Poté byly promyty PBS, přeneseny do mikrozkušavky

a centrifugovány (500 g, 2-3 minuty). Následně byl pipetou odstraněn supernatant, aby peleta zůstala co nejvíce suchá. Podle objemu pelety byl (Tabulka 4) přidán do mikrozkušavky ledově vychlazený CER I. Mikrozkušavka byla 15 s vortexována na nejvyšší stupeň a inkubována na ledu 10 min. Poté byl přidán ledově vychlazený CER II, mikrozkušavka byla vortexována po 5 s a poté inkubována na ledu po dobu 1 min a opět vortexována 5 s. Mikrozkušavka byla následně centrifugována 5 min (~16,000 g). Supernatant (cytoplasmatický extrakt) byl přenesen do nové vychlazené mikrozkušavky, která byla uchovávána na ledu. Peleta, obsahující jádra byla nejprve třikrát promyta PBS, aby se odstranila cytoplasmatická kontaminace. Poté byla peleta rozsuspendována v ledově vychlazeném NER. Následně byla mikrozkušavka s peletou vortexována 15 s a uložena na led. Vortexování po dobu 15 s bylo prováděno každých 10 min, celkově po dobu 40 min. Mikrozkušavka byla centrifugována (~16,000 g) po dobu 10 min a supernatant (jaderný extrakt) byl přenesen do nové vychlazené mikrozkušavky a uchováván na ledu. Cytoplasmatické a jaderné extrakty byly uchovávány při -80 °C.

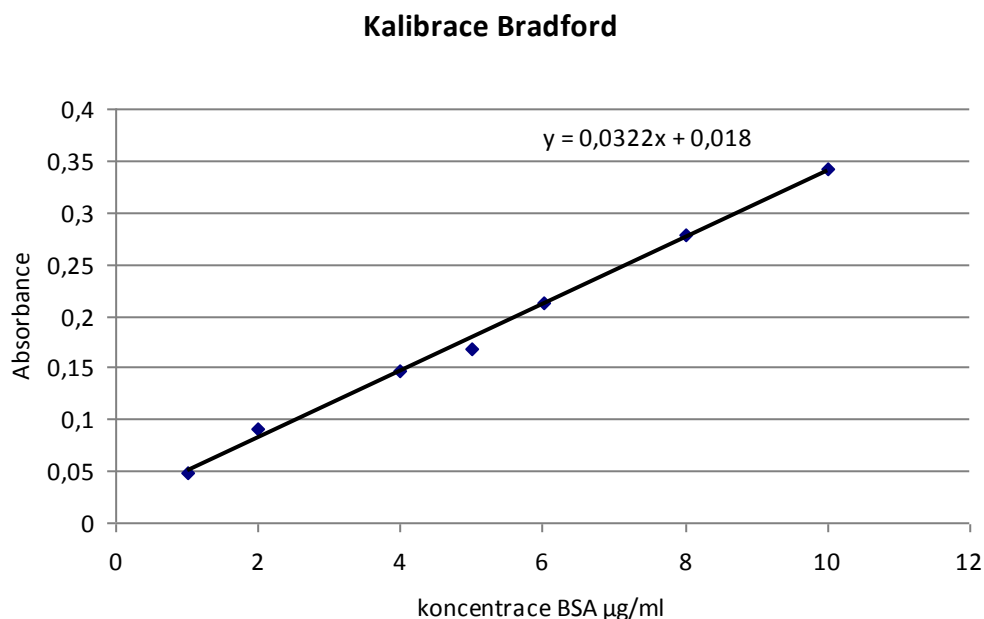
Tabulka 4 Objem buněčné pelety. *Objem buněčné pelety je důležitý pro zachování příslušných objemů CER I:CER II:NER činidel v poměru 200:11:100 µL.*

| Packed Cell Volume (µl) | CER I (µl) | CER II (µl) | NER (µl) |
|-------------------------|------------|-------------|----------|
| 10 | 100 | 5.5 | 50 |
| 20 | 200 | 11 | 100 |
| 50 | 500 | 27.5 | 250 |
| 100 | 1000 | 55 | 500 |

7.5. Determinace/stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech, cytoplasmatické a jaderné frakci byla stanovena pomocí Protein Assay Kit II (Bio-Rad) dle pokynů výrobce. Bio-Rad protein assay je kolorimetrické měření celkové koncentrace proteinů založené na Bradfordově metodě. Jako standard byl použit BSA v koncentracích 1,2,4,5,6,8,10 µl/ml. Změřená absorbance BSA byla vynesena do grafu a sloužila jako kalibrační křivka (Obr. 7). Stanovení bylo prováděno v tripletech. Do 1 ml roztoku Protein Assay bylo přidán 1 µl

buněčného lyzátu/cytoplazmatické nebo jaderné frakce. Vzorky byly inkubovány 3 min a před měřením byly vzorky vortexovány, každý 3 s. Následně byla změřena absorbance vzorků při vlnové délce 595 nm a pomocí kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla upravena na stejnou hodnotu pomocí ředění lyzačním pufrem.



Obr. 7 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové. Každý bod kalibrační křivky je průměrem ze tří stanovení. BSA, hovězí sérový albumin.

7.6. Příprava vzorků na SDS-PAGE

Koncentrace proteinů ve vzorcích pro elektroforézu byla upravena na stejnou hodnotu pomocí ředění lyzačním pufrem. Ke vzorku byl přidán v poměru 1:1 Laemmliho vzorkový pufr již předtím smíchaný s 2-merkaptoethanolem. Následoval krátkodobý impulz centrifugace na max. RPM po dobu 10 s. Vzorky byly inkubovány 2 min v bločku při 100 °C, poté byly stočeny, zamrazeny nebo použity přímo na SDS-PAGE.

7.7. SDS-PAGE

Gely (4-15% gradient Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Bio-Rad) byly vloženy do aparatury na elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) a zality SDS-PAGE running (elektrodovým) puřrem. Následně byl napipetován marker molekulových hmotností (Obr. 6) a vzorky, jejichž objem byl vypočítán ze stanovené koncentrace proteinů. Separace proteinů probíhala v gelu za konstantního napětí 300 V, dokud čelo elektroforézy nedosáhlo spodního okraje gelu. Poté byl odpojen zdroj elektrického napětí a gel byl vyjmut z aparatury. Následně byly proteiny z gelu přeneseny na membránu metodou Western Blot a gel byl poté obarven SimplyBlue® SafeStain (Invitrogen) pro kontrolu nanášky a přenosu proteinů.

7.8. Western blot

Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (iBlot® Transfer Stack, PVDF Regular, Invitrogen) dle pokynů výrobce v zařízení iBlot® 7-Minute Blotting System (Invitrogen).

7.9. Imunodetekce

Membrána s přenesenými proteiny byla následně blokována v 5% mléce ředěném PBS-T, případně byl použit roztok SuperBlock (Pierce) či 5% BSA (podle doporučení uvedeného u konkrétní protilátky), na třepačce 1 hodinu. Inkubace s příslušnou primární protilátkou (Tabulka 1), která byla ředěna v PBS-T (ve většině případů v koncentraci 1:3000), probíhala 12h na třepačce při 4 °C. Poté byla odmyta nadbytečná primární protilátka roztokem PBS-T po dobu 3x 10 min. Membrána byla posléze inkubována se sekundární protilátkou (Tabulka 2) konjugovanou s křenovou peroxidázou připravenou v PBS-T (ředění 1: 10 000 až 1: 50 000). Následně byla odmyta nadbytečná sekundární protilátka 2x 10 min roztokem PBS-T a 1x 10 min roztokem PBS. Poté byl na membránu nanesen vyvíjecí roztok/substrát pro křenovou peroxidázu, který vzniká smícháním dvou složek (luminolu a peroxidu vodíku) v poměru 1:1 (dle pokynů výrobce, Santa Cruz Biotechnology). Inkubace probíhala 1 min. Membrána byla následně okapána a vložena do průhledné kancelářské folie, v temné komoře byl na ni přiložen film (Kodak BioMax Light Film) do kazety a po vhodné době expozice (1-5 min) byl film vyvolán.

7.10. MTT test stanovení procenta živých buněk

Procento živých buněk bylo stanoveno pomocí Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen) dle návodu výrobce. Žluté MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) se činností mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce redukuje na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po přidání detergentu (lauroylsírán sodný, SDS) a okyselení (0,01 M HCl) se barvivo z buněk uvolní a rozpustí, čímž vzniká čirý roztok vhodný k fotometrickému stanovení.

Nejprve byly spočítány buňky pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny na stejnou koncentraci (10 000-40 000 buněk/ml na jednu jamku pro inkubaci s příslušným inhibitorem). Samotnému MTT testu předchází inkubace senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk v koncentrační řadě daného inhibitoru (imatinib, nilotinib, dasatinib, amilorid, EIPA, DCB, FK-506, indomethacin, cyklosporin A) dle konkrétního experimentu. Inkubace buněk probíhá tři dny při 37 °C v 5% atmosféře CO₂ v 1 ml média obsahujícího danou koncentraci konkrétního inhibitoru v mikrotitračních destičkách o dvanácti jamkách.

Nejdříve byl připraven 12mM MTT zásobní roztok přidáním 1 ml sterilního PBS do jedné vialky s 5 mg MTT a vortexován dokud se MTT nerozpustilo (komponenta A). Do lahvičky obsahující 1 g SDS bylo přidáno 10 ml 0,01 M HCl a lahvička byla vortexována do rozpuštění SDS (komponenta B). Buňky inkubované v 12-jamkové destičce byly rozsuspendovány pomocí pipety. Do jamek na 96-jamkové mikrotitrační destičce byly napipetovány vzorky z 12-jamkové mikrotitrační destičky (senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk s příslušným inhibitorem dle experimentu) v triplicátech po 100 µl. Do každé jamky se vzorkem v 12-jamkové mikrotitrační destičce bylo přidáno 10 µl 12mM MTT ze zásobního roztoku (komponenta A). V případě negativní kontroly bylo přidáno 10 µl 12mM MTT do čistého média. Mikrotitrační destička byla inkubována 4 hodiny při 37 °C. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl roztoku SDS-HCl (komponenta B). Mikrotitrační destička byla posléze inkubována při 37 °C 12-16 hodin v inkubátoru. (Delší inkubace snižují senzitivitu eseje.) Pomocí pipety byly vzorky promíchány a byla měřena absorbance při 570 nm v přístroji Chameleon (Hidex).

7.11. Zpracování dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2003. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v Microsoft Excel s použitím nepárového Studentova t-testu. Za statisticky významný rozdíl byl považován rozdíl $p < 0,05$. Data představují průměr \pm směrodatná odchylka.

7.12. Vyhodnocení signálů z filmů

Filmy byly skenovány GS 800 kalibrovaným denzitometrem (Bio-Rad). Analýza obrazu byla provedena manuálně v programu Quantity One. Obrázky byly uloženy jako nekomprimovaný soubor TIFF.

7.13. Vyhodnocení MTT esaje

Měření absorpce mikrotitračních destiček bylo provedeno v přístroji Chameleon (Hidex) použitím programu MicroWin a data byla zpracována v Microsoft Excel.

7.14. 2-DE elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) je kombinace dvou způsobů separace proteinů - prvním rozměrem je izoelektrická fokusace, tj. separace proteinů podle jejich izoelektrických bodů v gelových stripech, druhý rozměr tvoří ekvilibrace stripu a přenos proteinů na polyakrylamidový gel s obsahem dodecylsulfátu sodného, ve kterém dochází k rozdělení podle molekulové hmotnosti (MW).

příprava vzorků a měření koncentrace proteinů

Na 1 analýzu bylo sklizeno cca 100 mil. buněk pro jeden systém (senzitivní, rezistentní). Buněčné pelety promyté 3x v PBS byly rozmrazeny a resuspendovány v extrakčním (rehydratačním) pufru. Vždy bylo připraveno 6 ml rehydratačního pufru, doplněného čerstvě o navážky 54 mg DTT, 240 mg CHAPS a přidávkem 60 μ l amfolytů (IPG buffer pH 4–7, Amersham). Nejdříve bylo k buněčným peletům přidáno 1 ml rehydratačního pufru, po důkladném vortexování a centrifugaci nesolubilizovaného materiálu byla v supernatantu změřena koncentrace proteinů Bradfordovou metodou (Bio-Rad) (viz. kap. 7.5). Koncentrace byla přidáním dalších objemů rehydratačního pufru

upravena tak, aby se vždy nanášelo 450 µl objemu vzorku na 1 strip při stejné nanášece proteinů kolem 1mg/strip.

rehydratace stripů

Rehydratace stripů se 450 µl vzorku probíhala 20 min, stripy byly umístěny gelovou stranou dolů, posléze byl systém drážek se stripy zalit minerálním olejem a rehydratace pokračovala přes noc (12h).

Isoelektrická fokusace (IEF)

Druhý den byly stripy po opláchnutí deionizovanou vodou (dH₂O) přeneseny do drážek systému pro isoelektrickou fokusaci (IEF) (Protean IEF cell, Bio-Rad), umístěny gelovou stranou dolů a byly zality minerálním olejem. IEF probíhala za následujících podmínek: 250 V 30 min, 3000 V 2h, 5000 V 12h a na závěr udržovacích 500 V do zastavení fokusace, celkově 60 kVh při omezení proudu 50 µA/1strip a nastavení teploty 18 °C.

ekvilibrace stripu

Po izoelektrické fokusaci byly stripy ekvilibrovány v ekvilibračním pufru, 15 min s rozpuštěným DTT a 15 min s rozpuštěným iodacetamidem (redukce, alkylace). Na 10 ml ekvilibračního pufru bylo použito 100 mg DTT a 240 mg iodacetamidu.

SDS-PAGE - příprava gelů

Nalévání gelů bylo prováděno ve stejný den, kdy byla spuštěna IEF přes noc. Roztok byl připraven dle rozpisu (Tabulka 3). Po přidání katalyzátorů polymerace akrylamidu (APS, TEMED) byl roztok použit k plnění skel pro gely v PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber (Bio-Rad) adaptérem pro spodní plnění pomocí peristaltické pumpy na maximální rychlost, doba trvání 12ti gelů byla cca 5 min. Po nalití byl gelový roztok pro zatuhnutí bez přístupu vzduchu překryt roztokem vodou saturovaného isobutanolu. Po cca 1h tuhnutí byl isobutanol odstraněn, povrch gelů omyt stříčkou s ddH₂O a gely byly zality roztokem 1,5M Tris pH 8,8 obsahujícím 0,1% SDS a ponechány přes noc do druhého dne pro druhý rozměr po IEF, SDS-PAGE.

SDS-PAGE

Po ekvilibraci byly stripy opláchnuty v SDS-PAGE running buffer a přeneseny na povrch připravených 12ti 10 % velkých gelů pro druhý rozměr. 2-DE byla prováděna na systému PROTEAN Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) pro 12 gelů o rozměrech 20x25 cm (6x senzitivní a 6x rezistentní buňky). Stripy byly k povrchu gelů fixovány zalitím 1-2 ml 0,5% agarózy rozpuštěné v running (elektrodovém) pufru a obarvené bromophenol blue. Druhý rozměr probíhal za konstantního chlazení na 20 °C a při stálé cirkulaci pufru při konstantním napětí 200 V po dobu +/- 6h.

barvení a odbarvení gelu

Po ukončení 2-DE byl každý gel promyt 3x 15min v dH₂O a následně barven přes noc SimplyBlue® SafeStain (Invitrogen) obsahující 2% NaCl. Odbarvování probíhalo druhý den v dH₂O.

analýza gelů a výběr spotů

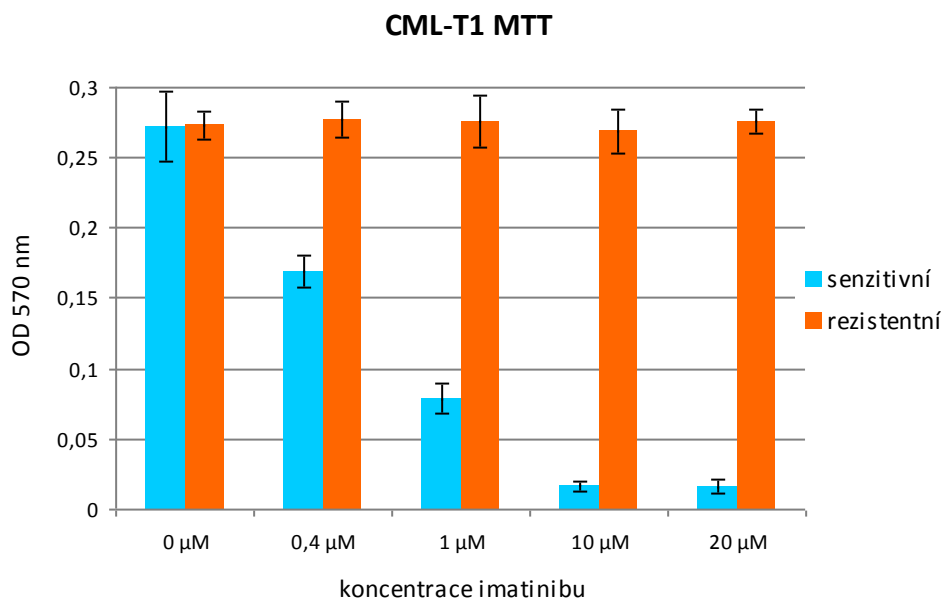
Gely byly naskenovány zamokra na denzitometru GS-800 (Bio-Rad) a digitální obrazy gelů byly zpracovány pomocí programu Phoretix 2D za účelem srovnání a kvantifikace jednotlivých spotů. Pracovalo se v semi-manuálním modu, pro statistické vyhodnocení se bralo v úvahu 5 relevantních gelů pro každý systém. Průměrné integrované denzity jednotlivých proteinových spotů byly srovnány mezi skupinami gelů. Jednotlivé proteinové spoty byly označeny jako diferenciálně syntetizovaný protein za následujících kritérií: rozdíl v průměrné normalizované denzitě spotů je větší než násobek 1,5 a statistická hodnota významnosti *p* stanovená t-testem byla menší než 0,05.

Gely byly uchovávány v lednici v 0,2% octové kyselině. Obrázky gelů byly použity pro vypichování požadovaných spotů z gelu za pomoci seříznuté špičky. Vyříznuté části gelů byly odeslány pro trypsinizaci proteinů v gelu a identifikaci proteinů metodou MALDI-TOF/TOF-MS (Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze) (Petrák et al., 2009).

8. Výsledky

8.1. Vývoj rezistentní linie CML-T1

Linie CML-T1 byla senzitivní na imatinibem indukovanou apoptózu a sloužila jako kontrola. Linie CML-T1 rezistentní na 20 μ M imatinib byla vytvořena dlouhodobým selektivním tlakem zvyšujících se koncentrací imatinibu v médiu. Nejprve byly buňky (10 000 buněk/ml) vysety na 12-jamkovou mikrotitrační destičku, kde byla vytvořena koncentrační řada 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 μ M imatinibu. Po třech dnech bylo pomocí MTT testu stanoveno IC₅₀ (koncentrace, při které přežije 50% buněk) na 0,45 μ M imatinib. Přežívající buňky z jamky o koncentraci 0,2 μ M imatinibu byly kultivovány v kultivačních lahvích a koncentrace imatinibu v médiu byla zvyšována na dvojnásobek přibližně každých deset dní. Rezistence byla definována jako schopnost buněk přežít dlouhodobé pasážování v dané koncentraci imatinibu. Porovnání senzitivní a rezistentní linie CML-T1 po přidání vzestupných koncentrací imatinibu je ukázáno v grafu (Obr. 8).



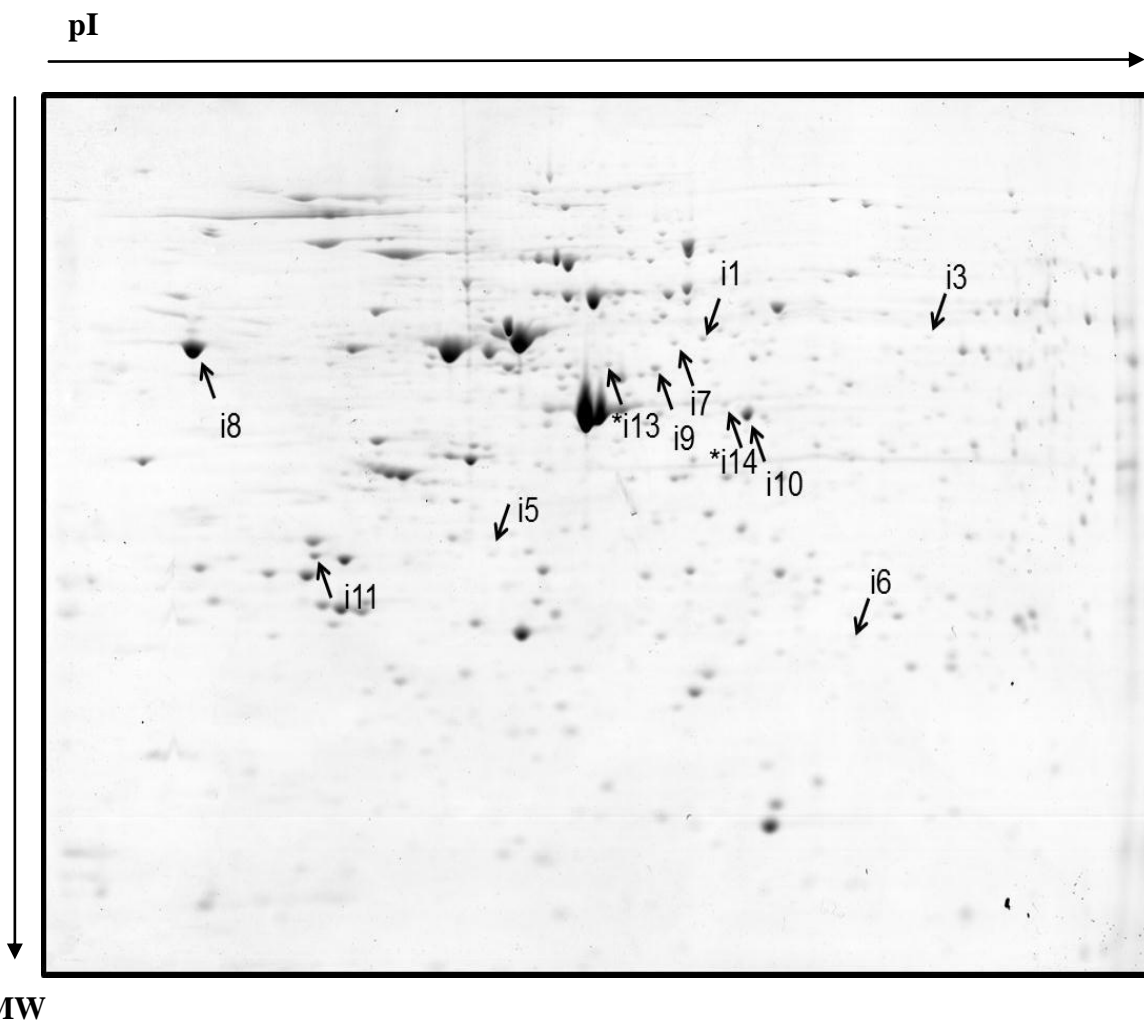
Obr. 8 MTT test životnosti buněk linie CML-T1 senzitivní a rezistentní na 20 μ M imatinib. Graf dokazuje rezistenci na imatinib u rezistentní linie CML-T1. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Na spolupracujícím pracovišti (Oddělení molekulární genetiky, Ústav hematologie a krevní transfuze) byla provedena analýza četnosti mutací přítomných v populacích senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Bylo zjištěno, že senzitivní CML-T1 buňky mají mutaci M244V zastoupenou 50%. U imatinib rezistentních CML-T1 buněk se mutace M244V vyskytuje také v 50% a navíc se u nich vyskytuje mutace Y253H v 69%.

8.2. Proteomická analýza senzitivní a rezistentní CML-T1 linie

Senzitivní a rezistentní linie CML-T1 byly použity pro proteomickou analýzu za účelem porovnat expresní profily proteinů použitím dvourozměrné elektroforézy na dvanácti velkých polyakrylamidových gelech (PROTEAN[®] Plus Dodeca Cell, Bio Rad). Bylo sklizeno cca 100 mil. buněk (senzitivní CML-T1 a CML-T1 rezistentní na 20 μ M imatinib), které byly následně resuspendovány v rehydratačním pufru na koncentraci 2mg/ml tak, aby na jeden strip bylo nanášeno 1 mg proteinů. Po obarvení gelů v SimplyBlue[®] SafeStain (Invitrogen) byly jednotlivé spoty detekovány a kvantifikovány pomocí programu Phoretix. Bylo detekováno a kvantifikováno 1200 spotů na gel. Kritérium pro určení spotu jako diferenciálně exprimovaného byla změna min 1,5 násobku v kvantifikaci v šesti měřeních. V porovnání se senzitivními buňkami bylo u rezistentní linie nalezeno 11 proteinových spotů (Obr. 9), u kterých byla výrazná kvantitativní změna exprese. Relativní násobky v expresi se pohybovaly v rozmezí od 1,56 do 6,8. Kandidátní diferenciálně exprimované proteiny byly posléze vyříznuty z gelů. Pomocí MALDI-TOF/TOF-MS se podařilo identifikovat 11 diferenciálně exprimovaných proteinů z vybraných spotů (Tabulka 5). Tyto diferenciálně exprimované proteiny se účastní různých buněčných dějů, např. metabolismu vápníku (kalretikulin/calreticulin) a nukleotidů (adenosin deaminase), DNA metabolismu (RuvB-like 2), buněčného stresu (Heat shock protein beta-1), vesikulárního transportu (Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog) či patří mezi cytoskeletární komponenty (Microtubule-associated protein RP/EB family member 1, Tropomyosin alpha-4 chain) nebo adaptorové proteiny (Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor-NHERF1).

8.3. Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů



Obr. 9 Diferenciálně exprimované proteiny v rezistentních CML-T1 buňkách. 10% 2DE gel (pH 4-7) ukazuje diferenciálně exprimované proteiny v imatinib rezistentních buňkách identifikované pomocí Phoretix software, označeno šipkami (šipky směřující nahoru-proteiny se zvýšenou expresí, směřující dolů-proteiny se sníženou expresí u rezistentních CML-T1 buněk); pI, izoelektrický bod; MW, molecular weight, molekulová hmotnost.

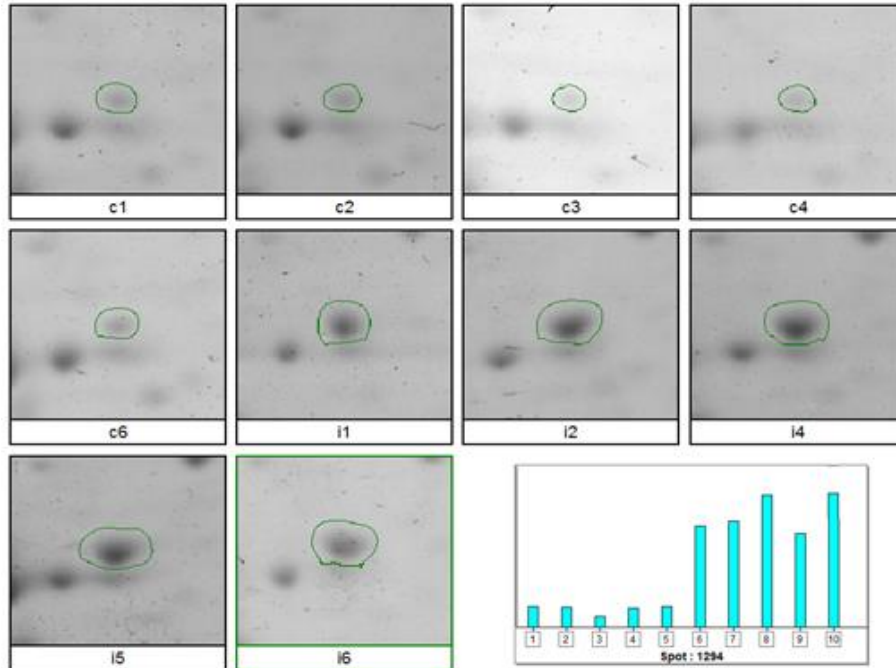
Tabulka 5 Diferenciálně exprimované proteiny v buňkách CML-T1 rezistentních na imatinib.

| snížená exprese | | | | | | | | |
|--------------------|---------|--|----------|-------|-------|------|------|-------------|
| spot č. | uniprot | název proteinu | coverage | score | mass | pI | fold | p hodnota < |
| i1 | Q9Y230 | RuvB-like 2 | 38% | 149 | 51296 | 5,49 | 2,17 | 0,02 |
| i3 | Q99536 | Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog | 34% | 60 | 42122 | 5,88 | 3,7 | 0,0385 |
| i5 | Q15691 | Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 | 53% | 89 | 30151 | 5,02 | 1,86 | 0,0046 |
| i6 | P04792 | Heat shock protein beta-1 | 44% | 75 | 22826 | 5,98 | 2,2 | 0,0012 |
| zvýšená exprese | | | | | | | | |
| spot č. | uniprot | název proteinu | coverage | score | mass | pI | fold | p hodnota < |
| i7 | Q9Y230 | RuvB-like 2 | 29% | 81 | 51296 | 5,49 | 6,8 | 0,015 |
| i8 | P27797 | Calreticulin | 24% | 71 | 48283 | 4,29 | 1,8 | 0,023 |
| i9 | O14745 | Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory factor NHERF1 | 21% | 57 | 39130 | 5,55 | 2,84 | 0,0085 |
| i10 | P00813 | Adenosine deaminase | 36% | 87 | 41024 | 5,63 | 2,9 | 0,0094 |
| i11 | P67936 | Tropomyosin alpha-4 chain | 63% | 198 | 28619 | 4,67 | 1,56 | 0,0355 |
| nově syntetizované | | | | | | | | |
| spot č. | uniprot | název proteinu | | | | | | |
| i13 | O14745 | Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory cofactor NHERF1 | | | | | | |
| i14 | P04792 | Heat shock protein beta-1 | | | | | | |

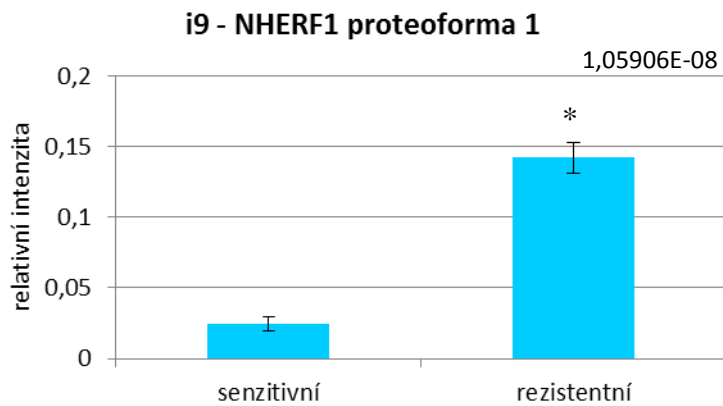
8.4. Hledání proteinů jako zásahových míst s terapeutickým potenciálem

Z diferenciólně exprimovaných proteinů byl jako marker rezistence vybrán protein NHERF1. Protein NHERF1 byl vybrán z důvodu detekce dvou proteoforem – jedné s jeho zvýšenou expresí (Obr. 10) a druhé jako nově syntetizované (Obr. 11), obě přítomné u imatinib rezistentních CML-T1 buněk.

A



B

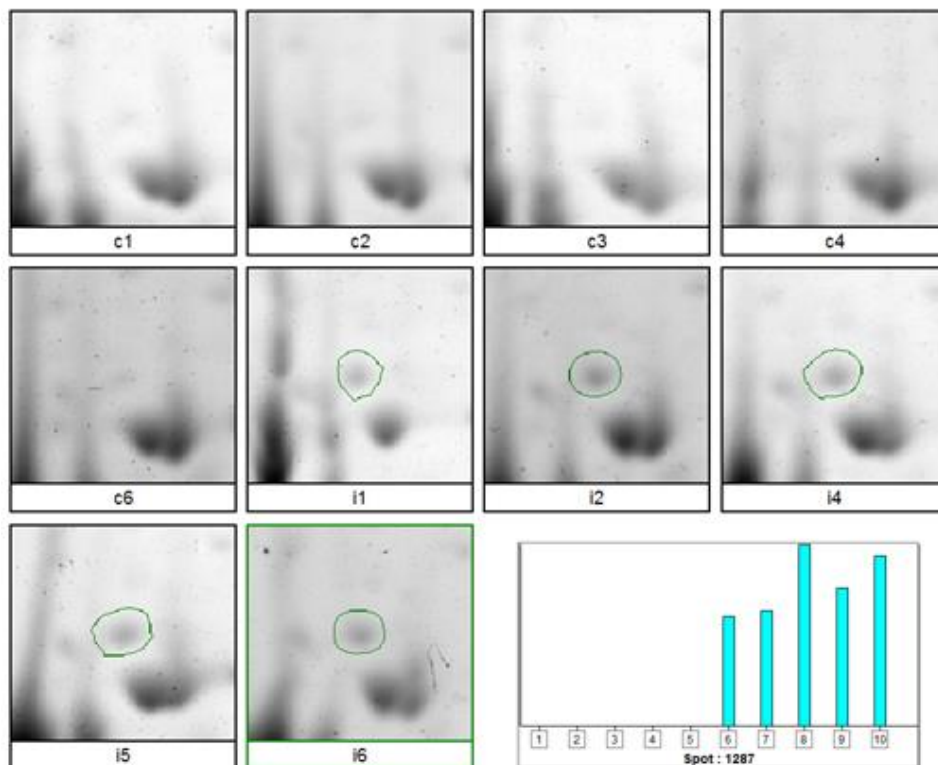


Obr. 10 Diferenciální exprese NHERF1 proteoformy 1 v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

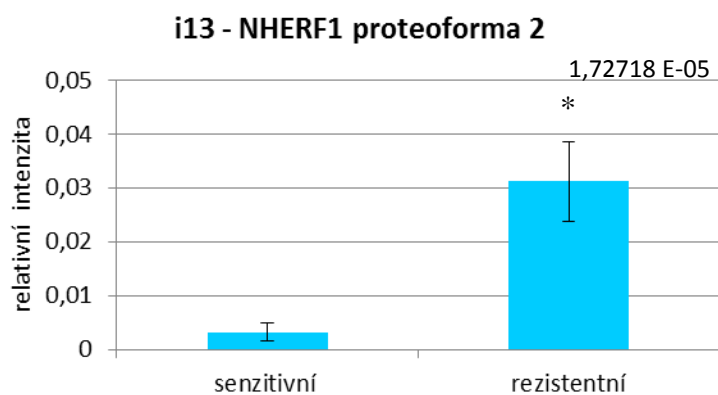
A) Výseky z 2-DE gelů. Proteomická analýza vycházela z 6 2DE gelů ze senzitivních buněk a 6 2DE gelů z rezistentních buněk. 5 gelů z každého systému bylo použito pro vyhodnocení programem Phoretix c1, c2, c3, c4, c6 představují senzitivní CML-T1 buňky; i1, i2, i4, i5, i6 představují rezistentní CML-T1 buňky. Denzitometrická analýza jednotlivých spotů byla provedena pomocí Phoretix 2D software, jednotlivé hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v programu MS Excel. Proteoforma 1 (spot i9 na 2-DE gelu) proteinu identifikovaného později MS-MALDI jako NHERF1.

B) Průměr z hodnot denzitometrické analýzy provedené pomocí Phoretix 2D software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

A



B



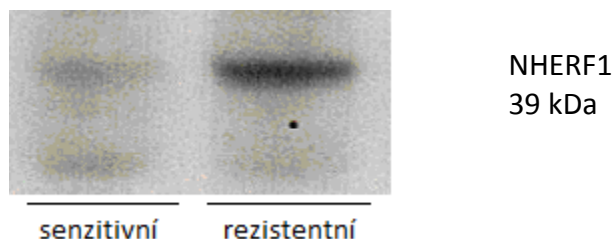
Obr. 11 Diferenciální exprese NHERF1 proteoforma 2 v lysátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Výseky z 2-DE gelů. Proteomická analýza vycházela z 6 2DE gelů ze senzitivních buněk a 6 2DE gelů z rezistentních buněk). 5 gelů z každého systému bylo použito pro vyhodnocení programem Phoretix. c1, c2, c3, c4, c6 představují senzitivní CML-T1 buňky; i1, i2, i4, i5, i6 představují rezistentní CML-T1 buňky. Densitometrická analýza jednotlivých spotů byla provedena pomocí Phoretix 2D software, jednotlivé hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v programu Excel. Proteoforma 2 (spot i13 na 2-DE gelu) proteinu identifikovaného později MS-MALDI jako NHERF1.

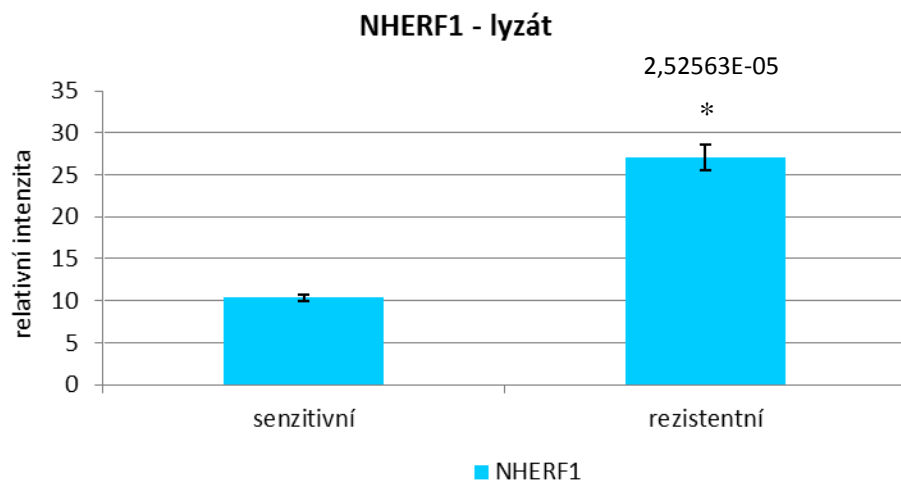
B) Průměr z hodnot densitometrické analýzy provedené pomocí Phoretix 2D software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

Diferenciální exprese proteinu NHERF1 byla potvrzena v lyzátech pomocí Western blotu (Obr. 12). Protein NHERF1 byl také nalezen diferenciálně exprimován v jádrech CML-T1 buněk (Obr. 13), kde byla jeho exprese vyšší u rezistentních CML-T1 buněk v porovnání se senzitivními. Expres proteinu NHERF1 byla statisticky významně vyšší jak v lyzátech, tak i v jádrech rezistentních CML-T1 buněk.

A



B

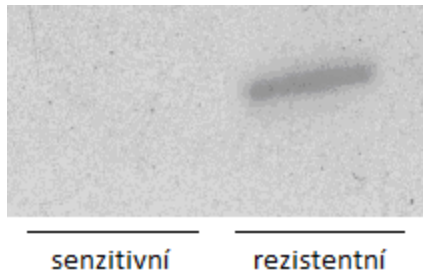


Obr. 12 Srovnání exprese proteinu NHERF1 v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

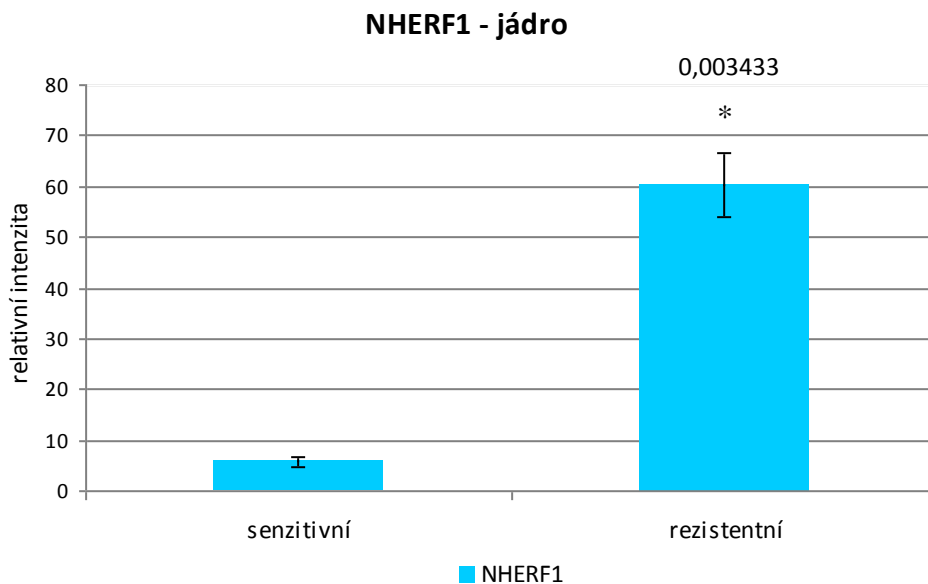
A) Western blot proteinu NHERF1. Protein NHERF1 byl detekován v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese proteinu NHERF1. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

A



B



Obr. 13 Srovnání exprese proteinu NHERF1 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

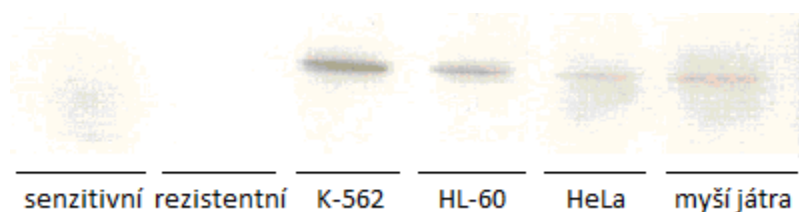
A) Western blot proteinu NHERF1. Protein NHERF1 byl detekován v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých pokusů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese celkového proteinu NHERF1. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

Proč právě imatinib rezistentní CML-T1 buňky potřebují zvýšené množství NHERF1 proteinu? Na základě dostupných informací z vědeckých publikací byly navrženy tři možné způsoby fungování NHERF1 proteinu v rezistentní CML-T1 linii.

8.4.1. NHERF1: Regulace Mrp2 transportéru

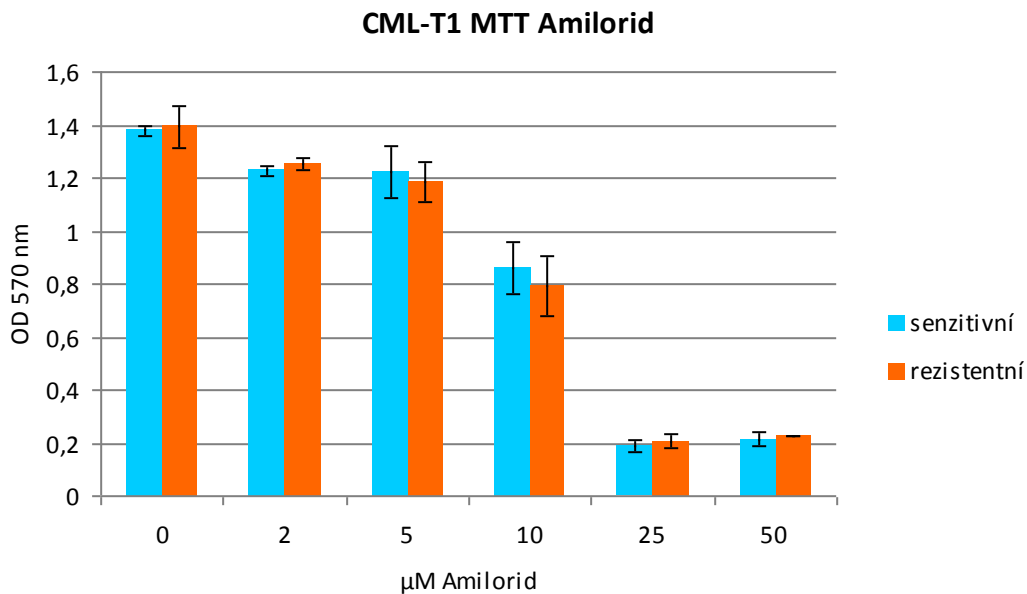
Pro možnost případné role proteinu NHERF1 v mechanismu rezistence spojené s kooperací s Mrp2 transportérem jsme potřebovali ověřit, zda je Mrp2 identifikovatelný v našich buněčných liniích. Jako pozitivní kontrolu jsme použili lyzáty z buněčných linií či tkáňových vzorků používaných v naší laboratoři, které by podle dostupných informací (proteinatlas.org, PubMed), měly být pozitivní na Mrp2. Na obr. 14 je patrné, že, Mrp2 transportér v těchto kontrolních lyzátech byl pomocí western blotu detekován, avšak u buněčných linií CMLT1 nebyla přítomnost proteinu Mrp2 metodou western blot prokázána.



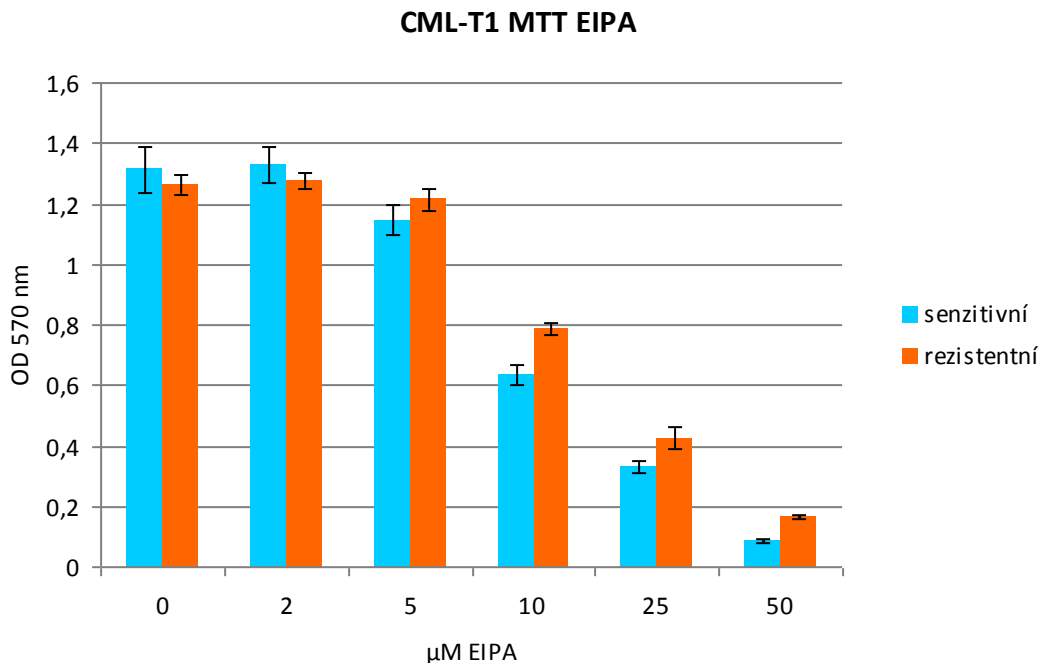
Obr. 14 Detekce Mrp2 transportéru v lyzátech (senzitivní a rezistentní CML-T1 buňky, K-562, HL-60, HeLa, myší játra). Mrp2 transportér nebyl u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk detekován. Lyzáty z buněk K-562, HL-60, HeLa a myších jater byly získány z naší laboratoře.

8.4.2. NHERF1: Regulace Na⁺/H⁺ přenašeče (NHE-1)

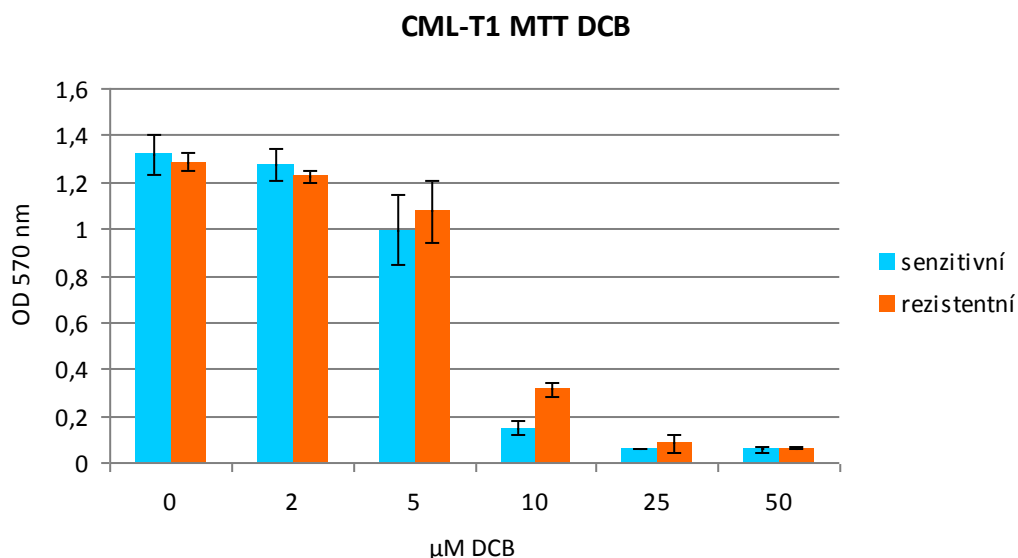
Zvýšená exprese proteinu NHERF1 by mohla u rezistentních buněk prostřednictvím Na⁺/H⁺ přenašeče vyrovnávat změny v cytosolickém pH způsobené např. apoptózou. Aplikace inhibitorů NHE-1 přenašeče by podle této úvahy mohla vyvolávat apoptózu u rezistentních buněk. U senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk jsme provedli MTT testy s klinicky používanými inhibitory Na⁺/H⁺ a Na⁺/Ca²⁺ přenašečů. Použité inhibitory byly amilorid, EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride) a DCB (3,4-dichlorobenzamil hydrochloride). Výsledky MTT testů ovšem neprokázaly specifickou účinnost těchto inhibitorů při porovnání senzitivních a rezistentních buněk: na oba druhy buněk měly shodný účinek při stejných koncentracích (IC₅₀ amilorid 15μM (Obr. 15), IC₅₀ EIPA 10μM (Obr. 16), IC₅₀ DCB 7μM (Obr. 17)).



Obr. 15 Vliv amiloridu na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Amilorid nevykazuje selektivní účinek na rezistentní CML-T1 buňky, působí nespecificky. Životnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr \pm směrodatná odchylka.



Obr. 16 Vliv EIPA na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. EIPA nevykazuje selektivní účinek na rezistentní buňky. Životnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr \pm směrodatná odchylka.



Obr. 17 Vliv DCB na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

DCB nevykazuje selektivní účinek na rezistentní buňky. Životnost buněk byla stanovena pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze dvou nezávislých experimentů a ukázána jako průměr ± směrodatná odchylka.

8.4.3. NHERF1: Napojení na Wnt signalizaci

Zvýšená exprese proteinu NHERF1 byla zkoumána také z hlediska možného ovlivnění vnitrobuněčné signalizace. Pomocí metody Western blot jsme sledovali expresi proteinů Wnt signálních drah u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

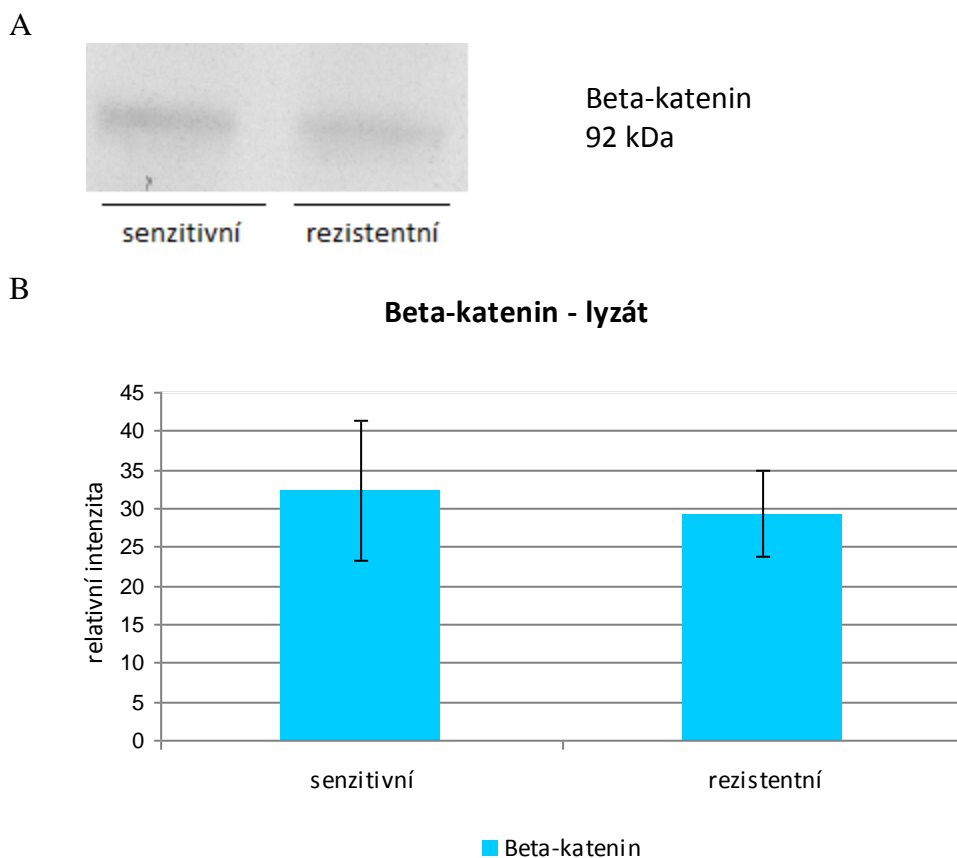
8.4.3.1. Proteiny kanonické Wnt signální dráhy

Beta-katenin

Beta-katenin fungující jako koaktivátor transkripčních faktorů LEF/TCF je klíčovou efektorovou molekulou kanonické Wnt signalizace (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996).

Celkový beta-katenin

Nejdříve jsme se zaměřili na detekci celkového množství beta-kateninu v lyzátech, cytoplazmě a jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Expresce celkového beta-kateninu byla nepatrně vyšší v lyzátech u senzitivních buněk (Obr. 18). Naopak expresce beta-kateninu v cytoplazmě byla nepatrně vyšší u rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 19). Expresce celkového beta-kateninu v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk byla statisticky výrazně nižší u rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 20).

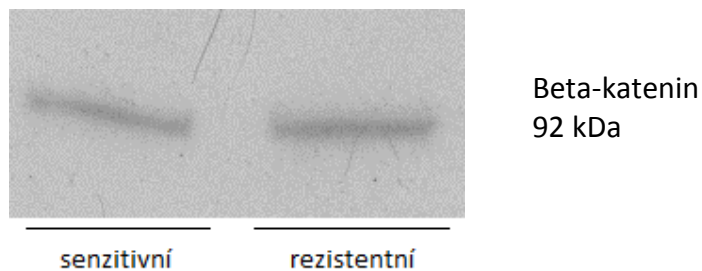


Obr. 18 Detekce celkového množství beta-kateninu v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

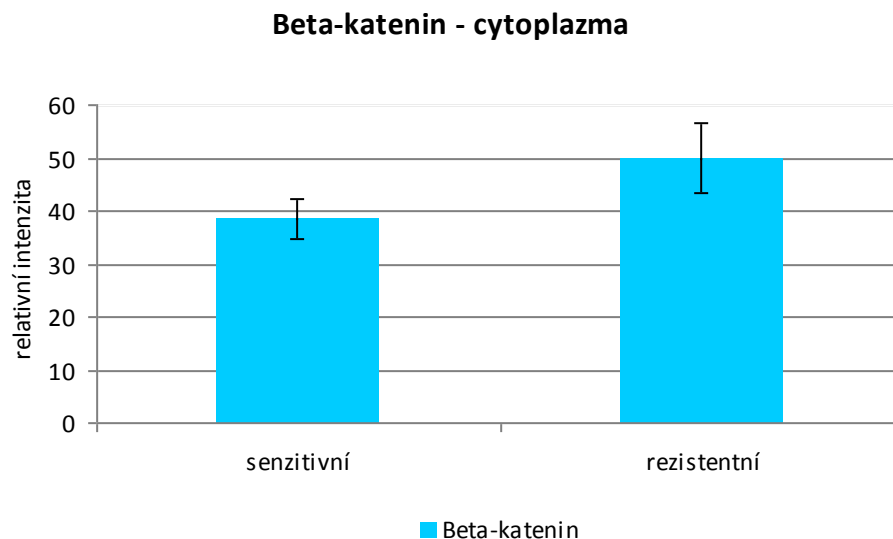
A) Western blot celkového beta-kateninu. Celkový beta-katenin byl detekován v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese celkového beta-kateninu. Data vyhodnocena ze dvou nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

A



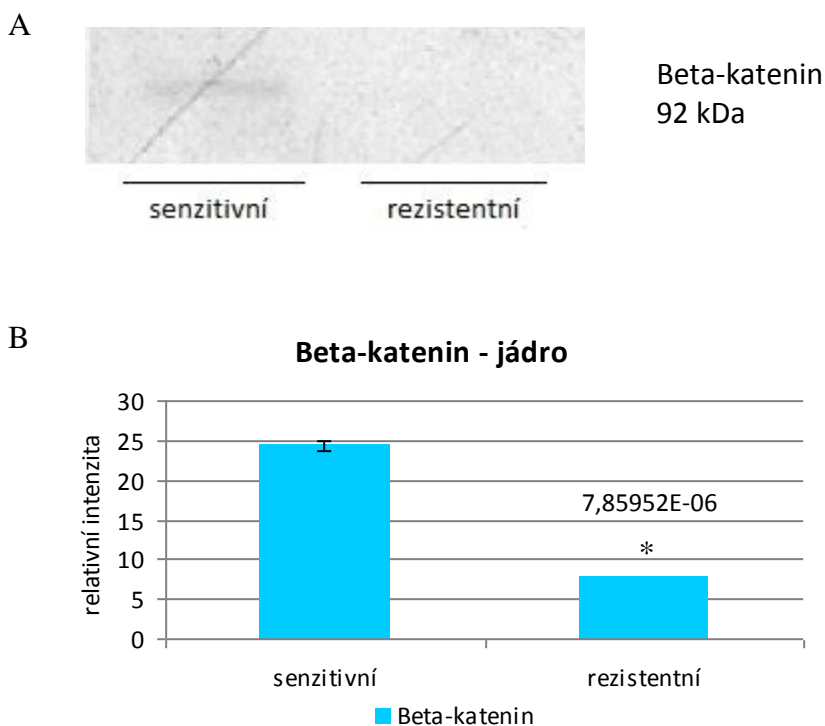
B



Obr. 19 Detekce celkového množství beta-kateninu v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot celkového beta-kateninu. Celkový beta-katenin byl detekován v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese celkového beta-kateninu. Data vyhodnocena ze dvou nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí *Quantity One* software.



Obr. 20 Detekce celkového množství beta-kateninu v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot celkového beta-kateninu. Celkový beta-katenin byl detekován v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese celkového beta-kateninu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí *Quantity One* software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým *t*-testem v *MS Excel*. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota *p* (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

Fosforylovaný beta-katenin

V buňce dochází k fosforylaci beta-kateninu na různých aminokyselinových zbytcích. Různě fosforylované formy beta-kateninu ovlivňují stabilitu a aktivitu tohoto proteinu (Yost et al., 1996; Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002; Hino et al., 2005; Taurin et al., 2006; Fang et al., 2007; He et al., 2007).

fosforylace beta-kateninu vedoucí k jeho degradaci

V senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách jsme zkoumali expresi beta-kateninu fosforylovaného na Thr41/Ser45. Statisticky významně vyšší expresi takto fosforylovaného beta-kateninu jsme našli v lysátech senzitivních buněk (Obr. 21).

A

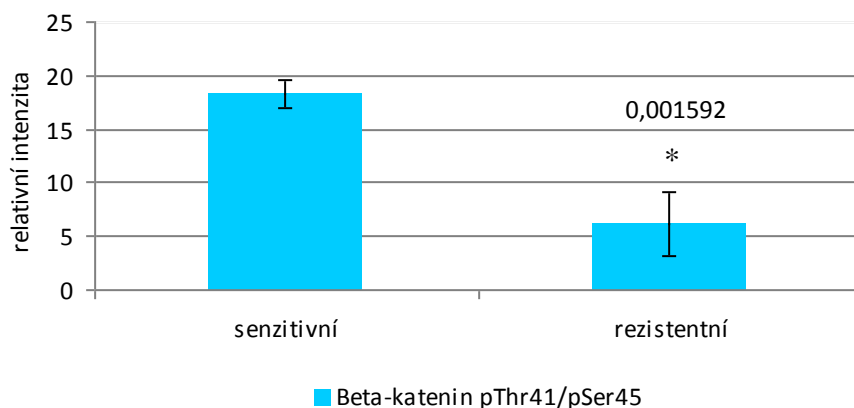


Beta-katenin pThr41/pSer45
92 kDa

senzitivní rezistentní

B

Beta-katenin pThr41/pSer45 - lyzát

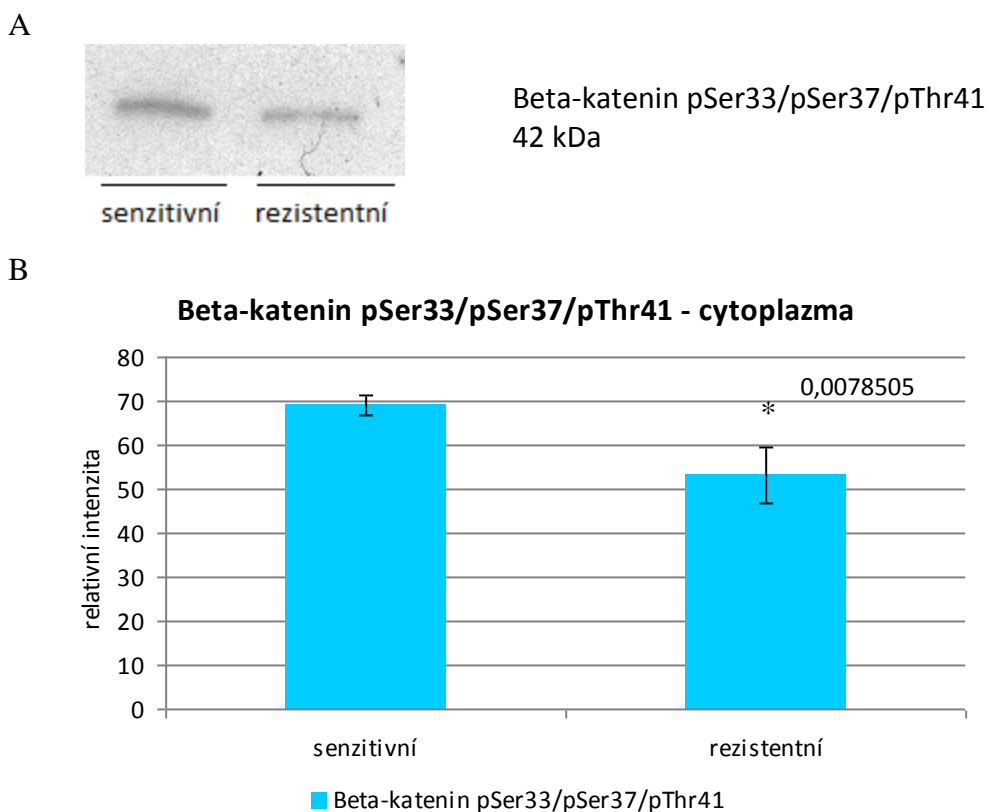


Obr. 21 Detekce beta-kateninu fosforylovaného na Thr41/Ser45 v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot beta-kateninu fosforylovaného na Thr41/Ser45. Beta-katenin fosforylovaný na Thr41/Ser45 byl nalezen v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Densitometrická kvantifikace hladiny beta-kateninu pThr41/pSer45 přítomného v lyzátech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

V senzitivních i rezistentních CML-T1 buňkách byla stanovena exprese beta-kateninu fosforylovaného na Ser33/Ser37/Thr41. Takto fosforylovaný beta-katenin byl nalezen ve větší míře v cytoplasmě senzitivních CML-T1 buněk (Obr. 22).



Obr. 22 Detekce beta-kateninu fosforylovaného na Ser33/Ser37/Thr41 v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

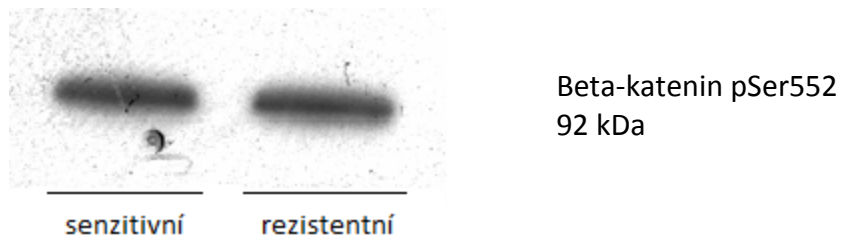
A) Western blot beta-kateninu fosforylovaného na Ser33/Ser37/Thr41. Beta-katenin fosforylovaný na Ser33/Ser37/Thr41 byl nalezen v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Densitometrická kvantifikace hladiny beta-kateninu pSer33/pSer37/pThr41 přítomného v cytoplazmě. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

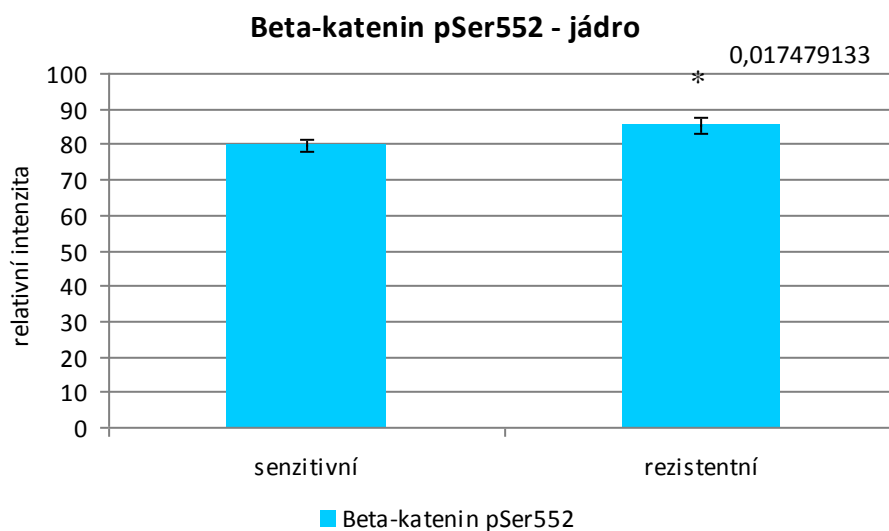
fosforylace beta-kateninu mající za následek jeho stabilizaci a aktivaci transkripce

Imunodetekce beta-kateninu fosforylovaného na Ser552 western blotem prokázala přítomnost takto modifikovaného beta-kateninu v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk, statisticky vyšší exprese beta-kateninu pSer552 byla v jádrech rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 23). Beta-katenin pSer552 nebyl detekován v cytoplazmatické frakci.

A



B



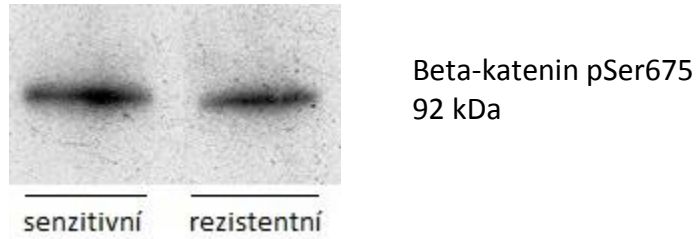
Obr. 23 Detekce beta-kateninu fosforylovaného na Ser 552 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot beta-kateninu fosforylovaného na Ser 552. Beta-katenin fosforylovaný na Ser 552 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk, nikoliv v cytoplazmě. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

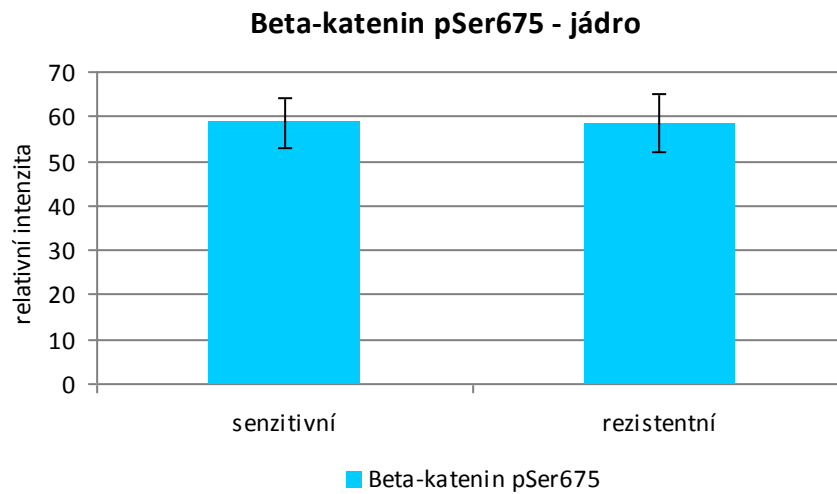
B) Denzitometrická kvantifikace exprese beta-kateninu pSer552. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

Beta-katenin fosforylovaný na Ser675 byl rovněž detekován pouze v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk a ne v cytoplazmě (Obr. 24).

A



B



Obr. 24 Detekce beta-kateninu fosforylovaného na Ser 675 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Beta-katenin fosforylovaný na Ser 675 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk, nikoliv v cytoplazmě. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

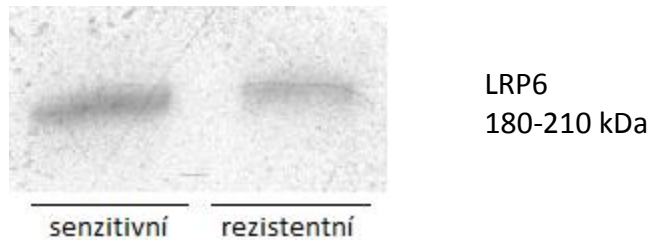
B) Densitometrická kvantifikace exprese beta-kateninu pSer675. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

Lze tedy soudit, že beta-katenin je transkripčně aktivní jak u senzitivních tak i rezistentních buněk a že kanonická dráha je u obou těchto případů ve stavu „zapnuto“. Mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami je pravděpodobně rozdílná úroveň degradace beta-kateninu.

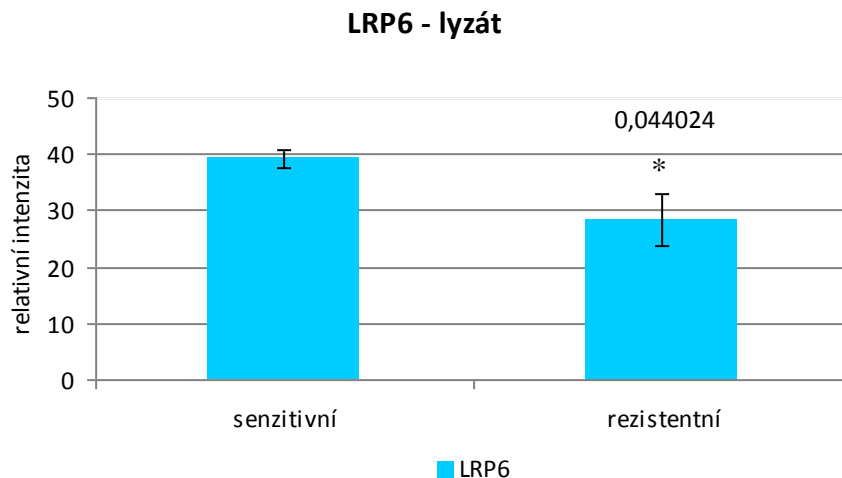
Protein LRP6 a jeho fosforylovaná forma

Zkoumali jsme expresi proteinu LRP6, který funguje jako koreceptor ve Wnt signální dráze (Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000). Protein LRP6 jsme našli v lyzátech senzitivních CML-T1 buněk, kde byla jeho exprese statisticky výrazně vyšší než v případě rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 25).

A



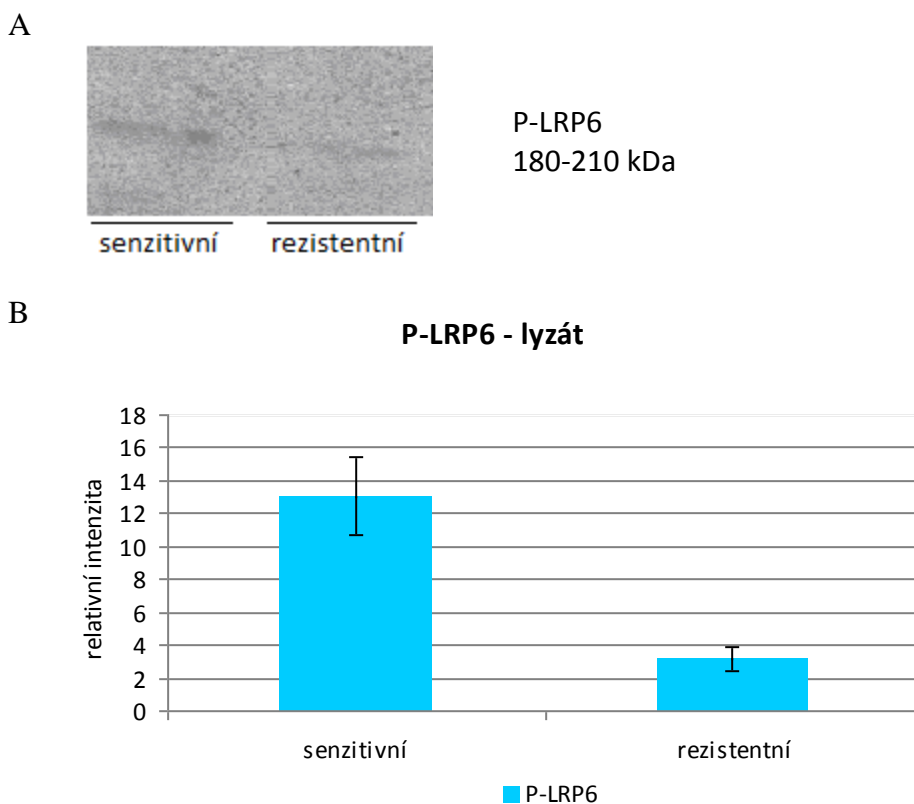
B



Obr. 25 Detekce proteinu LRP6 v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot proteinu LRP6. Protein LRP6 byl nalezen v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Densitometrická kvantifikace exprese proteinu LRP6 přítomného v lyzátech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.



Obr. 26 Detekce fosforylované formy proteinu LRP6 v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.
 A) Western blot fosforylovaného proteinu LRP6. Fosforylovaný protein LRP6 byl nalezen v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou nezávislých experimentů.
 B) Denzitometrická kvantifikace exprese fosforylovaného proteinu LRP6 přítomného v lyzátech. Data vyhodnocena ze dvou nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

Fosforylovanou formu LRP6 koreceptoru jsme našli ve větším množství v lyzátech senzitivních CML-T1 buněk (Obr. 26).

Transkripční faktory aktivované kanonické Wnt signální dráhy a jejich produkty

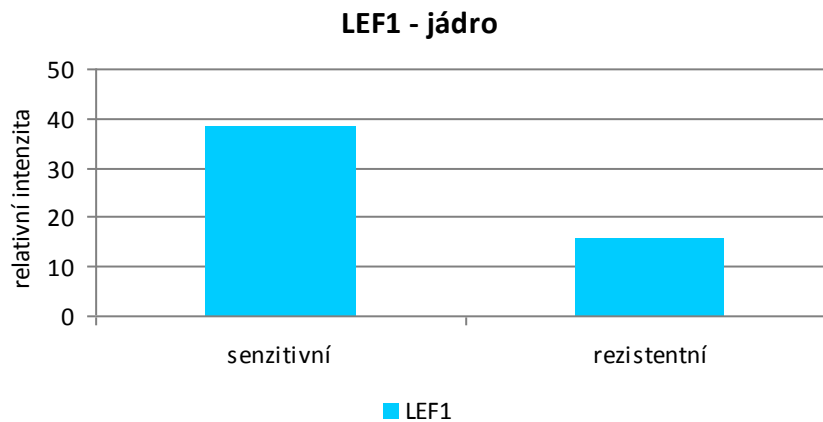
TCF/LEF

TCF/LEF se váží na Wnt „response elements“ a vytváří místo pro vazbu beta-kateninu, který se po aktivaci Wnt signální dráhy translokuje do jádra a aktivuje transkripci cílových genů (Behrens et al., 1999; Molenaar et al., 1996).

A



B



Obr. 27 Detekce transkripčního faktoru LEF1 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot transkripčního faktoru LEF1 (Lymphoid Enhancer Factor 1). LEF1 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot z jednoho experimentu.

B) Densitometrická kvantifikace hladiny LEF1 přítomného v jádrech. Vyhodnoceno z jednoho experimentu. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

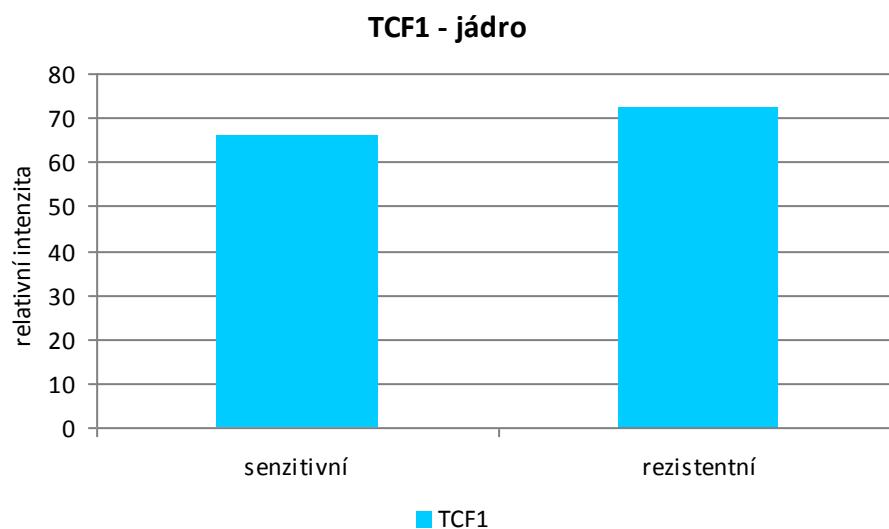
Expres transkripčního faktoru LEF1 byla vyšší v jádrech senzitivních buněk v porovnání s buňkami rezistentními (Obr. 27).

Expres transkripčního faktoru TCF1 byla přibližně stejná u senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 28).

A



B



Obr. 28 Detekce transkripčního faktoru TCF1 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot transkripčního faktoru TCF1 (T Cell Factor 1). TCF1 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot z jednoho experimentu.

B) Denzitometrická kvantifikace hladiny TCF1 přítomného v jádrech. Vyhodnoceno z jednoho experimentu. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

c-Myc

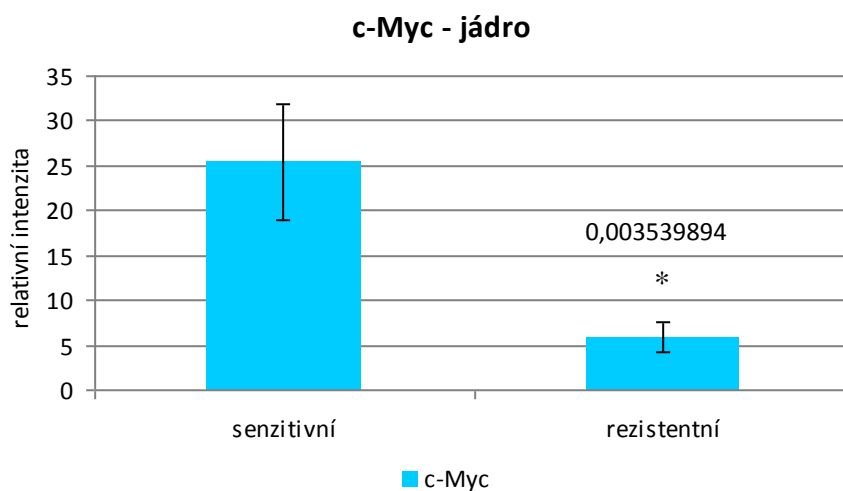
Jako další marker kanonické Wnt signalizace jsme testovali přítomnost protoonkogenu a transkripčního faktoru c-Myc u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Expze proteinu c-Myc byla statisticky výrazně nižší v jádrech rezistentních CML-T1 buněk ve srovnání s CML-T1 buňkami senzitivními (Obr. 29).

Přestože tedy detekce aktivovaných forem beta-kateninu v jádrech jak senzitivních tak rezistentních CML-T1 buněk naznačuje zapnutou kanonickou Wnt signální dráhu, cílový transkripční faktor Wnt dráhy nebyl detekován u rezistentních CML-T1 buněk.

A



B



Obr. 29 Detekce proteinu c-Myc v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

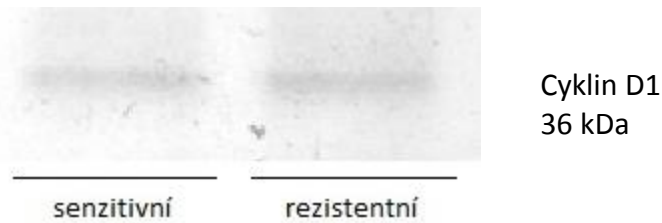
A) Western blot proteinu c-Myc. Protein c-Myc byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace expze proteinu c-Myc přítomného v jádrech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

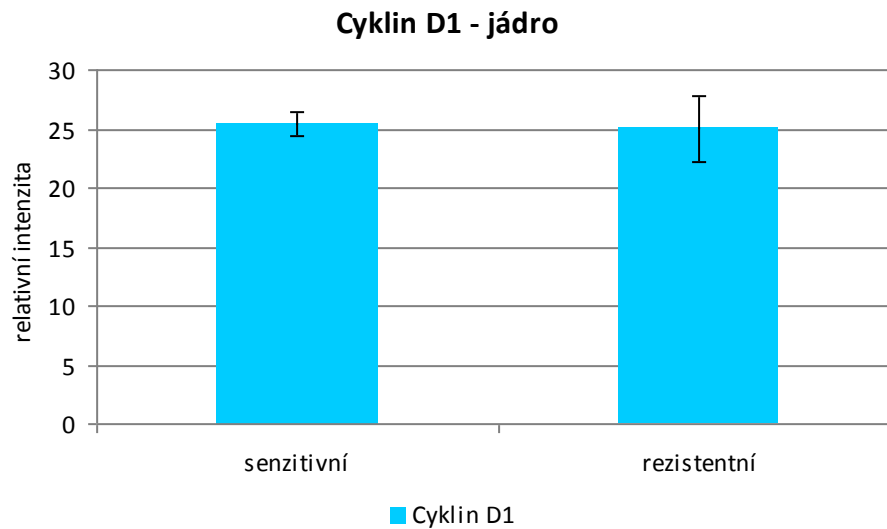
Cyklin D1

Dalším transkripčním cílem Wnt signální dráhy je cyklin D1 (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick 1999). Rozdíl v expresi cyklinu D1 mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami nebyl statisticky významný ($p=0,4125106$) (Obr. 30).

A



B



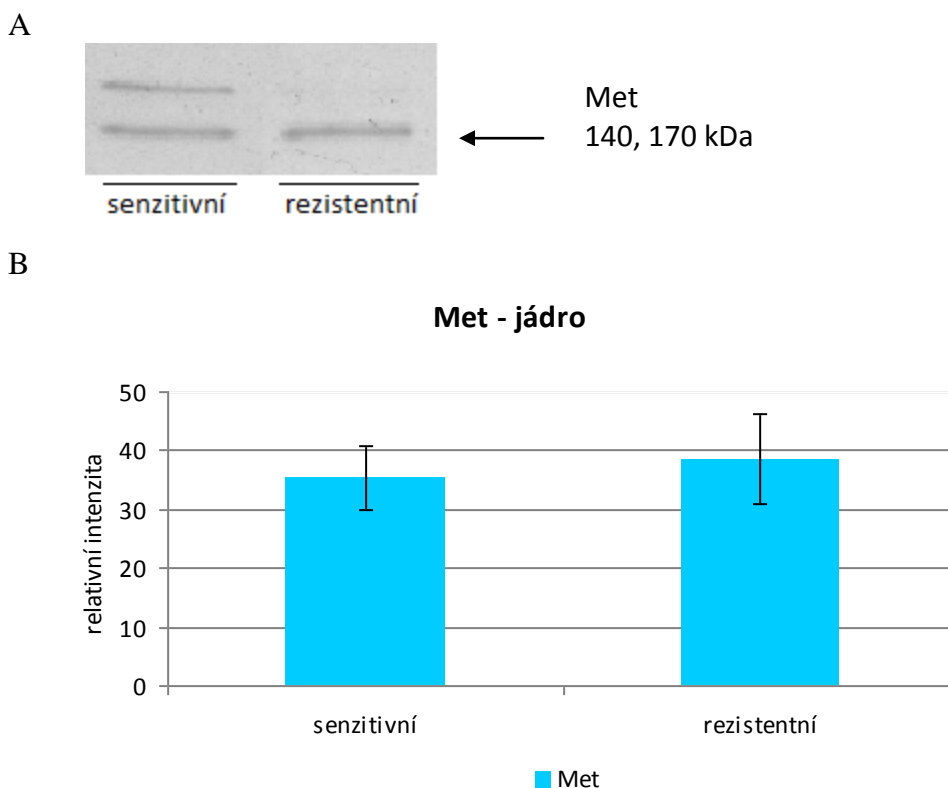
Obr. 30 Detekce cyklin D1 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot proteinu cyklinu D1. Cyklin D1 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese proteinu cyklinu D1 přítomného v jádrech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým *t*-testem v MS Excel. Rozdíl nebyl statisticky významný, $p=0,41251068$.

Met

Transkripčním cílem Wnt signální dráhy je také tyrosin kináza Met, která byla navržena jako terapeutický cíl v některých maligních onemocněních (Sattler and Salgia, 2009). Tyrosin kináza Met byla nalezena v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk přibližně ve stejném množství, rozdíl v expresi mezi senzitivními a rezistentnímu CML-T1 buňkami nebyl statisticky významný ($p=0,297987$) (Obr. 31).



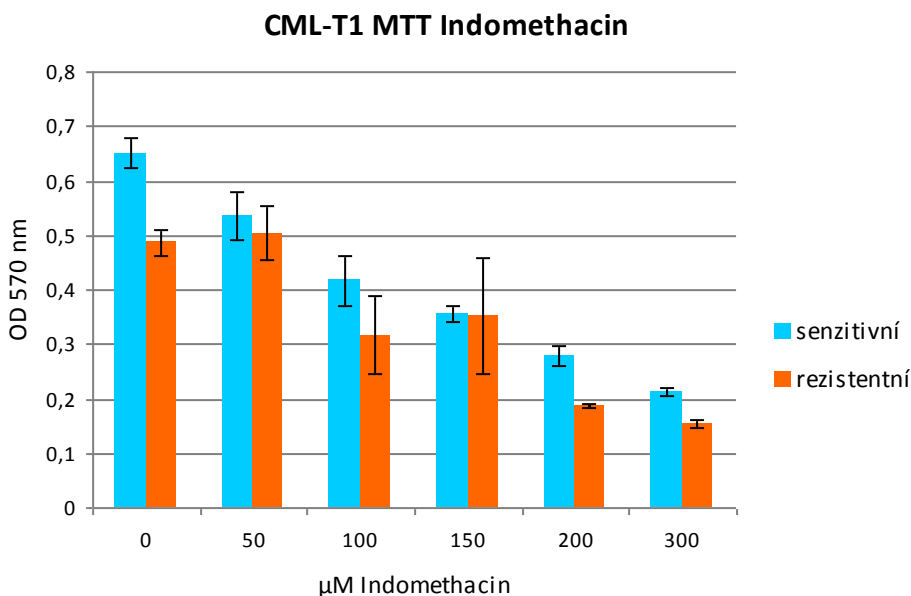
Obr. 31 Detekce tyrosin kinázy Met v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot tyrosin kinázy Met. Tyrosin kináza Met byla nalezena v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese tyrosin kinázy Met přítomné v jádrech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Rozdíl nebyl statisticky významný, $p=0,297987$.

Cyklooxygenáza 2

Nepřímou metodou pomocí inhibice produktu cílového genu kanonické Wnt signální dráhy a následným MTT testem jsme zkoumali životaschopnost senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk v přítomnosti indomethacinu - inhibitoru cyklooxygenázy 1 a 2 (COX-1/2) (Obr. 32). Exprese cyklooxygenázy 2 (COX-2) je regulována prostřednictvím kanonické Wnt signální dráhy (Araki et al., 2003). Chtěli jsme si tak ověřit předpoklad, že pokud senzitivní i rezistentní CML-T1 buňky mají aktivní kanonickou Wnt signální dráhu, inhibice transkripčního cíle této dráhy COX-2 bude nespecificky působit proti senzitivní i rezistentní linii CML-T1 buněk.



Obr. 32 Vliv indomethacinu na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

Indomethacin je inhibitor cyklooxygenázy 2 (COX-2), která patří mezi transkripční cíle kanonické Wnt signální dráhy. Po inhibici COX-2 došlo k eliminaci senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk jsme stanovili pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Na základě detekce aktivní formy fosforylovaného beta-ateninu v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk předpokládáme, že kanonická Wnt signální dráha je aktivní u obou buněčných linií. V případě aktivní kanonické Wnt signální dráhy

u senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk jsme očekávali nespécifické působení inhibitoru cyklooxygenázy 2, které se nám potvrdilo.

Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli studovat expresi dalších proteinů účastnících se především nekanonických Wnt signálních drah.

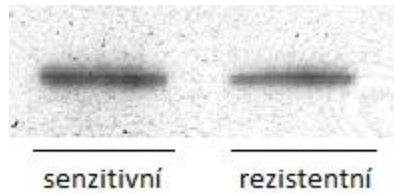
8.4.3.2. Proteiny (kanonické i) nekanonické Wnt signální dráhy

Nejprve jsme studovali expresi proteinů Dishevelled 2 a Dishevelled 3, které se účastní kanonické i nekanonické Wnt signalizace, abychom zjistili, zda existují rozdíly v expresi těchto proteinů mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami.

Dishevelled 2

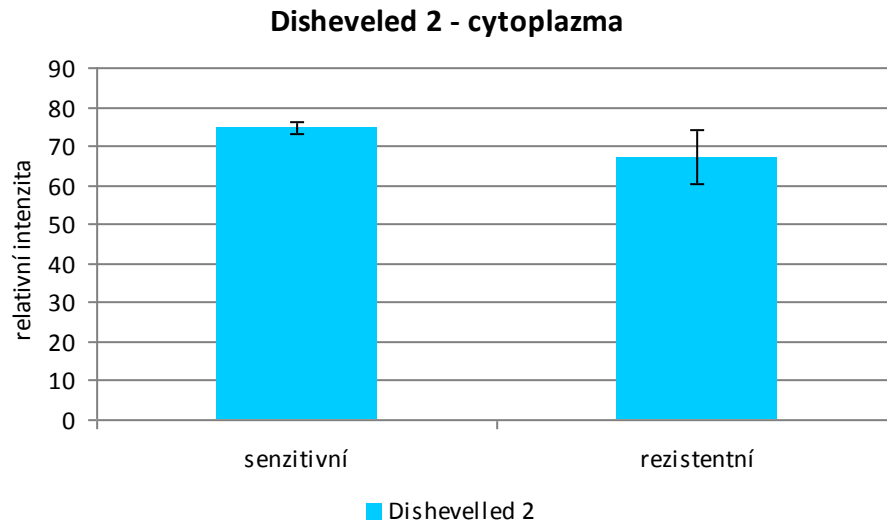
Prvním proteinem, jehož expresi jsme stanovovali v cytoplazmě pomocí Western blotu u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk, byl protein Dvl2. Nedetekovali jsme výrazné rozdíly v expresi mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami ($p=0,065119498$) (Obr. 33).

A



Dishevelled 2
90-95 kDa

B



Obr. 33 Detekce protein Dishevelled 2 v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách.

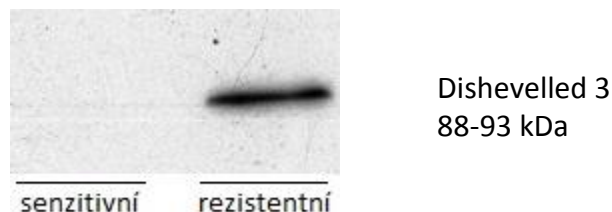
A) Western blot proteinu Dishevelled 2. Protein Dishevelled 2 byl nalezen v cytoplasmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese proteinu Dishevelled 2 přítomného v cytoplasmě. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako průměr ± směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Rozdíl nebyl statisticky významný, $p=0,065119498$.

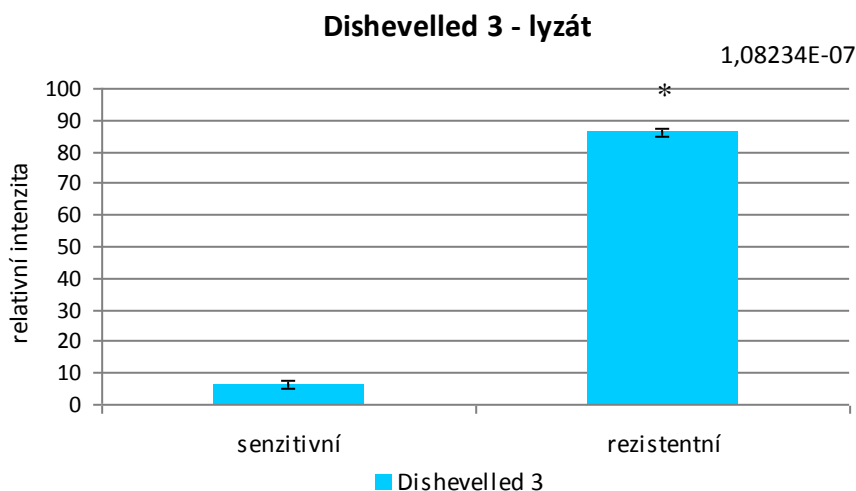
Dishevelled 3

Zjistili jsme, že protein Dishevelled 3 je narozdíl od proteinu Dishvelled 2 exprimován pouze v lyzátech rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 34).

A



B



Obr. 34 Detekce protein Dishevelled 3 v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách.

A) Western blot proteinu Dishvelled 3. Protein Dishevelled 3 byl nalezen v lyzátech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

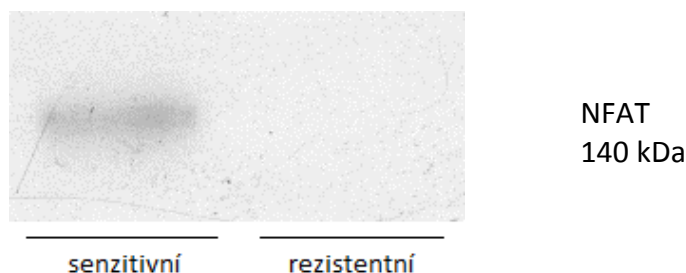
B) Denzitometrická kvantifikace exprese proteinu Dishevelled 3 přítomného v lyzátech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

8.4.3.2.1. Proteiny Wnt/Ca²⁺ signální dráhy

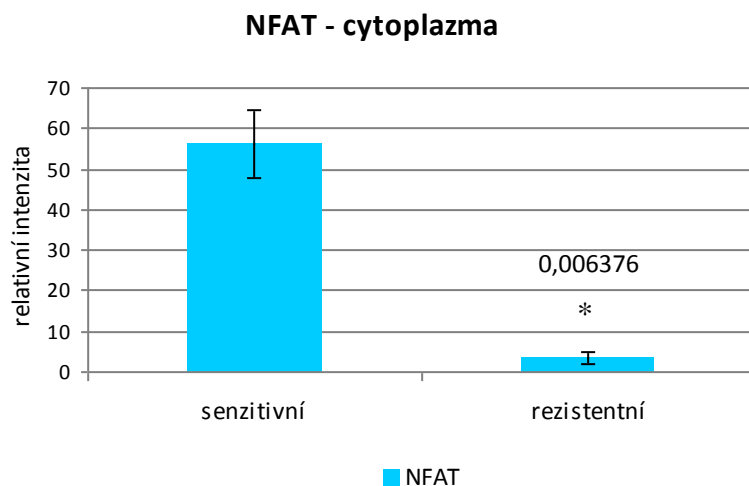
NFAT

Studovali jsme expresi transkripčního faktoru NFAT v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách. Tento transkripční faktor jsme detekovali v cytoplazmě a jádrech senzitivních CML-T1 buněk. V cytoplazmě (Obr. 35) i jádrech (Obr. 36) rezistentních CML-T1 buněk byla exprese transkripčního faktoru NFAT statisticky výrazně nižší než u senzitivních CML-T1 buněk. Senzitivní CML-T1 buňky mají tedy přítomny v jádře efekторы kanonické i nekanonické Wnt signální dráhy.

A



B



Obr. 35 Detekce transkripčního faktoru NFAT v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

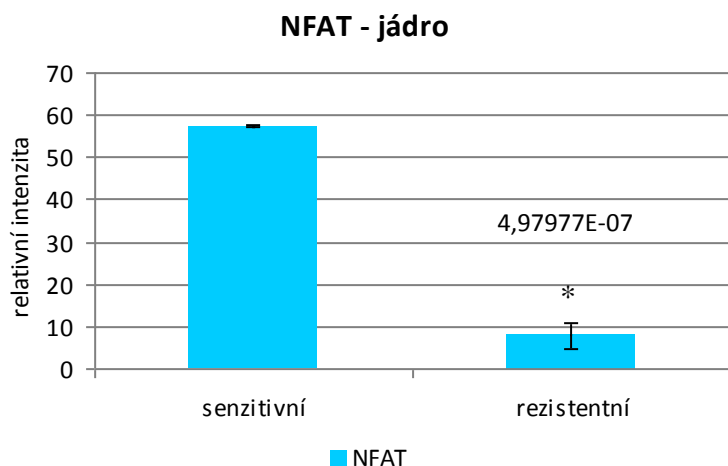
A) Western blot transkripčního faktoru NFAT. Transkripční faktor NFAT byl nalezen v cytoplazmě senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese transkripčního faktoru NFAT přítomného v cytoplazmě. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým t-testem v MS Excel. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota p (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

A



B



Obr. 36 Detekce transkripčního faktoru NFAT v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot transkripčního faktoru NFAT. Transkripční faktor NFAT byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze tří nezávislých experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese transkripčního faktoru NFAT přítomného v jádrech. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí *Quantity One* software. Statistická významnost byla vyhodnocena nepárovým Studentovým *t*-testem v *MS Excel*. Statisticky významný rozdíl je označen: * $p < 0,05$ vs. senzitivní. U sloupce uvedena hodnota *p* (hladina statistické významnosti rozdílu) v porovnání se senzitivními buňkami.

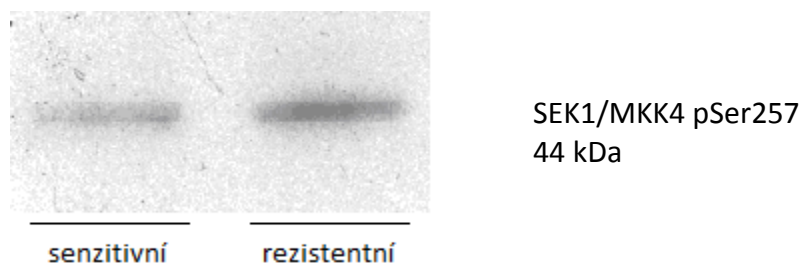
8.4.3.2.2. Proteiny Wnt/PCP signální dráhy

Za předpokladu, že protein Dishevelled působí jako integrátor buněčné Wnt signalizace přepínající mezi kanonickou a nekanonickými drahami (Gao and Chen, 2010), z nichž dráhu Wnt/Ca²⁺ jsme odhalili u rezistentních buněk jako vypnutou, jsme dodatečně ověřovali expresi proteinů Wnt/PCP a MAP-kinázové dráhy.

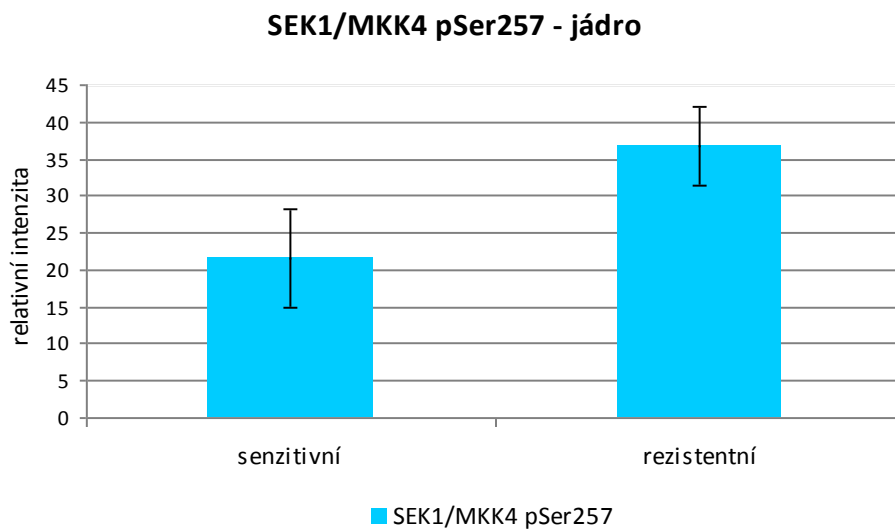
SEK1/MKK4

Zjistili jsme, že kináza SEK1/MKK4 byla exprimována pouze v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk, nikoliv v cytoplazmě. Exprese kinázy SEK1/MKK4 byla vyšší v jádrech rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 37).

A



B



Obr. 37 Detekce kinázy SEK /MKK4 pSer257 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

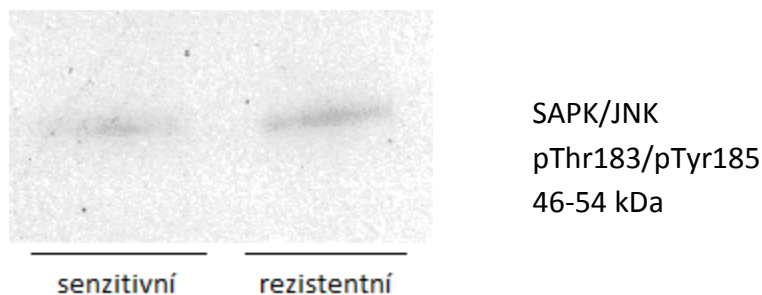
A) Western blot kinázy SEK1/MKK4 fosforylované na Ser257. Kináza SEK1/MKK4 pSer257 byla nalezena v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese kinázy SEK1/MKK4 pSer257 přítomné v jádrech. Data vyhodnocena ze dvou experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

SAPK/JNK

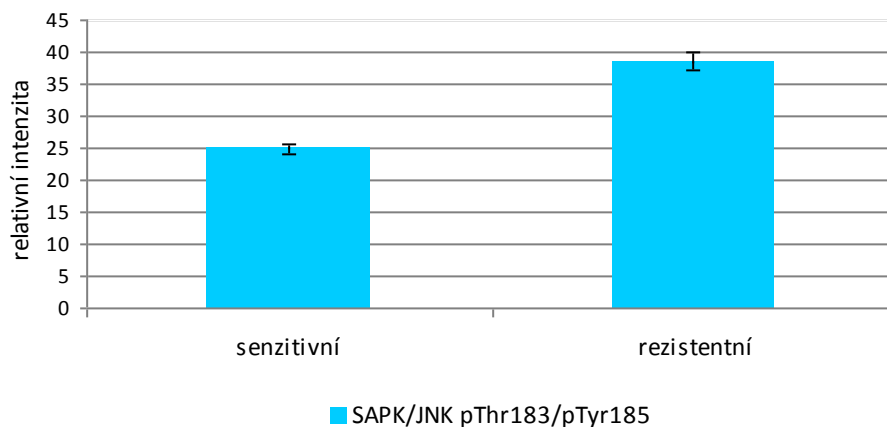
Kináza SAPK/JNK byla také nalezena pouze v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Expres kinázy SAPK/JNK byla vyšší v jádrech rezistentních CML-T1 buněk (Obr. 38).

A



B

SAPK/JNK pThr183/pTyr185 - jádro



Obr. 38 Detekce kinázy SAPK/JNK pThr183/pTyr185 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

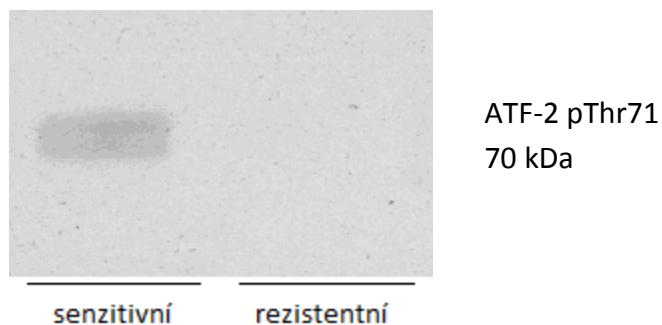
A) Western blot kinázy SAPK/JNK fosforylované na Thr183 a Tyr185. Kináza SAPK/JNK pThr183/pTyr185 byla nalezena v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou experimentů.

B) Densitometrická kvantifikace exprese kinázy SAPK/JNK pThr183/pTyr185 přítomné v jádrech. Data vyhodnocena ze dvou experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

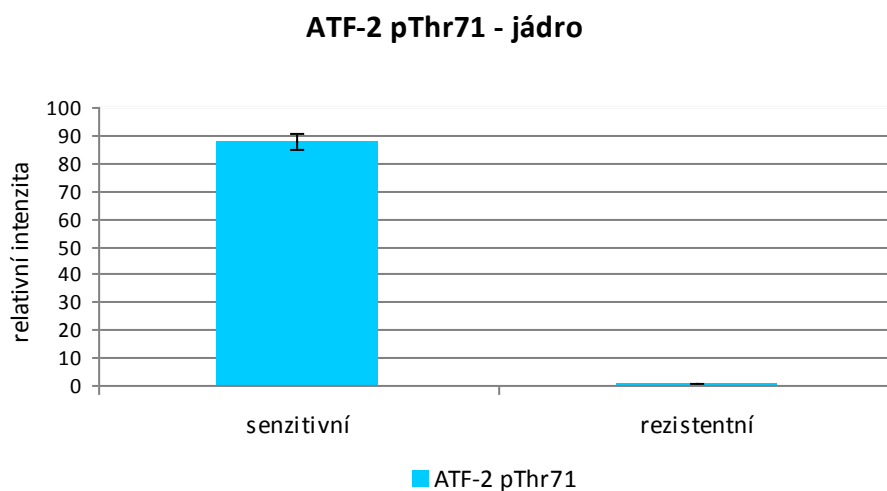
ATF-2

Transkripční faktor ATF-2 je exprimován pouze v jádrech senzitivních CML-T1 buněk, v cytoplazmě nebyl detekován (Obr. 39).

A



B



Obr. 39 Detekce transkripčního faktoru ATF-2 pThr71 v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot proteinu ATF-2 fosforylované na Thr71. Protein ATF-2 pThr71 byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Ukázán je jeden western blot ze dvou experimentů.

B) Denzitometrická kvantifikace exprese proteinu ATF-2 pThr71 přítomného v jádrech. Data vyhodnocena ze dvou experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

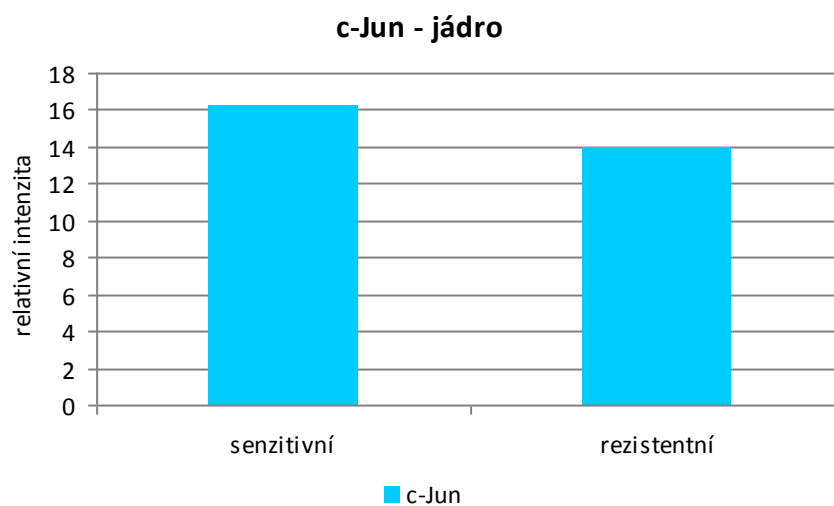
c-Jun

Transkripční faktor c-Jun je exprimován v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. V cytoplazmě nebyl tento transkripční faktor nalezen (Obr. 40).

A



B



Obr. 40 Detekce transkripčního faktoru c-Jun v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

A) Western blot proteinu c-Jun. Protein c-Jun byl nalezen v jádrech senzitivních a rezistentních CML-T1. Ukázán je jeden western blot z jednoho experimentu.

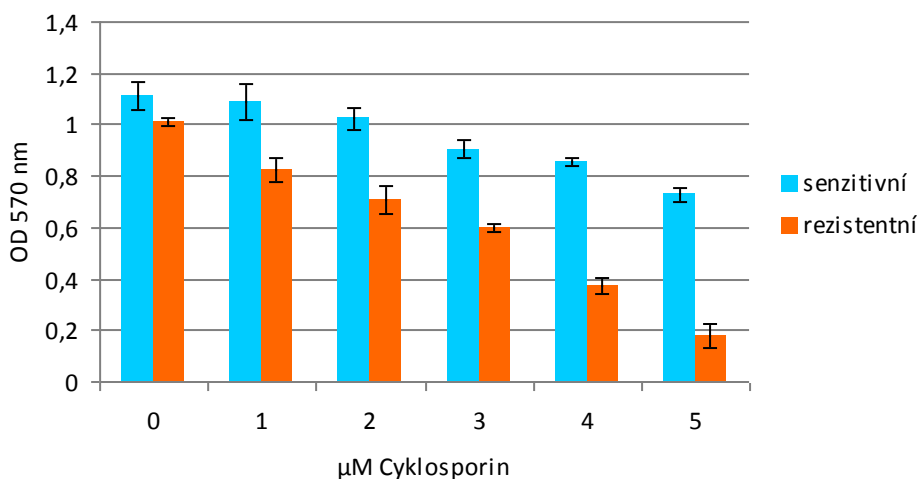
B) Densitometrická kvantifikace exprese proteinu c-Jun pSer63 přítomného v jádrech. Data z jednoho experimentu. Densitometrická analýza byla provedena pomocí Quantity One software.

8.4.3.3. Navržení zásahového místa

Navrhli jsme hypotézu, zda by „nezapnutá“ nekanonická Wnt/Ca²⁺ signalizační dráha u rezistentních buněk mohla být zásahovým místem, slabinou rezistentních CML-T1 buněk, kterou by bylo možno atakovat klinicky dostupným agens. Transkripční faktor NFAT přechází do jádra po aktivaci v cytosolu. Aktivace probíhá jako defosforylace neaktivní formy NFAT v cytosolu fosfatázou kalcineurinem (Hogan et al., 2003). Inhibice tohoto procesu by mohla mít vážné následky na metabolismus rezistentních CML-T1 buněk, zatímco senzitivní CML-T1 buňky nemusí taková míra inhibice vůbec ovlivnit. K inhibici fosfatázy kalcineurinu bylo použito dvou různých inhibitorů, cyklosporinu A a inhibitoru FK-506 (Cell Signaling). Cyklosporin A váže protein „cyclophilin“ a tento vzniklý komplex inhibuje fosfatázu kalcineurin, která je za normálních podmínek odpovědná za aktivaci NFAT (Liu et al., 1991). FK-506 váže protein „FK506-binding protein“ (12FKBP12) a vytváří tak komplex, který inhibuje fosfatázu kalcineurin (Liu et al., 1991).

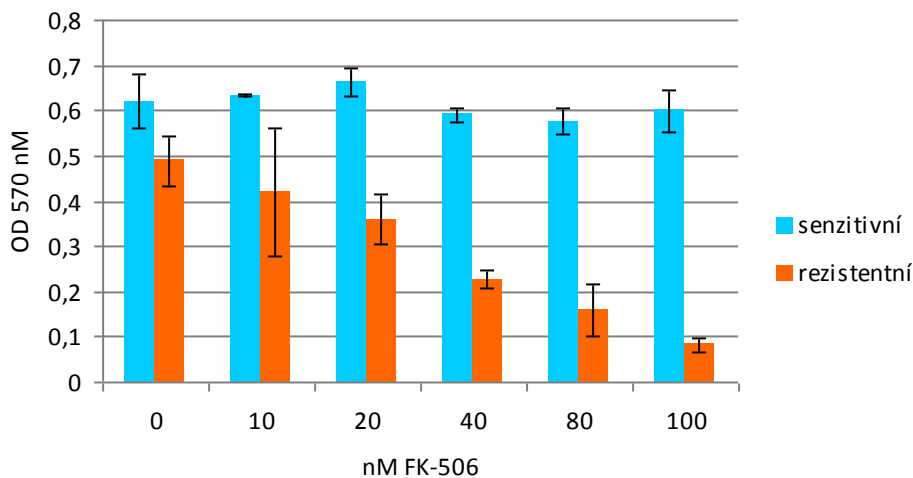
Pomocí MTT testů jsme studovali životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk v různých koncentracích inhibitorů (cyklosporin A (Obr. 41), FK-506 (Obr. 42)) fosfatázy kalcineurinu a zjistili jsme, že inhibice fosfatázy kalcineurinu vedla k selektivní eliminaci rezistentních CML-T1 buněk.

CML-T1 MTT Cyklosporin A



Obr. 41 Vliv cyklosporinu A na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Cyklosporin A je inhibitor kalcineurinu, fosfatázy, která defosforyluje a aktivuje NFAT. Inhibice fosfatázy kalcineurinu pomocí cyklosporinu vedla k selektivní eliminaci buněk CML-T1 rezistentních na 20 μ M imatinib. Životnost senzitivních i rezistentních buněk byla stanovena pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

CML-T1 MTT FK-506



Obr. 42 Vliv FK-506 na životnost senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Inhibitor FK-506 specificky inhibuje fosfatázu kalcineurin a tím i aktivaci transkripčního faktoru NFAT a jeho translokaci do jádra. Inhibitor FK-506 vykazuje selektivní účinek na buňky rezistentní na 20 μ M imatinib. Životnost byla stanovena pomocí MTT testu. Data vyhodnocena ze tří nezávislých experimentů a ukázána jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

8.4.3.4. Cytoplazmatické a jaderné markery použité pro Western blot

pozn. černá šipka označuje příslušný proužek

cytoplazma



cytoplazma jádra

Beta-aktin (cytoplazma)

42 kDa



cytoplazma jádra

GAPDH (cytoplazma)

37 kDa

jádra



cytoplazma jádra

Histon 2a (jádru)

14 kDa

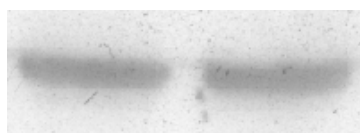


cytoplazma jádra

HP1 alfa (jádru)

22 kDa

8.4.3.5. Kontrola nanášky proteinů:



senzitivní rezistentní

Beta-aktin

42 kDa

9. Diskuze

Tato práce popisuje hledání potenciálních zásahových míst s terapeutickým potenciálem u buněk CML-T1 rezistentních na 20 μ M imatinib. Nejprve bylo nutné vytvořit dlouhodobým selekčním tlakem imatinibu v médiu rezistentní linii CML-T1 buněk. Poté byla pomocí dvourozměrné elektroforézy provedena proteomická analýza a u buněk CML-T1 rezistentních na 20 μ M imatinib byly identifikovány diferenciálně exprimované proteiny. Z těchto diferenciálně exprimovaných proteinů byl vybrán protein NHERF1. Následně je zde popsáno testování různých možností fungování proteinu NHERF1 v imatinib rezistentních CML-T1 buňkách. Ze tří uvedených možností se práce věnuje detailněji ovlivnění Wnt signalizace prostřednictvím NHERF1 proteinu. Sledováním exprese proteinů účastnících se různých Wnt signálních drah jsme chtěli přispět k nalezení potenciálního zásahového místa u buněk CML-T1 rezistentních na 20 μ M imatinib.

Rezistence k TKI je jedním z hlavních důvodů selhávání terapie. Příčin rezistence existuje mnoho, mezi nejvýznamnější patří mutace v Bcr-ABL kináze, které zabraňují vazbě TKI nebo Bcr-Abl získá konformaci neschopnou vazby TKI. Stále dochází k vývoji nových TKI inhibitorů, lze ale předpokládat, že ke vzniku nových bodových mutací v Bcr- Abl kináze bude neustále docházet. Je proto výhodné zaměřit se na inhibici alternativních signálních drah a mechanismů ovlivňujících přežívání TKI rezistentních buněk. Vznik rezistence je doprovázen změnami na úrovni genomu a proteomu rezistentních buněk. Dosud nebylo publikováno mnoho prací věnujících se proteomickým změnám v rezistentních leukemických buňkách. Rozhodli jsme se proto využít proteomické metody k hledání a identifikaci potenciálních molekulárních cílů – proteinů v imatinib rezistentních CML-T1 buňkách. Hledali jsme proteiny nebo signální dráhy, které mohou být použity jako cíle pro selektivní eliminaci imatinib rezistentních buněk. Nalezení takového proteinu by se dalo využít pro zlepšení léčby CML pomocí TKI v kombinaci s inhibitorem cíleným na daný protein.

Za účelem detekce diferenciálně exprimovaných proteinů u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk byla provedena dvourozměrná elektroforéza. Bylo nalezeno a identifikováno 11 proteinů. Nalezené diferenciálně exprimované proteiny mají v buňce různou funkci a ovlivňují různé buněčné děje, např. metabolismus vápníku (kalretikulin/calreticulin) a nukleotidů (adenosindeamináza/adenosin deaminase), DNA

metabolismus (RuvB-like 2), buněčný stres (Heat shock protein beta-1), vesikulární transport (Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog) či patří mezi cytoskeletární komponenty (Microtubule-associated protein RP/EB family member 1, Tropomyosin alpha-4 chain) nebo adaptorové proteiny (Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor - NHERF1). Proteiny „heat shock protein beta-1“ a adenosindeamináza byly nalezeny diferencióálně exprimované i v TRAIL rezistentních buňkách (Petrák et al., 2009). „Heat shock protein beta-1“ patří mezi proteiny, které jsou pomocí dvourozměrné elektroforézy nalézané často diferencióálně exprimované v různých vzorcích (Petrák et al., 2008). Z diferencióálně exprimovaných proteinů byl na základě detekce dvou proteoforem u rezistentních CML-T1 buněk vybrán protein NHERF1. U rezistentních CML-T1 buněk byla detekována jedna proteoforma se zvýšenou expresí a druhá proteoforma byla nově syntetizovaná. Diferencióální expresi proteinu NHERF1 jsme potvrdili v buněčných lyzátech pomocí Western blotu. Zvýšené množství proteinu NHERF1 bylo zjištěno v buňkách rakoviny prsu a odvozených buněčných liniích (Cardone et al., 2007), v buněčných liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu (Shibata et al., 2003) a také v buňkách maligních gliomů (Kislin et al., 2009), kde bylo poukázáno na to, že by protein NHERF1 mohl být potenciálním terapeutickým cílem. Zabývali jsme se tím, kde je protein NHERF1 u CML-T1 buněk exprimován, neboť bylo zjištěno, že může být lokalizován pod plazmatickou membránou, v cytoplazmě a v jádře (Georgescu et al., 2008). Protein NHERF1 se nám podařilo detekovat v jádře CML-T1 buněk rezistentních na 20μM imatinib. Dosud bylo známo, že pouze v případě buněčné linie představující model rakoviny prsu MDA-MB-435 (Cardone et al., 2007), buněčných liniích odvozených z kolorektálního karcinomu (Hayashi et al., 2010) a z hepatocelulárního karcinomu (Shibata et al., 2003) je protein NHERF1 exprimován i v jádře. Uvádí se, že protein NHERF1 funguje jako tumorsupresorový (Dai et al., 2004; Pan et al., 2006; Kreimann et al., 2007), ovšem v případě buněk rakoviny prsu je jeho zvýšená exprese spojována s invazivitou těchto buněk (Cardone et al., 2007). Toto kontroverzní pozorování by mohlo být do jisté míry vysvětleno tím, že funkce proteinu NHERF1 závisí na jeho lokalizaci a postranlačních modifikacích, asociaci s interakčními partnery a buněčné signalizaci (Lin et al., 2012). Do budoucna by bylo jistě zajímavé provést koimunoprecipitační experimenty a identifikovat vazebné partnery NHERF1 proteinu v imatinib rezistentních CML-T1

buňkách. Je možné, že by nám tyto experimenty objasnily funkci proteinu NHERF1 u rezistentních CML-T1 buněk. Protein NHERF1 má dvě PDZ domény a bylo zjištěno, že PDZ-1 doménou interaguje s tumor supresorovým proteinem PTEN (Takahashi et al., 2006) a PDZ-2 doménou interaguje s beta-kateninem (Kreimann et al., 2007) a Fzd receptory (Wheeler et al., 2011). V buňkách, ve kterých byl beta-katenin již stabilizován, podporuje NHERF1 beta-katenin/TCF zprostředkovanou transkripční aktivitu. Zvýšená exprese NHERF1 tak může kooperovat s beta-kateninem při rozvoji rakoviny jater (Shibata et al., 2003). V případě CML dochází ke stabilizaci beta-kateninu prostřednictvím fosforylace Bcr-Abl kinázou, která fosforyluje beta-katenin na Tyr86 a Tyr654. Beta-katenin je následně translokován do jádra a váže transkripční faktor TCF4 (Coluccia et al., 2007). Při nízkých buněčných denzitách bylo zjištěno, že protein NHERF1 je lokalizovaný v jádrech buněčných linií kolorektálních karcinomů. Takto aberantně lokalizovaný NHERF1 protein se podílí na stabilizaci komplexu beta-kateninu s TCF1 transkripčním faktorem, který váže pomocí PDZ-1 domény. Tento komplex posléze zprostředkovává transkripci onkogenů jako je např. c-Myc a cyklin D1 (Lin et al., 2012). Nelze vyloučit, že v případě rezistentních CML-T1 buněk, dochází k tvorbě komplexu NHERF1 proteinu s beta-kateninem a TCF1 transkripčním faktorem a ovlivnění transkripce genů.

Položili jsme si otázku, proč právě imatinib rezistentní CML-T1 buňky potřebují zvýšené množství NHERF1 proteinu a na základě dostupných informací z vědeckých publikací jsme navrhli tři možné způsoby fungování proteinu NHERF1 v rezistentních CML-T1 buňkách, které jsme následně testovali.

První testovanou možností byla vazba proteinu NHERF1 na Mrp2 transportér a regulace jeho exprese a funkce. U hepatocytů bylo zjištěno, že protein NHERF1 reguluje expresi a funkci Mrp2 transportéru a v případě NHERF1 deficientních buněk dochází ke snížení exprese Mrp2 proteinu (Li et al., 2010). Mrp2 patří do skupiny ABC transportérů, které se účastní transportu nejrůznějších molekul ven z buněk, např. protirakovinových léků (König et al., 1999). Představa, že v případě zvýšené exprese proteinu NHERF1 by mohlo u rezistentních CML-T1 buněk docházet k větší aktivitě transportéru Mrp2 a transportu imatinibu ven z buněk, se nám nepotvrdila. Protein Mrp2 jsme u buněk CML-T1 nedetekovali.

Druhou testovanou možností bylo ovlivnění aktivity Na^+/H^+ přenašeče (protein NHE-1) prostřednictvím jeho regulátoru - proteinu NHERF1 u rezistentních CML-T1 buněk. Bylo zjištěno, že leukemické buňky mají vyšší intracelulární pH než normální hematopoetické buňky. Je to dáno tím, že exprimují NHE-1 přenašeč, který je zodpovědný za regulaci intracelulárního pH. V případě inhibice NHE-1 přenašeče pomocí amiloridu dochází k jejich apoptóze (Rich et al., 2000). Současná inhibice NHE-1 přenašeče a NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) přenašeče selektivně zabíjí gliomové buňky, neboť u nich dochází ke zvýšení již tak vyšší intracelulární hladiny Ca^{2+} k cytotoxické úrovni (Harley et al., 2010). Rychle proliferující buňky, např. nádorové, preferují produkci ATP pomocí aerobní glykolýzy (tzv. Warburgův efekt) a dochází tak ke vzniku laktátu a okyselení cytosolu (Warburg, 1956). Metabolismus těchto buněk by pak k potlačení apoptózy vyžadoval nepřetržitou aktivitu NHE-1 přenašeče a aplikace NHE-1 inhibitorů by mohla indukovat jejich apoptózu (Rich et al., 2000). Jednou z možností funkce NHERF1 u rezistentních CML-T1 buněk by mohlo být ovlivnění aktivity NHE-1 přenašeče a dysregulace intracelulárního pH, resp. koncentrace Na^+ a nepřímo i Ca^{2+} iontů. Pokud by teoreticky docházelo ke zvýšení aktivity NHE-1 přes jeho regulační protein NHERF1 u rezistentních CML-T1 buněk, dalo by se hypoteticky předpokládat, že tyto buňky budou odolnější proti zvýšené koncentraci NHE-1 inhibitorů (amilorid, EIPA) a NCX inhibitorů (DCB). Provedli jsme sérii MTT testů a sledovali jsme životnost buněk ve vzrůstajících koncentracích amiloridu, EIPA i DCB. Výsledky těchto MTT testů ovšem neprokázaly specifické působení použitých inhibitorů na rezistentní CML-T1 buňky. Na senzitivní i rezistentní CML-T1 buňky měly tyto inhibitory shodný účinek při stejných koncentracích (IC_{50} amilorid $15\mu\text{M}$, IC_{50} EIPA $10\mu\text{M}$, IC_{50} DCB $7\mu\text{M}$).

Třetí testovanou možností bylo ovlivnění buněčné signalizace prostřednictvím proteinu NHERF1. Protein NHERF1 má dvě PDZ domény. Mnoho proteinů obsahujících PDZ domény se účastní buněčné signalizace, především Wnt signální dráhy (Subbaiah et al., 2011). Bylo zjištěno, že NHERF1 prostřednictvím své PDZ-2 domény přímo interaguje s některými Fzd receptory (Fzd2, Fzd4, Fzd7). Dochází tak k regulaci Wnt signalizace a udržení nízkých hladin aktivovaného beta-*katenuinu*, protože protein NHERF1 interferuje s vazbou proteinu Dvl na Fzd receptor. Ztráta NHERF1 proteinu posílila kanonickou Wnt

signalizaci u buněčných linií odvozených z buněk rakoviny prsu a u buněk prsní žlázy a došlo tak ke zvýšení hladiny aktivovaného beta-kateninu (Wheeler et al., 2011).

Nabídla se hypotéza, podle které by nadprodukce NHERF1 proteinu u rezistentních CML-T1 buněk mohla mít za následek dysregulaci v buněčné Wnt signalizaci oproti senzitivním CML-T1 buňkám. Vyšší hladina NHERF1 proteinu by mohla mít za následek nižší podíl aktivovaného beta-kateninu v rezistentních CML-T1 buňkách a imatinib rezistentní CML-T1 buňky by mohly preferovat některou z tzv. nekanonických Wnt signálních drah. Nízká hladina aktivovaného beta-kateninu či určitá část nekanonické Wnt signální dráhy by pak mohly posloužit k hledání potenciálních zásahových míst u rezistentních CML-T1 buněk. Aberantní Wnt signalizace hraje významnou roli při vzniku nejrůznějších rakovin včetně hematologických onemocnění (Ge and Wang, 2010). Bylo tedy navrženo, že Wnt signální dráha by mohla být potenciálním terapeutickým cílem (Anastas et al., 2013). V případě vzorku pacientů bylo zjištěno, že během progresu CML dochází ke změně exprese genů Wnt/beta-kateninové signální dráhy jako jsou např. FZD2 a LRP6 (Radich et al., 2006).

Zaměřili jsme se na roli NHERF1 proteinu ve Wnt signální dráze u imatinib rezistentních CML-T1 buněk. Sledovali jsme expresi proteinů účastnících se různých Wnt signálních drah u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk.

Nejprve jsme sledovali expresi celkového beta-kateninu v lyzátech, cytoplazmě a v jádře senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk. Zjistili jsme, že celkové množství beta-kateninu bylo vyšší v lyzátech senzitivních buněk. Toto pozorování by mohlo být dáno tím, že v buněčných lyzátech je přítomna i membránová frakce s adhezivními komplexy obsahujícími beta-katenin. Celkové množství beta-kateninu v cytoplazmě bylo vyšší u rezistentních buněk a naopak celkové množství beta-kateninu v jádrech bylo vyšší u senzitivních buněk. Následně jsme studovali expresi fosforylovaných forem beta-kateninu. Diferenciální fosforylace beta-kateninu ovlivňuje stabilitu tohoto proteinu. Beta-katenin fosforylovaný na Ser552 byl nalezen v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk, ovšem jeho exprese byla statisticky výrazně vyšší v jádrech rezistentních CML-T1 buněk. Beta-katenin fosforylovaný na Ser675 byl nalezen ve stejném množství v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Obě tyto fosforylované formy nebyly detekovány v cytoplazmě senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Toto pozorování je

v souladu s faktem, že takto fosforylované formy beta-kateninu jsou translokovány do jádra, kde se účastní aktivace transkripce (Taurin et al., 2006; Fang et al., 2007; He et al., 2007; Hino et al., 2005). Je tedy pravděpodobné, že se beta-katenin fosforylovaný na Ser552 a Ser675 účastní transkripce u senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk, ačkoliv jeho celkové množství je vyšší v jádrech senzitivních buněk. Naše výsledky nepotvrdily pozorování, že Wnt signalizace je oslabená expresí proteinu NHERF1, jak bylo ukázáno u buněčných linií odvozených z rakoviny prsu (Wheeler et al., 2011). Lze se domnívat, že tento jev by mohl být specifický pro danou buněčnou linii. Exprese koreceptoru kanonické Wnt signální dráhy LRP6 byla statisticky významně vyšší u senzitivních buněk, i jeho fosforylovaná forma byla nalezena ve větším množství u senzitivních buněk. Kanonická Wnt signální dráha by tedy mohla být aktivnější u senzitivních CML-T1 buněk. Dále jsme se zaměřili na expresi proteinů fungujících jako transkripční faktory (TCF/LEF) ve Wnt signální dráze. Nižší expresi transkripčního faktoru TCF1 jsme zaznamenali v jádrech senzitivních buněk oproti buňkám rezistentním. Naopak transkripční faktor LEF1 byl více exprimován v jádrech senzitivních buněk ve srovnání s jádry CML-T1 rezistentních buněk. Stanovení exprese transkripčních faktorů TCF1 a LEF1 by bylo vhodné ještě zopakovat, abychom získali reprezentativní data. Mezi transkripční cíle Wnt signální dráhy patří např. proteiny c-Myc a cyklin D1 (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999). Bylo zjištěno, že exprese proteinu c-Myc je v imatinib rezistentních K-562 buňkách vyšší než v senzitivních K-562 buňkách (Liu et al., 2012). Naše výsledky toto pozorování nepotvrzují. Exprese c-Myc proteinu je u senzitivních CML-T1 buněk vyšší než u CML-T1 rezistentních buněk. Je možné, že tento rozdíl v expresi c-Myc proteinu je dán odlišnostmi mezi studovanými buněčnými liniemi a že exprese jednotlivých proteinů se mezi jednotlivými buněčnými liniemi liší. Nelze také vyloučit, že protein c-Myc je u senzitivních i rezistentních linií regulován jinou signální dráhou než kanonickou Wnt signální dráhou jako např. Wnt/Ca²⁺ signální dráhou (Koenig et al., 2010). Pokud by byl protein c-Myc u senzitivních CML-T1 buněk regulován Wnt/Ca²⁺ signální dráhou, odpovídal by tomu nálezný transkripční faktor NFAT působícího v této dráze pouze u senzitivních CML-T1 buněk. Exprese cyklinu D1 a tyrosin kinázy Met se mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami nelišila. Toto pozorování by mohlo být v souladu se zjištěním, že oba tyto proteiny jsou transkripčními cíli kanonické Wnt

signální dráhy (Tetsu and McCormick, 1999; Shtutman et al., 1999; Boon et al., 2002), která je na základě detekce transkripčně aktivních forem beta-keninu pravděpodobně aktivní u senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Nemůžeme ovšem vyloučit i vliv jiných signálních drah na expresi těchto proteinů. Připravujeme také array na zapnuté geny Wnt signální dráhy pomocí RT-PCR z cDNA senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk (86 genů včetně vnitřních standardů, TaqMan® Array Human WNT Pathway, Life Sciences)

Na základě sledování exprese výše zmíněných proteinů, zvláště detekce beta-keninu pSer552 a pSer675 v jádrech, jsme se domnívali, že kanonická Wnt signální dráha je aktivní u senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Předpokládali jsme, že v případě inhibice cílového produktu genu regulovaného kanonickou Wnt signální dráhou bude docházet k nespecifickému působení inhibitoru na CML-T1 buňky. Pro potvrzení naší představy jsme inhibovali COX-2, jejíž exprese je regulována prostřednictvím kanonické Wnt signální dráhy (Araki et al., 2003). Pomocí MTT testu jsme sledovali životnost buněk po inhibici COX-2 a dle našeho předpokladu docházelo k nespecifickému působení inhibitoru cyklooxygenázy 2 indomethacinu na buňky.

Zaměřili jsme se tedy na studium proteinů fungujících v kanonické a nekanonické Wnt signální dráze, mezi které patří proteiny Dvl2 a Dvl3. Exprese proteinu Dvl2 je nepatrně vyšší v cytoplazmě senzitivních CML-T1 buněk. Naproti tomu protein Dvl3 jsme detekovali pouze v lyzátech z rezistentních buněk. Bylo prokázáno, že C konec proteinu Dvl3 je důležitý pro aktivaci nekanonické Wnt signální dráhy Wnt5a ligandem (Ma et al., 2010).

Na základě detekce NHERF1 proteinu a proteinu Dvl3 u rezistentních CML-T1 buněk jsme předpokládali, že rezistentní CML-T1 buňky by mohly ve větší míře exprimovat transkripční faktory fungující v nekanonické Wnt signální dráze např. transkripční faktor NFAT fungující ve Wnt/Ca²⁺ signální dráze. Sledovali jsme expresi transkripčního faktoru NFAT1 v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách. Oproti našemu předpokladu jsme transkripční faktor NFAT1 detekovali v cytoplazmě a jádrech senzitivních CML-T1 buněk, u rezistentních buněk byl NFAT přítomen v jádře jen ve velmi malém množství. Domníváme se proto, že senzitivní CML-T1 buňky mají v jádře proteiny a transkripční faktory účastníci se kanonické i nekanonické Wnt signalizace.

Rezistentní CML-T1 buňky nemají aktivní Wnt/Ca²⁺ signalizační dráhu, ačkoliv jsme u nich detekovali protein Dvl3. Ke studiu proteinů Wnt/Ca²⁺ signální dráhy nás přimělo i pozorování, že mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami jsme pomocí dvourozměrné elektroforézy detekovali diferenciallyně exprimované Ca²⁺ senzitivní proteiny. U rezistentních CML-T1 buněk byla zvýšená exprese proteinů kalretikulín a „tropomyosin alpha-4 chain“ a snížená exprese „synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog“ oproti senzitivním CML-T1 buňkám. Je možné, že protein Dvl3 v případě rezistentních CML-T1 buněk aktivuje jinou Wnt signální dráhu. Bylo zjištěno, že protein Dvl3 je obligátní pro aktivaci p38 MAPK stimulovanou Wnt3a ligandem (Bikkavilli et al., 2008b) a že zvýšená exprese proteinu Dvl3 podporuje TCF/LEF senzitivní/dependentní transkripční aktivitu i v nepřítomnosti Wnt3a ligandu (Lee et al., 2008). Naopak aktivace p38 MAPK jako odpověď na Wnt5a ligand je nezávislá na Dvl proteinech (Dvl1, Dvl2, Dvl3), jak bylo potvrzeno experimenty s siRNA a Dvl inhibitorem (Ma and Wang, 2007). Navíc jaderně lokalizovaný protein Dvl3 a c-Jun vytvářejí komplex s beta-kateninem a TCF4, který je lokalizovaný na promotorech genů ovlivňovaných kanonickou Wnt signalizací a reguluje jejich transkripci (Gan et al., 2008). Nelze tedy vyloučit, že by protein Dvl3 mohl ovlivňovat transkripci i u imatinib rezistentních CML-T1 buněk. Z tohoto důvodu bylo by ovšem vhodné zjistit, zda se nachází i v jádrech rezistentních CML-T1 buněk. Nedávno bylo také zjištěno, že některé Wnt proteiny v závislosti na své koncentraci aktivují buď kanonickou Wnt signální dráhu anebo nekanonickou Wnt signální dráhu (Kestler and Kühl, 2011).

Zkusili jsme zjistit, zda by neaktivní Wnt/Ca²⁺ signální dráha u rezistentních CML-T1 buněk mohla být vhodným místem s terapeutickým potenciálem. U pankreatických rakovinných buněk bylo zjištěno, že Wnt-5a-NFAT1 signální dráha má za následek lékovou rezistenci (Griesmann et al., 2013). Cílená inhibice defosforylace-aktivace transkripčního faktoru NFAT1 by tak mohla zabíjet rezistentní CML-T1 buňky. Inhibovali jsme fosfatázu kalcineurin pomocí vzrůstajících koncentrací cyklosporinu A v médiu a sledovali jsme, zda dojde k selektivnímu účinku na rezistentní CML-T1 buňky. Defosforylace NFAT pomocí fosfatázy kalcineurinu umožní jeho translokaci do jádra a transkripci cílových genů např. pro cytokiny (Hogan et al., 2003). Inhibice této části Wnt/Ca²⁺ signalizační dráhy by mohla narušit metabolismus

rezistentních CML-T1 buněk narozdíl od senzitivních CML-T1 buněk. V dřívější práci z naší laboratoře byla na TRAIL rezistentních buňkách otestována hypotéza inhibice proteinu esenciálního pro buněčný metabolismus (v tomto případě adenosindeamináza), který byl v TRAIL rezistentních buňkách exprimován v malém množství. Inhibice tohoto proteinu vedla k selektivní eliminaci TRAIL rezistentních buněk (Petrák et al., 2009). Rozhodli jsme se proto inhibovat defosforylaci transkripčního faktoru NFAT1, který jsme v jádrech rezistentních CML-T1 buněk detekovali ve velmi malém množství. Nedávno bylo zjištěno, že Wnt/Ca²⁺ signalizační dráha se podílí na přežívání CML buněk navzdory inhibici Bcr-Abl imatinibem, protože zvyšuje NFAT dependentní produkci cytokinů a dochází tak ke vzniku kompenzačních signálů zajišťujících přežívání v přítomnosti imatinibu (Gregory et al., 2010). Inhibice fosfatázy kalcineurinu pomocí cyklosporinu A zvýšila senzitivitu Bcr-Abl⁺ leukemických buněk k imatinibu (Gregory et al., 2010). Naše výsledky jsou obdobné, navíc se nám podařilo ukázat selektivní působení cyklosporinu A vůči rezistentním CML-T1 buňkám. Pomocí MTT testů jsme prokázali, že inhibice defosforylace transkripčního faktoru NFAT1 pomocí inhibitoru fosfatázy kalcineurinu cyklosporinu A vedla k selektivní eliminaci rezistentních CML-T1 buněk (5μM koncentrace). Kromě cyklosporinu A jsme zkoušeli i další inhibitor kalcineurinu FK-506, který měl stejný selektivní účinek na rezistentní CML-T1 buňky při koncentraci 100nM. Toto pozorování naznačuje, že tento efekt byl zprostředkován kalcineurinem a ne prostřednictvím potenciálních vedlejších účinků působení cyklosporinu A.

Přestože se nám podařilo selektivně eliminovat rezistentní CML-T1 buňky, chtěli jsme zjistit, zda se mezi senzitivními a rezistentními CML-T1 buňkami liší exprese proteinů účastnících se Wnt/PCP signální dráhy a zároveň MAP-kinázové dráhy. Zaměřili jsme se nejdříve na expresi kináz SEK1/MKK4 a SAPK/JNK. Tyto kinázy jsme detekovali v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Rozhodli jsme se tedy detekovat transkripční faktory c-Jun a ATF-2, které jsou fosforylované např. pomocí kinázy SAPK/JNK (Hibi et al., 1993; Gupta et al., 1995). Transkripční faktor c-Jun jsme našli v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk narozdíl od transkripčního faktoru ATF-2, který jsme detekovali pouze v jádrech senzitivních buněk. Je pravděpodobné, že transkripční faktor ATF-2 je v senzitivních CML-T1 buňkách regulován prostřednictvím jiné kinázy než u rezistentních CML-T1 buněk. Nelze vyloučit, že kináza fosforylující

transkripční faktor ATF-2 na Thr71 u rezistentních CML-T1 buněk chybí nebo tento transkripční faktor na Thr71 nefosforyluje. Je známo, že transkripční faktor ATF-2 je regulován fosforylací pomocí několika kináz, např. ERK a p38 a JNK, které fosforylují transkripční faktor ATF-2 na příslušných aminokyselinových zbytcích (Gupta et al., 1995; Ouwens et al., 2002). Do budoucna kromě jiného plánujeme pomocí multiplexní technologie zjistit, zda je v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách odlišně exprimována p38 MAP-kináza, protože patří mezi hlavní stresové kinázy a fosforyluje oba transkripční faktory - ATF-2 a NFAT (Ouwens et al., 2002; Gómez del Arco et al., 2000). Případná exprese p38 MAP-kinázy u senzitivních CML-T1 buněk by nám mohla pomoci vysvětlit diferenciální expresi transkripčního faktoru ATF-2 v jádře. Navíc bylo zjištěno, že protein RuvB-like 2 svou vazbou na ATF-2 oslabuje jeho transkripční aktivitu (Cho et al., 2001). Je tedy možné, že v rezistentních CML-T1 buňkách existuje nějaké propojení mezi zvýšenou expresí RuvB-like 2 a transkripčním faktorem ATF-2. Bylo by zajímavé vyzkoušet naši hypotézu o inhibici proteinu, který je esenciální pro buněčný metabolismus a exprimovaný ve velmi malém množství, i v tomto případě.

10. Perspektivy

1. Měření intracelulárního pH, případně i koncentraci Ca^{2+} iontů v senzitivních a rezistentních CML-T1 buňkách. Za tímto účelem již byl objednan buněčný permeabilní indikátor cytosolického pH, měření bude prováděno na fluorimetru pomocí fluorescenční sondy 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester (BCECF). Obdobně lze pomocí fluorescenční sondy stanovit i koncentraci Ca^{2+} iontů v cytoplazmách buněk (sonda se středně silnou afinitou, např. Fluo-5F (Life Sciences)).
2. Imunofluorescenční mikroskopie: buněčná lokalizace proteinů NHERF1, beta-katenin a Dishevelled 3 bez použití inhibitorů u senzitivních a rezistentních buněk. Porovnání za použití inhibitorů Wnt/beta-kateninové signální dráhy (např. AV-65) nebo za podmínek gene silencing NHERF1 proteinu (NHERF1 siRNA, objednáno u Cell Signaling Technologies).
3. Wnt array na aktivní geny Wnt signální dráhy pomocí RT-PCR z cDNA senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk (96 genů včetně vnitřních standardů, TaqMan® Array Human WNT Pathway, objednáno u Life Sciences)
4. Multiplexní kvantitativní imunoanalýza vybraných exprimovaných proteinů na přístroji BioPlex (Bio-Rad) v naší laboratoři. Jedná se o kvantitativní stanovení duetu celkového proteinu versus jeho fosforylované formy: AKT (Ser473), ATF-2 (Thr71), Bcr-Abl (Tyr245), c-Jun (Ser63), CREB (Ser133), ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187), GSK-3 α (Ser21/Ser9), GSK-3 β (Ser21/Ser9), JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (objednáno u Bio-Rad)
5. Koimunoprecipitace NHERF1 proteinu a následně identifikace interakčních partnerů (např. beta-katenin, transkripční faktor TCF, receptor Frizzled) pomocí Western blotu či přímo pomocí MS-MALDI.

11. Závěr

Cílem této práce bylo nejprve vytvořit rezistentní linie buněk CML-T1, u linie rezistentní na 20 μ M imatinib identifikovat diferenciálně exprimované proteiny a navrhnout potenciální zásahové místo s terapeutickým významem. Následně pomocí vhodných inhibitorů tuto buněčnou slabinu využít pro cílenou eliminaci rezistentních CML-T1 buněk.

Z diferenciálně exprimovaných proteinů u imatinib rezistentních CML-T1 buněk jsme vybrali protein NHERF1 jako marker rezistence.

Nepodařilo se nám prokázat ovlivnění Mrp2 transportéru prostřednictvím NHERF1 proteinu, neboť transportér Mrp2 jsme u buněk CML-T1 nedetekovali. Ani provedené MTT testy s inhibitory přenašečů Na^+/H^+ , který je regulován NHERF1 proteinem, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, neprokázaly selektivní účinek na rezistentní CML-T1 buňky. Studovali jsme možné ovlivnění Wnt/beta-kateninové dráhy prostřednictvím proteinu NHERF1. Zjistili jsme, že aktivní beta-katenin účastníci se aktivace transkripce se nachází v jádrech senzitivních i rezistentních CML-T1 buněk. Exprese celkového beta-kateninu byla vyšší v cytoplasmě u rezistentních buněk, ale beta-kateninu označeného k degradaci proteazomem bylo více v cytoplasmě u senzitivních buněk. Protein LRP6 a jeho fosforylovaná forma byly nalezeny ve větším množství u senzitivních buněk, stejně tak transkripční faktor LEF a protein c-Myc. Naopak transkripční faktor TCF1 byl exprimován ve větším množství u rezistentních buněk. Exprese cyklinu D1 a kinázy Met byla u senzitivních a rezistentních CML-T1 buněk stejná. Exprese proteinu Dvl2 byla mezi oběma buněčnými liniemi přibližně stejná, zatímco exprese proteinu Dvl3 byla výrazně vyšší u rezistentních CML-T1 buněk. Transkripční faktor Wnt/ Ca^{2+} signalizační dráhy NFAT jsme našli v cytoplasmě a jádrech senzitivních CML-T1 buněk, u rezistentních buněk byla jeho exprese podstatně nižší. Rozhodli jsme se využít tohoto pozorování a prezentovat tuto část metabolismu jako buněčnou slabinu, „Achillovu patu“ rezistentních buněk, kterou lze atakovat *in vitro* vhodným inhibitorem. Jako zásahové místo v tomto procesu byla stanovena fosfatáza kalcineurin, která defosforyluje a aktivuje NFAT, čímž umožňuje jeho translokaci do jádra buňky. Pomocí inhibitorů cyklosporinu A a FK-506 jsme tento buněčný proces narušili a dosáhli tak inhibičního účinku, který vedl k selektivní eliminaci rezistentních buněk. Koncentrace vedoucí k úhynu rezistentních buněk jsme stanovili na 5 μ M cyklosporin A a 100nM FK-506.

11. Seznam literatury

- ABERLE, H.; BAUER, A.; STAPPERT, J.; KISPERT, A.; KEMLER, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal*. 1997, vol.16, no.13, s.3797-3804.
- ALBAJAR, M.; GÓMEZ-CASARES, M.T.; LLORCA, J.; MAULEON, I.; VAQUÉ, J.P.; ACOSTA, J.C.; BERMÚDEZ, A.; DONATO, N.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. MYC in chronic myeloid leukemia: induction of aberrant DNA synthesis and association with poor response to imatinib. *Molecular Cancer Research*. 2011, vol.9, no.5, s.564-576.
- AMIT, S.; HATZUBAI, A.; BIRMAN, Y.; ANDERSEN, J.S.; BEN-SHUSHAN, E.; MANN, M.; BEN-NERIAH, Y.; ALKALAY, I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development*. 2002, vol.16, no.9, s.1066-1076.
- AN, X.; TIWARI, A.K.; SUN, Y.; DING, P.R.; ASHBY, C.R. JR.; CHEN, Z.S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leukemia Research*. 2010, vol.34, no.10, s.1255-1268.
- ANASTAS, J.N.; MOON, R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2013, vol.13, no.1, s.11-26.
- ANDREU, E.J.; LLEDO, E.; POCH, E.; IVORRA, C.; ALBERO, M.P.; MARTINEZ-CLIMENT, J.A.; MONTIEL-DUARTE, C.; RIFON, J.; PEREZ-CALVO, J.; ARBONA, C.; PRÓSPER, F.; PÉREZ-ROGER, I. BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27 (Kip1) degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Research*. 2005, vol.65, no.8, s. 3264-3272.
- ARAKI, Y.; OKAMURA, S.; HUSSAIN, S.P.; NAGASHIMA, M.; HE, P.; SHISEKI, M.; MIURA, K.; HARRIS, C.C. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Research*. 2003, vol.63, no.3, s.728-734.
- ASSEF, Y.; RUBIO, F.; COLÓ, G.; DEL MÓNACO, S.; COSTAS, M.A.; KOTSIAS, B.A. Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leukemia Research*. 2009, vol.33, no.5, s.710-716.
- BARNES, D.J.; PALAIOLOGOU, D.; PANOUSOPOULOU, E.; SCHULTHEIS, B.; YONG, A.S.; WONG, A.; PATTACINI, L.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Research*. 2005, vol.65, no.19, s.8912-8919.
- BARTRAM, C.R.; DE KLEIN, A.; HAGEMEIJER, A.; VAN AGTHOVEN, T.; GEURTS VAN KESSEL, A.; BOOTSMA, D.; GROSVELD, G.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DAVIES, T.; STONE, M.; ET AL. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983, vol.306, no.5940, s.277-280.
- BATLLE, E.; HENDERSON, J.T.; BEGHTEL, H.; VAN DEN BORN M.M.; SANCHO, E.; HULS, G.; MEELDIJK, J.; ROBERTSON, J.; VAN DE WETERING, M.; PAWSON, T.; CLEVERS, H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*. 2002, vol.111, no.2, s.251-63.

- BEDI, A.; ZEHNBAUER, B.A.; BARBER, J.P.; SHARKIS, S.J.; JONES, R.J. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994, vol.83, no.8, s.2038-2044.
- BEHRENS, J.; VON KRIES, J.P.; KÜHL, M.; BRUHN, L.; WEDLICH, D.; GROSSCHEDL, R.; BIRCHMEIER, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996, vol.382, no.6592, s.638-642.
- BIKKAVILLI, R.K.; FEIGIN, M.E.; MALBON, C.C. $G\alpha_o$ mediates WNT-JNK signaling through dishevelled 1 and 3, RhoA family members, and MEKK 1 and 4 in mammalian cells. *Journal of Cell Science*. 2008a, vol.121, no.2, s.234-245.
- BIKKAVILLI, R.K.; FEIGIN, M.E.; MALBON, C.C. p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta. *Journal of Cell Science*. 2008b, vol.121, no.21, s.3598-3607.
- BIXBY, D.; TALPAZ, M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009, s.461-476.
- BOON, E.M.; VAN DER NEUT, R.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H.; PALS, S.T. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Research*. 2002, vol.62, no.18, s.5126-5128.
- BRABLETZ, T.; JUNG, A.; DAG, S.; HLUBEK, F.; KIRCHNER, T. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *American Journal of Pathology*. 1999, vol.155, no.4, s.1033-1038.
- BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; GRIGG, A.; ARTHUR, C.; TAYLOR, K.; HERRMANN, R.; LYNCH, K.P.; HUGHES, T.P. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002, vol.99, no.9, s.3472-3475.
- BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; PARKINSON, I.; GRIGG, A.; SZER, J.; TAYLOR, K.; HERRMANN, R.; SEYMOUR, J.F.; ARTHUR, C.; JOSKE, D.; LYNCH, K.; HUGHES, T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003, vol.102, no.1, s.276-283.
- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M.J.; LIN, M.Z.; JUO, P.; HU, L.S.; ANDERSON, M.J.; ARDEN, K.C.; BLENIS, J.; GREENBERG, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999, vol.96, no.6, s.857-868.
- BURCHERT, A.; WANG, Y.; CAI, D.; VON BUBNOFF, N.; PASCHKA, P.; MÜLLER-BRÜSELBACH, S.; OTTMANN, O.G.; DUYSER, J.; HOCHHAUS, A.; NEUBAUER, A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*. 2005, vol.19, no.10, s.1774-1782.
- BURGER, H.; VAN TOL, H.; BOERSMA, A.W.; BROK, M.; WIEMER, E.A.; STOTER, G.; NOOTER, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*. 2004, vol.104, no.9, s.2940-2942.

- CARAYOL, N.; VAKANA, E.; SASSANO, A.; KAUR, S.; GOUSSETIS, D.J. ; GLASER, H.; DRUKER, B.J.; DONATO, N.J.; ALTMAN, J.K.; BARR, S.; PLATANIAS, L.C. Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, vol.107, no.28, s.12469-12474.
- CARDONE, R.A.; BELLIZZI, A.; BUSCO, G.; WEINMAN, E.J.; DELL'AQUILA, M.E.; CASAVOLA, V.; AZZARITI, A.; MANGIA, A.; PARADISO, A.; RESHKIN, S.J. The NHERF1 PDZ2 domain regulates PKA-RhoA-p38-mediated NHE1 activation and invasion in breast tumor cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2007, vol.18, no.5, s.1768-1780.
- CARLESSO, N.; FRANK, D.A.; GRIFFIN, J.D. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *Journal of Experimental Medicine*. 1996, vol.183, no.3, s.811-820.
- CARTER, B.Z.; MAK, D.H.; CORTES, J.; ANDREEFF, M. The elusive chronic myeloid leukemia stem cell: does it matter and how do we eliminate it? *Seminars in Hematology*. 2010, vol.47, no.4, s.362-370.
- CHO, S.G.; BHOUMIK, A.; BRODAY, L.; IVANOV, V.; ROSENSTEIN, B.; RONAI, Z. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, vol.21, no.24, s.8398-8413.
- CHU, S.; LI, L.; SINGH, H.; BHATIA, R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research*. 2007, vol.67, no.14, s.7045-7053.
- CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research*. 2012, vol.18, no.4, s.930-937.
- COLUCCIA, A.M.; VACCA, A.; DUÑACH, M.; MOLOGNI, L.; REDAELLI, S.; BUSTOS, V.H.; BENATI, D.; PINNA, L.A.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO Journal*. 2007, vol.26, no.5, s.1456-1466.
- CORBIN, A.S.; AGARWAL, A.; LORIAUX, M.; CORTES, J. ; DEININGER, M.W.; DRUKER, B.J. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011, vol.121, no.1, s.396-409.
- CORRÊA, S.; BINATO, R.; DU ROCHER, B.; CASTELO-BRANCO, M.T.; PIZZATTI, L.; ABDELHAY, E. Wnt/ β -catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer*. 2012, vol.12:303. doi: 10.1186/1471-2407-12-303.
- COULTHARD, L.R.; WHITE, D.E.; JONES, D.L.; MCDERMOTT, M.F.; BURCHILL, S.A. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*. 2009, vol.15, no.8, s.369-379.
- DAI, J.L.; WANG, L.; SAHIN, A.A.; BROEMELING, L.D.; SCHUTTE, M.; PAN, Y. NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor) gene mutations in human breast cancer. *Oncogene*. 2004, vol.23, no.53, s.8681-8687.

- DAVIDSON, G.; WU, W.; SHEN, J.; BILIC, J.; FENGER, U.; STANNEK, P.; GLINKA, A.; NIEHRS, C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*. 2005, vol.438, no.7069, s.867-872.
- DE GROOT, R.P.; RAAIJMAKERS, J.A.; LAMMERS, J.W.; JOVE, R.; KOENDERMAN, L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood*. 1999, vol.94, no.3, s.1108-1112.
- DEININGER, M.W.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000, vol.96, no.10, s.3343-3356.
- DONATO, N.J.; WU, J.Y.; STAPLEY, J.; GALLICK, G.; LIN, H.; ARLINGHAUS, R.; TALPAZ, M. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003, vol.101, no.2, s.690-698.
- DRUKER B. J.; LYDON N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. 2000, vol.105, no.1, s.3-7.
- DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J.M.; LYDON, N.B.; KANTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C.L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England of Journal Medicine*. 2001, vol.344, no.14, s.1031-1037.
- DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G.M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*. 1996, vol.2, no.5, s.561-566.
- DUMKA, D.; PURI, P.; CARAYOL, N.; LUMBY, C.; BALACHANDRAN, H.; SCHUSTER, K.; VERMA, A.K.; TERADA, L.S.; PLATANIAS, L.C.; PARMAR, S. Activation of the p38 Map kinase pathway is essential for the antileukemic effects of dasatinib. *Leukemia & Lymphoma*. 2009, vol.50, no.12, s.2017-2029.
- FANG, D.; HAWKE, D.; ZHENG, Y.; XIA, Y.; MEISENHOLDER, J.; NIKA, H.; MILLS, G.B.; KOBAYASHI, R.; HUNTER, T.; LU, Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, vol.282, no.15, s.11221-11229.
- FERRAO, P.T.; FROST, M.J.; SIAH, S.P.; ASHMAN, L.K. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood*. 2003, vol.102, no.13, s.4499-4503.
- GALIMBERTI, S.; CERVETTI, G.; GUERRINI, F.; TESTI, R.; PACINI, S.; FAZZI, R.; SIMI, P.; PETRINI, M. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005, vol.162, no.1, s.57-62.
- GAMBACORTI-PASSERINI, C.; BARNI, R.; LE COUTRE, P.; ZUCCHETTI, M.; CABRITA, G.; CLERIS, L.; ROSSI, F.; GIANAZZA, E.; BRUEGGEN, J.; COZENS, R.; PIOLTELLI, P.; POGLIANI, E.; CORNEO, G.; FORMELLI, F.; D'INCALCI, M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human

- BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000, vol.92, no.20, s.1641-1650.
- GAMBACORTI-PASSERINI, C.; ZUCCHETTI, M.; RUSSO, D.; FRAPOLLI, R.; VERGA, M.; BUNGARO, S.; TORNAGHI, L.; ROSSI, F.; PIOLTELLI, P.; POGLIANI, E.; ALBERTI, D.; CORNEO, G.; D'INCALCI, M. Alpha 1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clinical Cancer Research*. 2003, vol.9, no.2, s.625-632.
- GAN, X.Q.; WANG, J.Y.; XI, Y.; WU, Z.L.; LI, Y.P.; LI, L. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *Journal of Cell Biology*. 2008, vol.180, no.6, s.1087-1100.
- GAO, C.; CHEN, Y.G. Dishevelled: The hub of wnt signaling. *Cellular signalling*. 2010, vol.22, no.5, s.717-727.
- GE, X.; WANG, X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*. 2010, vol.3, no.33. doi: 10.1186/1756-8722-3-33.
- GEORGESCU, M.M.; MORALES, F.C.; MOLINA, J.R.; HAYASHI, Y. Roles of NHERF1/EBP50 in cancer. *Current Molecular Medicine*. 2008, vol.8, no.6, s.459-468.
- GOLAS, J.M.; ARNDT, K.; ETIENNE, C.; LUCAS, J.; NARDIN, D.; GIBBONS, J.; FROST, P.; YE, F.; BOSCHELLI, D.H.; BOSCHELLI, F. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Research*. 2003, vol.63, no.2, s.375-381.
- GÓMEZ DEL ARCO, P.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; MALDONADO, J.L.; ORTEGA-PÉREZ, I.; REDONDO, J.M. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol.275, no.18, s.13872-13878.
- GORDON, M.Y.; DOWDING, C.R.; RILEY, G.P.; GOLDMAN, J.M.; GREAVES, M.F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987, vol.328, no.6128, s.342-344.
- GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N.; SAWYERS, C.L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001, vol.293, no.5531, s.876-80.
- GOTTESMAN, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*. 2002, vol.53, s.615-27.
- GRAHAM, S.M.; JØRGENSEN, H.G.; ALLAN, E.; PEARSON, C.; ALCORN, M.J.; RICHMOND, L.; HOLYOAKE, T.L. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002, vol.99, no.1, s.319-325.
- GREGORY, M.A.; PHANG, T.L.; NEVIANI, P.; ALVAREZ-CALDERON, F.; EIDE, C.A.; O'HARE, T.; ZABEREZHNYI, V.; WILLIAMS, R.T.; DRUKER, B.J.; PERROTTI, D.; DEGREGORI, J. Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2010, vol.18, no.1, s.74-87.

- GRIESMANN, H.; RIPKA, S.; PRALLE, M.; ELLENRIEDER, V.; BAUMGART, S.; BUCHHOLZ, M.; PILARSKY, C.; AUST, D.; GRESS, T.M.; MICHL, P. WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Neoplasia*. 2013, vol.15, no.1, s.11-22.
- GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R.; HEISTERKAMP, N.; DE KLEIN, A.; BARTRAM, C.R.; GROSVELD, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984, vol.36, no.1, s.93-99.
- GUMIREDDY, K.; BAKER, S.J.; COSENZA, S.C.; JOHN, P.; KANG, A.D.; ROBELL, K.A.; REDDY, M.V.; REDDY, E.P. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, vol.102, no.6, s.1992-1997.
- GUPTA, S.; CAMPBELL, D.; DÉRIJARD, B.; DAVIS, R.J. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1995, vol.267, no.5196, s.389-393.
- HABAS, R.; DAWID, I.B.; HE, X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development*. 2003, vol.17, no.2, s.295-309.
- HABAS, R.; KATO, Y.; HE, X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*. 2001, vol.107, no.7, s.843-854.
- HAMADA, A.; MIYANO, H.; WATANABE, H.; SAITO, H. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003, vol.307, no.2, s.824-828.
- HARLEY, W.; FLOYD, C.; DUNN, T.; ZHANG, X.D.; CHEN, T.Y.; HEGDE, M.; PALANDOKEN, H.; NANTZ, M.H.; LEON, L.; CARRAWAY, K.L. 3RD.; LYETH, B.; GORIN, F.A. Dual inhibition of sodium-mediated proton and calcium efflux triggers non-apoptotic cell death in malignant gliomas. *Brain Research*. 2010, vol.1363, s.159-169.
- HART, M.J.; DE LOS SANTOS, R.; ALBERT, I.N.; RUBINFELD, B.; POLAKIS, P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Current Biology*. 1998, vol.8, no.10, s.573-581.
- HAYASHI, Y.; MOLINA, J.R.; HAMILTON, S.R.; GEORGESCU, M.M. NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2010, vol.12, no.12, s.1013-1022.
- HAWORTH, R.A.; GOKNUR, A.B.; BERKOFF, H.A. Inhibition of Na-Ca exchange by general anesthetics. *Circulation Research*. 1989, vol.65, no.4, s.1021-1028.
- HE, T.C.; SPARKS, A.B.; RAGO, C.; HERMEKING, H.; ZAWEL, L.; DA COSTA, L.T.; MORIN, P.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998, vol.281, no.5382, s.1509-1512.
- HE, X.C.; YIN, T.; GRINDLEY, J.C.; TIAN, Q.; SATO, T.; TAO, W.A.; DIRISINA, R.; PORTER-WESTPFAHL, K.S.; HEMBREE, M.; JOHNSON, T.; WIEDEMANN, L.M.; BARRETT, T.A.; HOOD, L.; WU, H.; LI, L. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature Genetics*. 2007, vol.39, no.2, s.189-198.

- HEIDEL, F.H.; BULLINGER, L.; FENG, Z.; WANG, Z.; NEFF, T.A.; STEIN, L.; KALAITZIDIS, D.; LANE, S.W.; ARMSTRONG, S.A. Genetic and pharmacologic inhibition of β -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell Stem Cell*. 2012, vol.10, no.4, s.412-424.
- HIBI, M.; LIN, A.; SMEAL, T.; MINDEN, A.; KARIN, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development*. 1993, vol.7, no.11, s.2135-2148.
- HIKASA, H.; SHIBATA, M.; HIRATANI, I.; TAIRA, M. The Xenopus receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development*. 2002, vol.129, no.22, s.5227-5239.
- HINO, S.; TANJI, C.; NAKAYAMA, K.I.; KIKUCHI, A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, vol.25, no.20, s.9063-9072.
- HOCHHAUS, A.; KREIL, S.; CORBIN, A.S.; LA ROSÉE, P.; MÜLLER, M.C.; LAHAYE, T.; HANFSTEIN, B.; SCHOCH, C.; CROSS, N.C.; BERGER, U.; GSCHAIDMEIER, H.; DRUKER, B.J.; HEHLMANN, R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002, vol.16, no.11, s.2190-2196.
- HOGAN, P.G.; CHEN, L.; NARDONE, J.; RAO, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*. 2003, vol.17, no.18, s.2205-2232.
- HOLTZ, M.S.; FORMAN, S.J.; BHATIA, R. Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia*. 2005, vol.19, no.6, s.1034-1041.
- HORITA, M.; ANDREU, E.J.; BENITO, A.; ARBONA, C.; SANZ, C.; BENET, I.; PROSPER, F.; FERNANDEZ-LUNA, J.L. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *Journal of Experimental Medicine*. 2000, vol.191, no.6, s.977-984.
- HOUGHTON, P.J.; GERMAIN, G.S.; HARWOOD, F.C.; SCHUETZ, J.D.; STEWART, C.F.; BUCHDUNGER, E.; TRAXLER, P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Research*. 2004, vol.64, no.7, s.2333-2337.
- HU, Y.; CHEN, Y.; DOUGLAS, L.; LI, S. beta-Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009, vol.23, no.1, s.109-116.
- HUI, L.; BAKIRI, L.; MAIRHORFER, A.; SCHWEIFER, N.; HASLINGER, C.; KENNER, L.; KOMNENOVIC, V.; SCHEUCH, H.; BEUG, H.; WAGNER, E.F. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature Genetics*. 2007, vol.39, no.6, s.741-749.
- IKEDA, S.; KISHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; MURAI, H.; KOYAMA, S.; KIKUCHI, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and

- promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO Journal*. 1998, vol.17, no.5, s.1371-1384.
- ILARIA, R.L. JR.; VAN ETEN, R.A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, vol.271, no.49, s.31704-31710.
- ISHITANI, T.; KISHIDA, S.; HYODO-MIURA, J.; UENO, N.; YASUDA, J.; WATERMAN, M.; SHIBUYA, H.; MOON, R.T.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MATSUMOTO, K. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, vol.23, no.1, s.131-139.
- JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; JONES, D.; TALPAZ, M.; BEKELE, N.; O'BRIEN, S.; ZHOU, X.; LUTHRA, R.; GARCIA-MANERO, G.; GILES, F.; RIOS, M.B.; VERSTOVSEK, S.; CORTES, J. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006, vol.20, no.10, s.1767-1773.
- JAMIESON, C.H.; AILLES, L.E.; DYLLA, S.J.; MUIJTJENS, M.; JONES, C.; ZEHNDER, J.L.; GOTLIB, J.; LI, K.; MANZ, M.G.; KEATING, A.; SAWYERS, C.L.; WEISSMAN, I.L. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *New England Journal of Medicine*. 2004, vol.351, no.7, s.657-667.
- JEMAL, A.; TIWARI, R.C.; MURRAY, T.; GHAFOR, A.; SAMUELS, A.; WARD, E.; FEUER, E.J.; THUN, M.J.; AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer statistics, 2004. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*. 2004, vol.54, no.1, s.8-29.
- JHO, E.H.; ZHANG, T.; DOMON, C.; JOO, C.K.; FREUND, J.N.; COSTANTINI, F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2002, vol.22, no.4, s.1172-83.
- JIANG, X.; ZHAO, Y.; SMITH, C.; GASPARETTO, M.; TURHAN, A.; EAVES, A.; EAVES, C. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia*. 2007, vol.21, no.5, s.926-935.
- JØRGENSEN, H.G.; ELLIOTT, M.A.; ALLAN, E.K.; CARR, C.E.; HOLYOAKE, T.L.; SMITH, K.D. Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood*. 2002, vol.99, no.2, s.713-715.
- KACZOROWSKI, G.J.; BARROS, F.; DETHMERS, J.K.; TRUMBLE, M.J.; CRAGOE, E.J. JR. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of amiloride. *Biochemistry*. 1985, vol.24, no.6, s.1394-1403.
- KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; NIEDERWIESER, D.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R.; ZOELLNER, U.; TALPAZ, M.; DRUKER, B.; GOLDMAN, J.; O'BRIEN, S.G.; RUSSELL, N.; FISCHER, T.; OTTMANN, O.; CONY-MAKHOUL, P.; FACON, T.; STONE, R.; MILLER, C.; TALLMAN, M.; BROWN, R.; SCHUSTER, M.; LOUGHRAN, T.; GRATWOHL, A.; MANDELLI, F.; SAGLIO, G.; LAZZARINO, M.; RUSSO, D.; BACCARANI, M.; MORRA, E.; INTERNATIONAL STI571 CML STUDY GROUP. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2002, vol.346, no.9, s.645-652.

- KANTARJIAN, H.M.; SMITH, T.L.; MCCREDIE, K.B.; KEATING, M.J.; WALTERS, R.S.; TALPAZ M.; HESTER, J.P.; BLIGHAM, G.; GEHAN, E.; FREIREICH, E.J. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*. 1985, vol.66, no.6, s.1326-1335.
- KATOH, M.; KATOH, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research*. 2007, vol.13, no.14, s.4042-4045.
- Kestler, H.A.; Kühl, M. Generating a Wnt switch: it's all about the right dosage. *Journal of Cell Biology*. 2011, vol.193, no.3, s.431-433.
- KISHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; IKEDA, S.; KISHIDA, M.; SAKAMOTO, I.; KOYAMA, S.; KIKUCHI, A. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, vol.273, no.18, s.10823-10826.
- KISLIN, K.L.; MCDONOUGH, W.S.; ESCHBACHER, J.M.; ARMSTRONG, B.A.; BERENS, M.E. NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion. *Neoplasia*. 2009, vol.11, no.4, s.377-387.
- KLEJMAN, A.; SCHREINER, S.J.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; SLUPIANEK, A.; WILSON, M.; SMITHGALL, T.E.; SKORSKI, T. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO Journal*. 2002, vol.21, no.21, s.5766-5774.
- KÖENIG, A.; LINHART, T.; SCHLENGEMANN, K.; REUTLINGER, K.; WEGELE, J.; ADLER, G.; SINGH, G.; HOFMANN, L.; KUNSCH, S.; BÜCH, T.; SCHÄFER, E.; GRESS, T.M.; FERNANDEZ-ZAPICO, M.E.; ELLENRIEDER, V. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*. 2010, vol.138, no.3, s.1189-1199.
- KÖNIG, J.; NIES, A.T.; CUI, Y.; LEIER, I.; KEPPLER, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999, vol.1461, no.2, s.377-394.
- KREIMANN, E.L.; MORALES, F.C.; DE ORBETA-CRUZ, J.; TAKAHASHI, Y.; ADAMS, H.; LIU, T.J.; MCCREA, P.D.; GEORGESCU, M.M. Cortical stabilization of beta-catenin contributes to NHERF1/EBP50 tumor suppressor function. *Oncogene*. 2007, vol.26, no.36, s.5290-5299.
- KÜHL, M.; SHELD AHL, L.C.; MALBON, C.C.; MOON, R.T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol.275, no.17, s.12701-12711.
- LATRES, E.; CHIAUR, D.S.; PAGANO, M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*. 1999, vol.18, no.4, s.849-854.
- LEE, S.M.; BAE, J.H.; KIM, M.J.; LEE, H.S.; LEE, M.K.; CHUNG, B.S.; KIM, D.W.; KANG, C.D.; KIM, S.H. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, vol.322, no.3, s.1084-1092.

- LEE, Y.N.; GAO, Y.; WANG, H.Y. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cellular Signalling*. 2008, vol.20, no.2, s.443-452.
- LEWIS, J.S.; VIJAYANATHAN, V.; THOMAS, T.J.; PESTELL, R.G.; ALBANESE, C.; GALLO, M.A.; THOMAS, T. Activation of cyclin D1 by estradiol and spermine in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism involving the p38 MAP kinase and phosphorylation of ATF-2. *Oncology Research*. 2005, vol.15, no.3, s.113-128.
- LI, L.; YUAN, H.; XIE, W.; MAO, J.; CARUSO, A.M.; MCMAHON, A.; SUSSMAN, D.J.; WU, D. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, vol.274, no.1, s.129-34.
- LI, M.; WANG, W.; SOROKA, C.J.; MENNONE, A.; HARRY, K.; WEINMAN, E.J.; BOYER, J.L. NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, vol.285, no.25, s.19299-19307.
- LI, N.; BATZER, A.; DALY, R. YAJNIK, V.; SKOLNIK, E.; CHARDIN, P.; BAR-SAGI, D.; MARGOLIS B.; SCHLESSINGER, J. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*. 1993, vol.363, no.6424, s.85-88.
- LIN, Y.Y.; HSU, Y.H.; HUANG, H.Y.; SHANN, Y.J.; HUANG, C.Y.; WEI, S.C.; CHEN, C.L.; JOU, T.S. Aberrant nuclear localization of EBP50 promotes colorectal carcinogenesis in xenotransplanted mice by modulating TCF-1 and β -catenin interactions. *Journal of Clinical Investigation*. 2012, vol.122, no.5, s.1881-1894.
- LIU, C.; LI, Y.; SEMENOV, M.; HAN, C.; BAEG, G.H.; TAN, Y.; ZHANG, Z.; LIN, X.; HE, X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002, vol.108, no.6, s.837-847.
- LIU, C.; KATO, Y.; ZHANG, Z.; DO, V.M.; YANKNER, B.A.; HE, X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, vol.96, no.11, s.6273-6278.
- LIU, J.; FARMER, J.D. JR.; LANE, W.S.; FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I.; SCHREIBER, S.L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991, vol.66, no.4, s.807-815.
- LIU, L.; WANG, S.; CHEN, R.; WU, Y.; ZHANG, B.; HUANG, S.; ZHANG, J.; XIAO, F.; WANG, M.; LIANG, Y. Myc induced miR-144/451 contributes to the acquired imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cell K562. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, vol.425, no.2, s.368-373.
- LOGAN, C.Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2004, vol. 20, s.781-810.
- LOMBARDO, L.J.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; BARRISH, J.C.; BEHNIA, K.; CASTANEDA, S.; CORNELIUS, L.A.; DAS, J.; DOWEYKO, A.M.; FAIRCHILD, C.; HUNT, J.T.; INIGO, I.; JOHNSTON, K.; KAMATH, A.; KAN, D.; KLEI, H.; MARATHE, P.; PANG, S.; PETERSON, R.; PITT, S.; SCHIEVEN, G.L.; SCHMIDT, R.J.; TOKARSKI, J.; WEN, M.L.; WITYAK, J.; BORZILLERI, R.M. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent

- antitumor activity in preclinical assays. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, vol.47, no.27, s.6658-6661.
- LUGO, T.G.; PENDERGAST, A.M.; MULLER, A.J.; WITTE, O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990, vol.247, no.4946, s.1079-1082.
- LY, C.; ARECHIGA, A.F.; MELO, J.V.; WALSH, C.M.; ONG, S.T. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Research*. 2003, vol.63, no.18, s.5716-5722.
- MA, L.; WANG, H.Y. Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, vol.282, no.39, s.28980-28990.
- MA, L.; WANG, Y.; MALBON, C.C. ; WANG, H.Y. Dishevelled-3 C-terminal His single amino acid repeats are obligate for Wnt5a activation of non-canonical signaling. *Journal of Molecular Signaling*. 2010, vol.5, no.19. doi: 10.1186/1750-2187-5-19.
- MA, Q.; LI, X.; VALE-CRUZ, D.; BROWN, M.L.; BEIER, F.; LUVALLE, P. Activating transcription factor 2 controls Bcl-2 promoter activity in growth plate chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, vol.101, no.2, s.477-487.
- MA, Q.; LI, X.; VALE-CRUZ, D.; BROWN, M.L.; BEIER, F.; LUVALLE, P. Activating transcription factor 2 controls Bcl-2 promoter activity in growth plate chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, vol.101, no.2, s.477-487.
- MAHON, F.X.; BELLOC, F.; LAGARDE, V.; CHOLLET, C.; MOREAU-GAUDRY, F.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003, vol.101, no.6, s.2368-2373.
- MAHON, F.X.; DEININGER, M.W.; SCHULTHEIS, B.; CHABROL, J.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000, vol.96, no.3, s.1070-1079.
- MANLEY, P.W.; COWAN-JACOB, S.W.; FENDRICH, G.; METAN, J. Molecular interactions between the highly selective pan-Bcr-Abl inhibitor, AMN107, and the tyrosine kinase domain of Abl. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* (2005) 106: 940a
- MARLOW, F.; TOPCZEWSKI, J.; SEPICH, D.; SOLNICA-KREZEL, L. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Current Biology*. 2002, vol.12, no.11, s.876-884.
- MCCREA, P.D.; TURCK, C.W.; GUMBINER, B. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 1991, vol.254, no.5036, s.1359-1361.
- MCDONALD, S.L.; SILVER, A. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *British Journal of Cancer*. 2009, vol.101, no.2, s.209-214.
- MEYN, M.A. 3RD.; WILSON, M.B.; ABDI, F.A.; FAHEY, N.; SCHIAVONE, A.P.; WU, J.; HOCHREIN, J.M.; ENGEN, J.R.; SMITHGALL, T.E. Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2

- region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, vol.281, no.41, s.30907-30916.
- MOLENAAR, M.; VAN DE WETERING, M.; OOSTERWEGEL, M.; PETERSON-MADURO, J.; GODSAVE, S.; KORINEK, V.; ROOSE, J.; DESTREE, O.; CLEVERS, H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996, vol.86, no.3, s.391-9.
- NAGAO, R.; ASHIHARA, E.; KIMURA, S.; STROVEL, J.W.; YAO, H.; TAKEUCHI, M.; TANAKA, R.; HAYASHI, Y.; HIRAI, H.; PADIA, J.; STRAND, K.; MAEKAWA, T. Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia-adaptation by AV65--a novel Wnt/ β -catenin signaling inhibitor. *Cancer Letters*. 2011, vol.312, no.1, s.91-100.
- NAGAR, B.; BORNMANN, W.G.; PELLICENA, P.; SCHINDLER, T.; VEACH, D.R.; MILLER, W.T.; CLARKSON, B.; KURIYAN, J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Research*. 2002, vol.62, no.15, s.4236-4243.
- NOSAKA, T.; KAWASHIMA, T.; MISAWA, K.; IKUTA, K.; MUI, A.L.; KITAMURA, T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO Journal*. 1999, vol.18, no.17, s.4754-4765.
- NOWELL, P.; HUNGERFORD, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [abstract]. *Science*. 1960, vol.132:1497, s.1488-1501
- O'BRIEN, S.G.; GUILHOT, F.; LARSON, R.A.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, J.J.; FISCHER, T.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T.; LECHNER, K.; NIELSEN, J.L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; SAGLIO, G.; SHEPHERD, J.; SIMONSSON, B.; GRATWOHL, A.; GOLDMAN, J.M.; KANTARJIAN, H.; TAYLOR, K.; VERHOEF, G.; BOLTON, A.E.; CAPDEVILLE, R.; DRUKER, B.J.; IRIS INVESTIGATORS. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2003, vol.348, no.11, s.994-1004.
- O'HARE, T.; DEININGER M. W.; EIDE C. A.; CLACKSON T.; DRUKER B. J. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2011, vol.17, no.2, s.212-221.
- O'HARE, T.; SHAKESPEARE, W.C.; ZHU, X.; EIDE, C.A.; RIVERA, V.M.; WANG, F.; ADRIAN, L.T.; ZHOU, T.; HUANG, W.S.; XU, Q.; METCALF, C.A. 3RD.; TYNER, J.W.; LORIAUX, M.M.; CORBIN, A.S.; WARDWELL, S.; NING, Y.; KEATS, J.A.; WANG, Y.; SUNDARAMOORTHY, R.; THOMAS, M.; ZHOU, D.; SNODGRASS, J.; COMMODORE, L.; SAWYER, T.K.; DALGARNO, D.C.; DEININGER, M.W.; DRUKER, B.J.; CLACKSON, T. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009, vol.16, no.5, s.401-412.
- O'HARE, T.; WALTERS, D.K.; STOFFREGEN, E.P.; JIA, T.; MANLEY, P.W.; MESTAN, J.; COWAN-JACOB, S.W.; LEE, F.Y.; HEINRICH, M.C.; DEININGER, M.W.; DRUKER, B.J. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Research*. 2005, vol.65, no.11, s.4500-4505.
- Ouwens, D.M.; DE RUITER, N.D. ; VAN DER ZON, G.C.; CARTER, A.P.; SCHOUTEN, J.; VAN DER BURGT, C.; KOOISTRA, K.; BOS, J.L.; MAASSEN, J.A.; VAN DAM, H. Growth factors can activate

- ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO Journal*. 2002, vol.21, no.14, s.3782-3793.
- PAN, Y.; WANG, L.; DAI, J.L. Suppression of breast cancer cell growth by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (*NHERF1*). *Breast Cancer Research*. 2006;vol.8, no.6, R63.
- PARIS, S.; POUYSSÉGUR, J. Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1983, vol.258, no.6, s.3503-3508.
- PARMAR, S.; KATSOLIDIS, E.; VERMA, A.; LI, Y.; SASSANO, A.; LAL, L.; MAJCHRZAK, B.; RAVANDI, F.; TALLMAN, M.S.; FISH, E.N.; PLATANIAS, L.C. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, vol.279, no.24, s.25345-25352.
- PAVLOVSKY, C.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J.E. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *Am. J. Hematol*. 2009, vol.84, no.5, s.287-293.
- PETRAK, J.; IVANEK, R.; TOMAN, O.; CMEJLA, R.; CMEJLOVA, J.; VYORAL, D.; ZIVNY, J.; VULPE, C.D. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*. 2008, vol.8, no.9, s.1744-1749.
- PETRAK, J.; TOMAN, O.; SIMONOVA, T.; HALADA, P.; CMEJLA, R.; KLENER, P.; ZIVNY, J. Identification of molecular targets for selective elimination of TRAIL-resistant leukemia cells. From spots to in vitro assays using TOP15 charts. *Proteomics*. 2009, vol.9, no.22, s.5006-5015.
- PINSON, K.I.; BRENNAN, J.; MONKLEY, S.; AVERY, B.J.; SKARNES, W.C. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000, vol.407, no.6803, s.535-538.
- POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*. 2000, vol.14, no.15, s.1837-1851.
- PUIL, L.; LIU, J.; GISH, G.; MBAMALU, G.; BOWTELL, D.; PELICCI, P.G.; ARLINGHAUS, R.; PAWSON, T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO Journal*. 1994, vol.13, no.4, s.764-773.
- PUTTINI, M.; COLUCCIA, A.M.; BOSCHELLI, F.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; DONELLA-DEANA, A.; AHMED, S.; REDAELLI, S.; PIAZZA, R.; MAGISTRONI, V.; ANDREONI, F.; SCAPOZZA, L.; FORMELLI, F.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells. *Cancer Research*. 2006, vol.66, no.23, s.11314-11322.
- QUENTMEIER, H.; EBERTH, S.; ROMANI, J.; ZABORSKI, M.; DREXLER, H.G. BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *Journal of Hematology & Oncology*. 2011, vol. 4:6. doi: 10.1186/1756-8722-4-6.
- QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J.E. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2006, vol.81, no.7, s.973-988.
- QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009a, vol.113, no.8, s.1619-1630.

- QUINTÁS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.M.; CORTES, J.E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009b, vol.16, no.2, s.122-131.
- RADICH, J.P.; DAI, H.; MAO, M.; OEHLER, V.; SCHELTER, J.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; SHAH, N.; STOCK, W.; WILLMAN, C.L.; FRIEND, S.; LINSLEY, P.S. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, vol.103, no.8, s.2794-9.
- RAMIREZ, P.; DIPERSIO J.F. Therapy options in imatinib failures. *Oncologist*. 2008, vol.13, no.4, s.424-434.
- RECZEK, D.; BERRYMAN, M.; BRETSCHER, A. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *Journal of Cell Biology*. 1997, vol.139, no.1, s.169-179.
- REYA, T.; DUNCAN, A.W.; AILLES, L. ; DOMEN, J. ; SCHERER, D.C.; WILLERT, K.; HINTZ, L.; NUSSE, R.; WEISSMAN, I.L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003, vol.423, no.6938, s.409-414.
- RICH, I.N.; WORTHINGTON-WHITE, D.; GARDEN, O.A.; MUSK, P. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger. *Blood*. 2000, vol.95, no.4, s.427-434.
- ROTIN, D.; STEELE-NORWOOD, D.; GRINSTEIN, S.; TANNOCK, I. Requirement of the Na+/H+ exchanger for tumor growth. *Cancer Research*. 1989, vol.49, no.1, s.205-211.
- ROWLEY, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973, vol.243, no.5405, s.290-293.
- RUBINFELD, B.; ALBERT, I.; PORFIRI, E.; FIOL, C.; MUNEMITSU, S.; POLAKIS, P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*. 1996, vol.272, no.5264, s.1023-1026.
- SAMANTA, A.K.; LIN, H.; SUN, T.; KANTARJIAN, H.; ARLINGHAUS, R.B. Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research*. 2006, vol.66, no.13, s.6468-6472.
- SANEYOSHI, T.; KUME, S.; AMASAKI, Y.; MIKOSHIBA, K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*. 2002, vol.417, no.6886, s.295-299.
- SATTLER, M.; SALGIA, R. The MET axis as a therapeutic target. *Update on Cancer Therapeutic*. 2009, vol.3, no.3, s.109-118.
- SAWYERS, C.L. Perspective: combined forces *Nature*. 2013 vol.498, no.7455, S7. doi:10.1038/498S7a.
- SCHINDLER, T.; BORNMANN, W.; PELLICENA, P.; MILLER, W.T.; CLARKSON, B.; KURIYAN, J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000, vol.289, no.5486, s.1938-42.

- SHAH, N.P.; NICOLL, J.M.; NAGAR, B.; GORRE, M.E.; PAQUETTE, R.L.; KURIYAN, J.; SAWYERS, C.L. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002, vol.2, no.2, s.117-125.
- SHAH, N.P.; TRAN, C.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; SAWYERS, C.L. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004, vol.305, no.5682, s.399-401.
- SHAW, K.T.; HO, A.M.; RAGHAVAN, A.; KIM, J.; JAIN, J.; PARK, J.; SHARMA, S.; RAO, A.; HOGAN, P.G. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, vol.92, no.24, s.11205-11209.
- SHELD AHL, L.C.; PARK, M.; MALBON, C.C.; MOON, R.T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Current Biology*. 1999, vol.9, no.13, s.695-698.
- SHIBATA, T.; CHUMA, M.; KOKUBU, A.; SAKAMOTO, M.; HIROHASHI, S. EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003, vol.38, no.1, s.178-186.
- SHTUTMAN, M.; ZHURINSKY, J.; SIMCHA, I.; ALBANESE, C.; D'AMICO, M.; PESTELL, R.; BEN-ZE'EV, A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, vol.96, no.10, s.5522-5527.
- SIEGL, P.K.; CRAGOE, E.J. JR.; TRUMBLE, M.J.; KACZOROWSKI, G.J. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984, vol.81, no.10, s.3238-3242.
- SILLABER, C.; GESBERT, F.; FRANK, D.A.; SATTLER, M.; GRIFFIN, J.D. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 2000, vol.95, no.6, s.2118-2125.
- SILLABER, C.; MAYERHOFER, M.; BÖHM, A.; VALES, A.; GRUZE, A.; AICHBERGER, K.J.; ESTERBAUER, H.; PFEILSTÖCKER, M.; SPERR, W.R.; PICKL, W.F.; HAAS, O.A.; VALENT, P. Evaluation of antileukaemic effects of rapamycin in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *European Journal of Clinical Investigation*. 2008, vol.38, no.1, s.43-52.
- SKORSKI, T.; BELLACOSA, A.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; MAJEWSKI, M.; MARTINEZ, R.; CHOI, J.K.; TROTTA, R.; WLODARSKI, P.; PERROTTI, D.; CHAN, T.O.; WASIK, M.A.; TSICHLIS, P.N.; CALABRETTA, B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO Journal*. 1997, vol.16, no.20, s.6151-6161.
- SKORSKI, T.; KANAKARAJ, P.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; RATAJCZAK, M.Z.; WEN, S.C.; ZON, G.; GEWIRTZ, A.M.; PERUSSIA, B.; CALABRETTA, B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995, vol.86, no.2, s.726-736.
- SLUSARSKI, D.C.; YANG-SNYDER, J.; BUSA, W.B.; MOON, R.T. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Developmental Biology*. 1997a, vol.182, no.1, s.114-20.

- SLUSARSKI, D.C.; CORCES, V.G.; MOON, R.T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature*. 1997b, vol.390, no.6658, s.410-413.
- SPARKS, A.B.; MORIN, P.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Research*. 1998, vol.58, no.6, s.1130-1134.
- SUBBAIAH, V.K.; KRANJEC, C.; THOMAS, M.; BANKS, L. PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochemical Journal*. 2011, vol.439, no.2, s.195-205.
- TAKAHASHI, Y.; MORALES, F.C.; KREIMANN, E.L.; GEORGESCU, M.M. PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *EMBO Journal*. 2006, vol.25, no.4, s.910-920.
- TAMAI, K.; SEMENOV, M.; KATO, Y.; SPOKONY, R.; LIU, C.; KATSUYAMA, Y.; HESS, F.; SAINT-JEANNET, J.P.; HE, X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 2000, vol.407, no.6803, s.530-535.
- TAMAI, K.; ZENG, X.; LIU, C.; ZHANG, X.; HARADA, Y.; CHANG, Z.; HE, X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell*. 2004, vol.13, no.1, s.149-156.
- TANEGASHIMA, K.; ZHAO, H.; DAWID, I.B. WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *EMBO Journal*. 2008, vol.27, no.4, s.606-617.
- TAUCHI, T.; OHYASHIKI, K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. *Leukemia Research*. 2004, vol.28, Suppl. 1, s.39-45.
- TAURIN, S.; SANDBO, N.; QIN, Y.; BROWNING, D.; DULIN, N.O. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, vol.281, no.15, s.9971-9976.
- TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999, vol.398, no.6726, s.422-426.
- THIELEN, N.; OSSENKOPPELE, G.J.; SCHUURHUIS, G.J.; JANSSEN, J.J. New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure. *Netherlands Journal of Medicine*. 2011, vol.69, no.10, s.430-440.
- THOMAS, J.; WANG, L.; CLARK, R.E.; PIRMOHAMED, M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*. 2004, vol.104, no.12, s.3739-3745.
- TOLWINSKI, N.S.; WIESCHAUS, E. A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biology*. 2004, vol.2, no.4, s.0486-0493.
- TOPCZEWSKI, J.; SEPICH, D.S.; MYERS, D.C.; WALKER, C.; AMORES, A.; LELE, Z.; HAMMERSCHMIDT, M.; POSTLETHWAIT, J.; SOLNICA-KREZEL, L. The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension. *Developmental Cell*. 2001, vol.1, no.2, s.251-264.

- VIGNE, P.; FRELIN, C.; CRAGOE, E.J. JR. ; LAZDUNSKI, M. Ethylisopropyl-amiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the Na⁺/H⁺ exchange system in various cell types. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983, vol.116, no.1, s.86-90.
- VIVANCO, I.; SAWYERS, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002, vol.2, no.7, s.489-501.
- WALLINGFORD, J.B.; HABAS, R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*. 2005, vol.132, no.20, s.4421-4436.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956, vol.123, no.3191, s.309-314.
- WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; COWAN-JACOB, S.W.; HOCHHAUS, A.; GRIFFIN, J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2007, vol.7, no.5, s.345-356.
- WEISBERG, E.; MANLEY, P.; MESTAN, J.; COWAN-JACOB, S.; RAY, A.; GRIFFIN, J.D. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *British Journal of Cancer*. 2006, vol.94, no.12, s.1765-1769.
- WHEELER, D.S.; BARRICK, S.R.; GRUBISHA, M.J.; BRUFKY, A.M.; FRIEDMAN, P.A.; ROMERO, G. Direct interaction between NHERF1 and Frizzled regulates β -catenin signaling. *Oncogene*. 2011, vol.30, no.1, s.32-42.
- WHITE, D.L.; SAUNDERS, V.A.; DANG, P.; ENGLER, J.; ZANNETTINO, A.C.; CAMBARERI, A.C.; QUINN, S.R.; MANLEY, P.W.; HUGHES, T.P. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood*. 2006, vol.108, no.2, s.697-704.
- WIELENGA, V.J.; SMITS, R.; KORINEK, V.; SMIT, L.; KIELMAN, M.; FODDE, R.; CLEVERS, H; PALS, S.T. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *American Journal of Pathology*. 1999, vol.154, no.2, s.515-23.
- WINTER, C.G.; WANG, B.; BALLEW, A.; ROYOU, A.; KARESS, R.; AXELROD, J.D.; LUO, L. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*. 2001, vol.105, no.1, s.81-91.
- WISDOM, R.; JOHNSON, R.S.; MOORE, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Journal*. 1999, vol.18, no.1, s.188-197.
- XIE, S.; WANG, Y.; LIU, J.; SUN, T.; WILSON, M.B.; SMITHGALL, T.E.; ARLINGHAUS, R.B. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene*. 2001, vol.20, no.43, s.6188-6195.
- XIE S, LIN H, SUN T, ARLINGHAUS R.B. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene*. 2002, vol.21, no.47, s.7137-7146.
- YAMANAKA, H.; MORIGUCHI, T.; MASUYAMA, N.; KUSAKABE, M.; HANAFUSA, H.; TAKADA, R.; TAKADA, S.; NISHIDA, E. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Reports*. 2002, vol.3, no.1, s.69-75.

- YAN, M.; DAI, T.; DEAK, J.C.; KYRIAKIS, J.M.; ZON, L.I.; WOODGETT, J.R.; TEMPLETON, D.J. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*. 1994, vol.372, no.6508, s.798-800.
- YANAGAWA, S.; MATSUDA, Y.; LEE, J.S.; MATSUBAYASHI, H.; SESE, S.; KADOWAKI, T.; ISHIMOTO, A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO Journal*. 2002, vol.21, no.7, s.1733-1742.
- YOST, C.; TORRES, M.; MILLER, J.R.; HUANG, E.; KIMELMAN, D.; MOON, R.T. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & Development*. 1996, vol.10, no.12, s.1443-1454.
- YUAN, Y.; NIU, C.C.; DENG, G.; LI, Z.Q.; PAN, J.; ZHAO, C.; YANG, Z.L.; SI, W.K. The Wnt5a/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells. *International journal of molecular medicine*Int. 2011, vol.27, no.1, s.63-69.
- ZENG, X.; TAMAI, K.; DOBLE, B.; LI, S.; HUANG, H.; HABAS, R.; OKAMURA, H.; WOODGETT, J.; HE, X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 2005, vol.438, no.7069, s.873-877.
- ZHAO, C.; BLUM, J.; CHEN, A.; KWON, H.Y.; JUNG, S.H.; COOK, J.M.; LAGOO, A.; REYA, T. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007, vol.12, no.6, s.528-541.