

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lenka Březinová**

Úloha exosomů u chronické myeloidní leukemie  
The role of exosomes in chronic myeloid leukemia

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Matyáš Krijt, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Tereza Hrdinová

Praha, 2022

**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, 02.05.2022

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat mému školiteli Matyáši Krijtovi a mé konzultantce Terce Hrdinové za cenné rady, jejich trpělivost a čas, které mi při psaní této práce věnovali. Dále bych chtěla poděkovat všem členům proteomické laboratoře ÚHKT za přátelské prostředí při psaní této práce, ale i za zavedení do laboratorní praxe. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

## Abstrakt

Exosomy jsou extracelulární váčky o velikosti 30-150 nm, jejichž funkce je u chronické myeloidní leukemie (CML) zkoumaná kvůli jejich vlivu na proliferaci CML buněk, remodelaci kostní dřeně, angiogenezi a rezistenci na léčbu tyrosin-kinázovými inhibitory (TKIs). Ačkoliv byly vyvinuty účinné TKIs inhibující BCR-ABL kinázu, přesto zůstává 20–30 % pacientů na léčbu rezistentní. Rezistence CML buněk na léčbu je podporována exosomy. Exosomy přenášejí proteiny, nukleové kyseliny, chemokiny i malé molekuly, které podporují antiapoptotické, respektive tlumí proapoptotické procesy.

Antiapoptotické procesy jsou podporovány zejména zvýšenými hladinami proteinů: TGF- $\beta$ 1, USP6 a FGF2 a různorodých zástupců RNA: miR-365, miR-21, Hsa\_circ\_0058493 a mRNA pro BCR-ABL. Snaha leukemických buněk je naopak snížit množství proapoptotických molekul, mezi které patří miR-320, miR-328 a miR-146a-5p.

Leukemické buňky prostřednictvím exosomů modifikují mikroprostředí kostní dřeně tak, aby je podporovalo, a dále ovlivňují expresi adhezních a proangienních molekul. Důležitou roli v těchto procesech hrají miR-126, miR-210 a miR-92a.

Vzhledem k variabilitě přenášených molekul není překvapující množství procesů ovlivněných CML exosomy ani jejich potenciální využití v léčbě CML, jak již bylo dokázáno v případě využití modifikovaných exosomů k přenosu imatinibu nebo siRNA pro BCR-ABL.

Klíčová slova: exosomy, CML, rezistence, miRNA, angiogeneze, terapeutický cíl

## **Abstract**

Exosomes are extracellular vesicles of a size range 30-150 nm whose function has been explored in chronic myeloid leukemia (CML) due to their role in proliferation of CML cells, remodelling the bone marrow niche, angiogenesis and resistance to treatment with tyrosin-kinase inhibitors (TKIs). Although BCR-ABL kinase is effectively targeted by TKIs, 20–30 % of patients remain resistant to treatment. Resistance of CML cells to TKIs treatment is supported by exosomes. Exosomes transport proteins, nucleic acids, chemokines and small molecules that stimulate anti-apoptotic or suppress pro-apoptotic processes in leukemic cells.

Anti-apoptotic processes are especially enhanced by upregulated protein levels: TGF- $\beta$ 1, USP6 and FGF2 and various types of RNA: miR-365, miR-21, Hsa\_circ\_0058493 and mRNA for BCR-ABL. In contrast leukemic cells tend to reduce the number of pro-apoptotic molecules, including miR-320, miR-328 and miR-146a-5p.

Leukemic cells modify the bone marrow microenvironment through exosomes in the way to support their survival and also in order to adjust expression of adhesion and pro-angiogenic molecules. An important role in those processes play miR-126, miR-210 and miR-92a.

Neither the number of processes affected by CML exosomes nor their potential use in the treatment of CML is surprising if we are considering the variability of transferred molecules as has been demonstrated by using modified exosomes to transfer imatinib or siRNA for BCR-ABL.

Key words: exosomes, CML, resistance, miRNA, angiogenesis, therapeutic target

## Seznam použitých zkratek

ABCG2	člen 2 ze superrodiny G ATP vazebných transportérů
ABL	„Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“
Akt/PKB	protein kináza B Akt z angl. thymomas of AKR mice
ALIX	ALG-2 interagující protein X
ATP	adenosintrifosfát
BCR	„breakpoint cluster region“
BCR-ABL	„breakpoint cluster region“-„Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“
BM-MSC	mezenchymální kmenové buňky z lidské kostní dřeně
CDK3	cyklin dependentní kináza 3
CML	chronická myeloidní leukemie
CXCL12	chemokinový ligand 12 s motivem C-X-C
EGFR	receptor endoteliálního růstového faktoru
ERK 1/2	extracelulární signální regulovaná kináza 1/2
ESCRT	endosomální třídící komplex nezbytný pro transport
FGF2 či bFGF	fibroblastický růstový faktor 2
FGFR1	receptor fibroblastického růstového faktoru
GDP	guanosindisfosfát
GLS1	glutamináza 1
GSK3 $\beta$	glykogen syntázy kinázy 3 beta
GTP	guanosintrifosfát
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli
HGF	hepatocytární růstový faktor
HNRNPA1	heterogenní jaderný ribonukleoprotein A1

HSC	hematopoetické kmenové buňky
Hsc70	protein teplotního šoku 70
hUC-MSC	lidské mezenchymální stromální buňky izolované z pupečníku
HUVEC	endoteliální buňky odvozené z lidské pupečnickové žíly
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula 1
IFITM3	interferonem indukovaný transmembránový protein 3
IL-3	interleukin 3
IL-3-R	receptor interleukinu 3
LSC	leukemické kmenové buňky
MAPK	mitogenem aktivovaná protein-kináza
MARCKS	myristoylovaný substrát C-kinázy bohatý na alanin
MMP9	matrixová metaloproteináza 9
MSC	mesenchymální kmenové buňky
mTOR	savčí cíl rapamycinu
MVBs	multivezikulární tělíska
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NK	přirození zabijáci („natur killer“)
NKG2D	receptor zabíječských buněk lektinového typu
PI3K	fosatidylinositol-3-kináza
PTEN	fosfatáza a homolog tenzinu
s-ICAM	solubilní mezibuněčná adhezivní molekula 1
SNARE	„SNAP receptor“
STAT3	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TGF- $\beta$ 1	transformující růstový faktor beta 1

TKI	tyrosin-kinázový inhibitor
TKIs	tyrosin-kinázové inhibitory
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
TSG101	protein genu 101 citlivý k nádoru
USP6	ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza 6
UTR	netranslatovaná oblast
VCAM1	vaskulární buněčná adhezní molekula
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor



## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Chronická myeloidní leukemie .....	2
2.1	Průběh CML .....	2
2.2	Léčba a rezistence na tyrosin-kinázové inhibitory.....	2
3	Exosomy, jejich složení a funkce .....	4
4	Role exosomů u rezistencí na inhibitory tyrosin-kináz.....	5
4.1	Buněčné rezistentní linie využívané ve zmíněných studiích .....	5
4.2	PI3K/Akt/mTOR dráha a mTOR nezávislá dráha .....	6
4.3	MAPK dráha .....	7
4.4	JAK/STAT3 dráha .....	8
4.5	Proteomické studie exosomů z rezistentních CML buněk.....	8
4.6	miRNA a cirkulární RNA přenášené exosomy.....	9
4.6.1	Cirkulární Hsa_circ_0058493 .....	10
4.6.2	MiR-365 .....	10
4.6.3	MiR-21 .....	11
4.6.4	MiR-126 .....	11
4.6.5	MiR-320 .....	13
4.6.6	MiR-328 .....	14
4.7	Modifikované exosomy potlačující rezistenci CML buněk.....	14
4.8	Mesenchymální kmenové buňky a exosomy od nich odvozené.....	15
4.8.1	Autokrinní FGF2-FGFR1 ovlivnění leukemických buněk .....	16
4.8.2	Ovlivnění rezistence pomocí USP6- miR-146a-5p.....	17
5	Vliv kostní dřeně, její remodelace a angiogeneze.....	18
5.1	Vliv exosomů na angiogenezi.....	18
5.2	Vliv exosomů na remodelaci kostní dřeně.....	20
6	Růst nádoru a proliferace leukemických buněk .....	21
7	Diskuze a závěr .....	23
8	Seznam použité literatury.....	25

# 1 Úvod

Exosomy se řadí mezi extracelulární váčky, které na svém povrchu mají specifické markery CD81, CD9 a CD63. Byly objeveny jako váčky uvolňující se z retikulocytů do extracelulárního prostředí, avšak jejich další funkce byly dlouho neobjasněny (Harding, Heuser, a Stahl 1983). Později bylo zjištěno, že jsou schopny přenášet nukleové kyseliny a signální molekuly do buněk, a tímto ovlivnit jejich signální dráhy související např. s buněčnou proliferací a apoptózou (Raimondo et al. 2015). Tento fenomén je zkoumán i u chronické myeloidní leukemie (CML). CML se řadí mezi hematologické onemocnění postihující buňky myeloidní řady. V 95 % případů je toto onemocnění charakterizováno Philadelphským (Ph) chromozomem, který vzniká translokací genů 9 a 22 (Bergsagel 1967). Tato translokace způsobuje fúzní spojení genů „breakpoint cluster region“ (BCR) a „Abelson murine leukemia viral oncogene homolog (ABL). Proteinový produkt „breakpoint cluster region“-„Abelson murine leukemia viral oncogene homolog“ (BCR-ABL) má konstitutivní tyrosin-kinázovou aktivitu ovlivňující proliferaci a přežívání hematopoetických buněk, tedy vznikajících leukemických buněk. Průlom v léčbě způsobil objev tyrosin-kinázových inhibitorů (TKIs), které potlačují aktivitu proteinu BCR-ABL (B. J. Druker et al. 1996; Buchdunger, Matter, a Druker 2001). I přes jejich vysokou účinnost dochází u 20–30 % pacientů k selhání odpovědi na léčbu, tedy ke vzniku rezistence (Bhutra et al. 2014). V nedávné době bylo prokázáno, že důležitou roli v BCR-ABL rezistenci hrají také exosomy.

Hlavním cílem této práce je souhrnně popsat význam exosomů u CML, respektive:

- charakterizovat přenášené molekuly
- identifikovat jejich vliv na leukemické buňky
- shrnout hlavní funkce exosomů u chronické myeloidní leukemie, jako je zejména vliv na rezistenci, růst nádoru a ovlivnění kostní dřeně spojené s angiogenezí.

## 2 Chronická myeloidní leukemie

Chronická myeloidní leukemie (CML) je řazena mezi maligní onemocnění. Postihuje buňky myeloidní řady, tedy progenitory pro erytrocyty, trombocyty, dendritické a žírné buňky, granulocyty a monocyty. CML je charakterizována přítomností Ph chromozomu vzniklého translokací chromozomu 9 a 22 v hematopoetických kmenových buňkách. Přítomnost Ph chromozomu byla u CML poprvé zaznamenána Nowellem a Hungerfordem v roce 1960 (Baikie et al. 1960). Pro vznik onemocnění je nezbytná fúze genu BCR kódujícího serin/threoninovou kinázu s genem ABL kódujícím tyrosinovou kinázu (Heisterkamp et al. 1985; Maru a Witte 1991; Ren 2005). Vzniklý fúzní protein BCR-ABL má konstitutivní tyrosin-kinázovou aktivitu a neustále ovlivňuje proteiny signálních kaskád (Zhou, Medeiros, a Hu 2018). To má za následek přežívání, proliferaci a inhibici apoptózy leukemických buněk (Ren 2005).

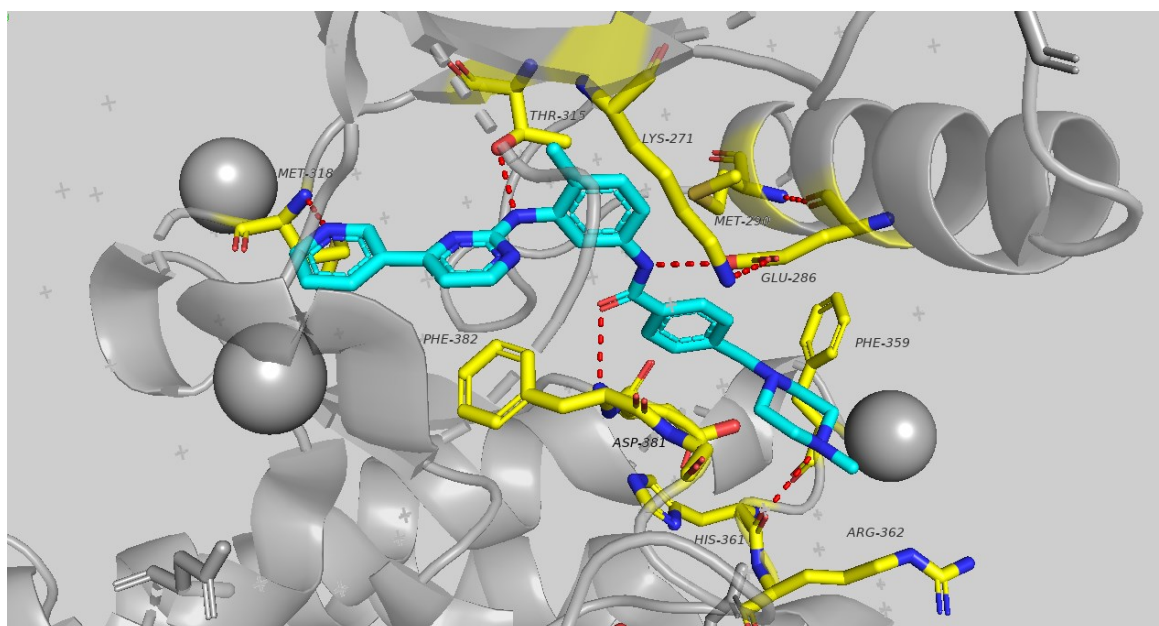
### 2.1 Průběh CML

Průběh onemocnění lze charakterizovat třemi fázemi: chronickou, akcelerovanou a blastickou. Chronická fáze probíhá několik let a dochází při ní k hromadění nezralých myeloidních buněk v krvi, kostní dřeni a slezině (Kantarjian a Talpaz 1988). Bez efektivní léčby dochází vlivem nahromadění genetických mutací k progresi nemoci do akcelerované a poté blastické fáze (Yang a Fu 2015). Jedná se o fatální období onemocnění, kdy dochází k hromadění blastů (Kantarjian a Talpaz 1988) a projevům totožnými s akutní leukemií, tedy krvácením, teplotou a infekcemi, s obvyklým úmrtím do 6-10 měsíců (Saubele a Silver 2015; Jabbour a Kantarjian 2020). Progresi blastické fáze lze částečně oddálit použitím správných tyrosin-kinázových inhibitorů TKIs (Saubele a Silver 2015). Pokud pacient neodpovídá na léčbu dvěma TKIs nebo je v akcelerované fázi, tak jeho léčba spočívá v transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Jabbour a Kantarjian 2020).

### 2.2 Léčba a rezistence na tyrosin-kinázové inhibitory

V počátku léčba spočívala v použití interferonu- $\alpha$  a alogenní transplantace kmenových buněk. Kvůli vyššímu věku pacientů a riziku reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) bylo vhodné nalézt jiný terapeutický cíl. Revoluci v léčbě způsobil objev účinného tyrosin-kinázového inhibitoru (TKI) CPG 57148 (ST1-571), který inhibuje aktivní BCR-ABL a zastavuje proliferaci pouze leukemických buněk (B. J. Druker et al. 1996; Buchdunger, Matter, a Druker 2001). TKI ST1-571 byl později přejmenován na imatinib či Gleevec (Brian J. Druker et al. 2002). Na kinázové doméně ABL se imatinib váže do adenosintrifosfát (ATP) vazebného místa

(Obr. 1, strana 3) a tím způsobí její blokaci (Schindler et al. 2000). Navíc inhibuje tyrosin kinázu receptoru růstových faktorů odvozených z krevních destiček (PDGF-R) (Druker et al. 1996).



Obr. 1 – Vazba imatinibu (modře) do ATP vazebného místa na ABL kinázové doméně. (aminokyseliny podílející se na vazbě jsou zvýrazněny žlutě), Zdroj: molekula IIEP stažena z protein data bank (Nagar et al. 2002) a následně upravena v programu PyMOL.

Odpověď pacientů na imatinib se ovšem může snížit v důsledku progresu nemoci do blastické fáze (Gorre et al. 2001). Při chronické fázi dochází k hromadění kyslíkových radikálů v kmenových a progenitorových leukemických buňkách (Nieborowska-Skorska et al. 2012). Bodové mutace v tyrosin-kinázové doméně BCR-ABL a zvýšená exprese tohoto genu mohou způsobit rezistenci na imatinib. Na základě této zkušenosti byly vyvinuty tyrosin-kinázové inhibitory druhé generace, jako např. dasatinib, nilotinib, bosutinib a třetí generace např. – ponatinib (Milojkovic a Apperley 2009; Cortes et al. 2012).

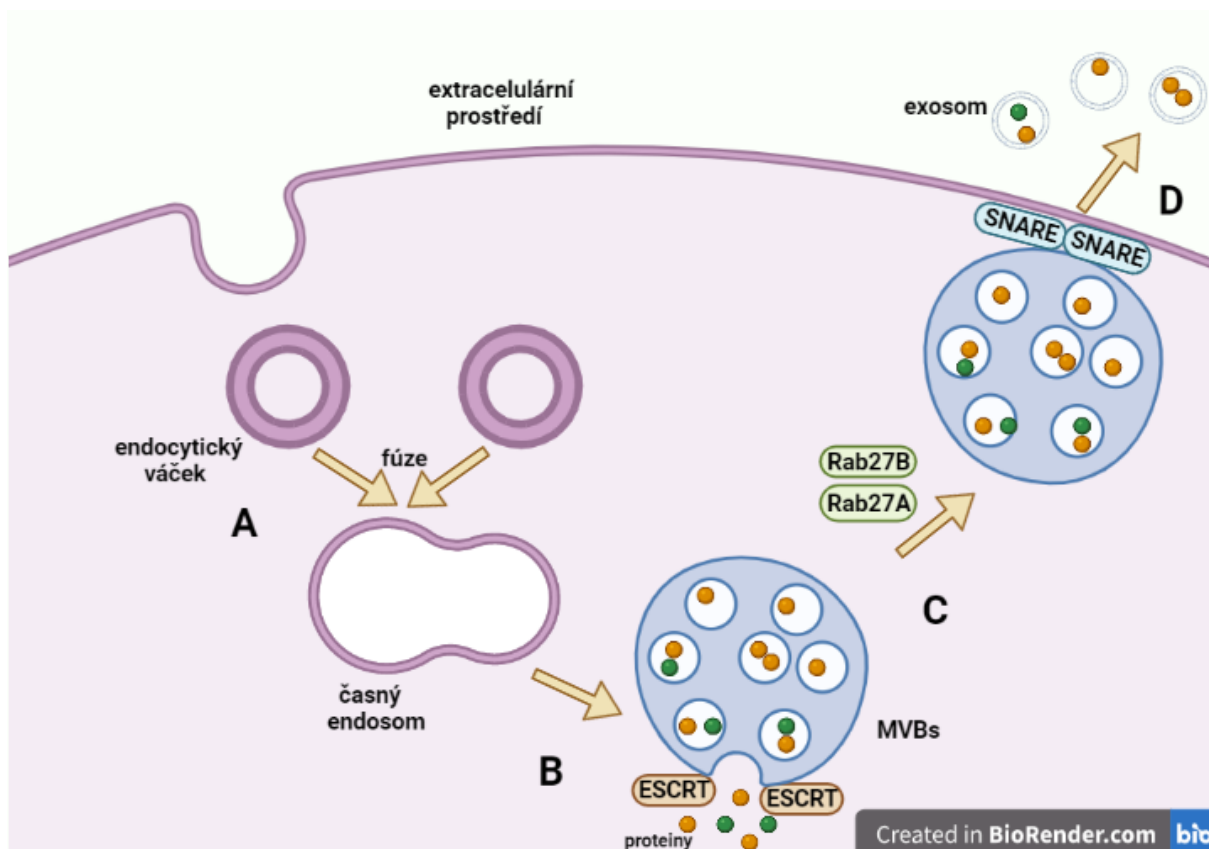
Rezistence na TKIs lze dělit do dvou kategorií. První kategorií jsou BCR-ABL závislé rezistence, do kterých se řadí mutace v kinázové doméně BCR-ABL a amplifikace genu BCR-ABL. Druhá kategorie zahrnuje BCR-ABL nezávislé rezistence, do kterých lze zařadit odolnost kmenových buněk CML, přenos léčiva ven z buňky přes transportér P-glykoprotein a nedostatečný transport léčiva do buňky prostřednictvím transportéru organických kationtů (OCT), aktivace dalších tyrosin-kináz, mikroprostředí kostní dřeně usnadňující rezistenci a exosomy přenášející miRNA či faktory způsobující rezistenci (Meenakshi Sundaram et al. 2019). Ukazuje se, že právě exosomy mají důležité funkce nejen u chronické myeloidní leukemie, a proto je důležité shrnout hlavní úlohy exosomů a jimi přenášených molekul u CML (Mashouri et al. 2019).

### 3 Exosomy, jejich složení a funkce

Jedná se o extracelulární váčky o velikosti 30-150 nm ohraničené fosfolipidovou dvouvrstvou (Schageman et al. 2013). Byly objeveny v roce 1983 jako váčky obsahující transferinové receptory uvolňující se z retikulocytů do extracelulárního prostředí (Harding, Heuser, a Stahl 1983). Následně byly prokázány jejich komunikační schopnosti s jinými buňkami (Pando et al. 2018). Jejich vizualizace je ideální pomocí elektronové mikroskopie (Mathivanan, Ji, a Simpson 2010). Formování exosomů (Obr. 2, strana 5) začíná fúzí endocytických váček za vzniku časného endosomu na klatrinu či kaveolinu závislou či nezávislou dráhou. Nežádě na původu vzniku endosomu dále dochází k přeměně na pozdní endosom a následně je jeho membrána zanořena a vznikají intraluminální váčky, které se formují do multivezikulárních tělísek (MVBs). Sortování proteinů do intraluminálních váček je regulované pomocí 4 typů endosomálních třídících komplexů nezbytných pro transport (ESCRT). Vlivem proteinů Rab27A a Rab27B jsou MVBs transportovány k cytoplazmatické membráně. K interakci těchto tělísek s membránou dochází pomocí „SNAP receptor“ (SNARE) proteinů. Teprve po uvolnění intraluminálních váček z multivezikulárních tělísek do extracelulárního prostoru dochází ke vzniku exosomů (Mashouri et al. 2019). Jejich uvolnění z K562 leukemických buněk je závislé na vápníku (Savina et al. 2003). Naopak ESCRT nezávislá dráha je využívána ve specializovaných buněčných typech např. v melanocytech (Mashouri et al. 2019).

Exosomy jsou charakterizovány specifickými proteiny: ALG-2 interagující protein X (ALIX), protein genu 101 citlivý k nádoru (TSG101), protein teplotního šoku 70 (Hsc70) a povrchovými markery: CD9, CD63 a CD81 (Pando et al. 2018; Mashouri et al. 2019). Exosomy přenáší funkční biomolekuly jako jsou např. RNA, DNA, cytokiny, chemokiny a proteiny. Dále obsahují cytosolické proteiny malých GTPáz Rab regulující dokování exosomů a jejich fúzi (Mears et al. 2004). Exosomy jsou produkovány většinou buněk, cirkulují v plazmě, moči a jiných biologických tekutinách, což umožňuje jejich snadnou dostupnost u pacientů (Pisitkun, Shen, a Knepper 2004; Mathivanan, Ji, a Simpson 2010).

U chronické myeloidní leukemie v akcelerované a blastické fázi dokáží exosomy přenášet mRNA pro BCR-ABL (Kang et al. 2018). Mezi další důležité vlastnosti exosomů u chronické myeloidní leukemie patří podpora angiogeneze a růstu nádoru, proliferace leukemických buněk, přenosu rezistence na TKIs a formování mikroprostředí kostní dřeně pro leukemické kmenové buňky (Pando et al. 2018).



Obr. 2 – **Formování exosomů:** Tento proces začíná fúzí endocytických váček za vzniku časného endosomu (A), následuje přeměna na pozdní endosom a MVBs, kdy jsou prostřednictvím ESCRT tříděny proteiny a přenášené molekuly do intraluminálních váček (B). Rab27A a Rab27B transportují MVBs k cytoplazmatické membráně (C), kde dojde k fúzi pomocí SNARE a uvolnění exosomů do extracelulárního prostředí (D). (Vytvořeno pomocí BioRender.com)

## 4 Role exosomů u rezistencí na inhibitory tyrosin-kináz

I přes léčbu imatinibem se u některých pacientů vyskytuje progresivní rozvoj nemoci a případná rezistence záleží na stadiu nemoci a délce léčby imatinibem (Lahaye et al. 2005). U části pacientů se projevuje rezistence na TKIs druhé generace. V tomto případě je třeba brát v potaz především příčinu rezistence, případné mutace v *BCR-ABL*, s ohledem na anamnézu a věk pacienta (Hochhaus et al. 2020). Výzkumné týmy, které se soustředí na charakterizaci obsahu exosomů u CML, jejich povrchových markerů a šíření rezistence využívají jako modely zkoumání linie buněk chronické myeloidní leukemie K562 a LAMA84, či patientské vzorky (Min et al. 2018; Hrdinova et al. 2021; Li et al. 2021).

### 4.1 Buněčné rezistentní linie využívané ve zmíněných studiích

Pro studium vlivu exosomů u rezistencí na tyrosin-kinázové inhibitory u CML se nejčastěji používají buněčné linie K562 a LAMA84. Obě buněčné linie rezistentní na imatinib mají amplifikovaný gen *BCR-ABL* ((Mahon et al. 2000), podle (S. Q. Wu et al. 1995)). Je tedy potřeba vyšší dávky imatinibu k inhibici fosforylace BCR-ABL kinázy. Ke snížení životaschopnosti K562 a LAMA84 buněk a rychlosti proliferace je potřeba

průměrně 10 krát vyšší koncentrace imatinibu oproti senzitivním buněčným liniím (Mahon et al. 2000).

#### 4.2 PI3K/Akt/mTOR dráha a mTOR nezávislá dráha

U exosomů z imatinib rezistentních K562 buněk byly detekovány zvýšené hladiny transformujícího růstového faktoru beta 1 (TGF- $\beta$ 1), Hsc70 a receptoru zabíječských buněk lektinového typu (KLRK1, známější jako NKG2D) (J. Liu et al. 2016). TGF- $\beta$ 1 je obvykle zvýšený při progresi nádoru (L. Zhang, Zhou, a Dijke 2013). TGF- $\beta$ 1 obsažený v exosomech z leukemických buněk dokáže podle Raimondo et al. vazbou na buněčný receptor autokrinně aktivovat své leukemické buňky a spustit v nich signální dráhu: fosatidylinositol-3-kináza (PI3K)/ protein kináza B (Akt) (Obr. 3, strana 8) (Raimondo et al. 2015). Liu et al. potvrdili aktivaci této dráhy v imatinib rezistentních K562 buňkách (J. Liu et al. 2016). V těchto buňkách dochází právě k aktivaci dvou signálních drah, mTOR nezávislé dráhy indukující autofagii a mTOR závislé dráhy související s PI3K/Akt a antiapoptotickým účinkem. V dráze indukující autofagii je zásadním proteinem beclin-1 tvořící komplex s vakuolárním třídícím proteinem 34 (VPS34). S autofagií podle studie souvisí zvýšené uvolňování exosomů (J. Liu et al. 2016). Tuto hypotézu potvrzuje zjištění, že multivezikulární tělíska, která později uvolní exosomy, jsou schopna si s autofagozomy pomocí různých mechanismů na Hsc70 závislých i nezávislých předávat svůj obsah. Hsc 70 je chaperon, který přenáší proteiny do multivezikulárních tělísek (Fader a Colombo 2006; Sahu et al. 2011). Souvislost autofagie s uvolňováním exosomů potvrzuje i fakt, že potlačením mTOR nezávislé dráhy dochází ke snížení produkce exosomů (J. Liu et al. 2016).

V rozporu s ostatními studiemi J. Liu et al. identifikovali sníženou expresi BCR-ABL v leukemické buněčné linii K562 rezistentní na imatinib ve srovnání se senzitiví. Dále je v K562 rezistentních buňkách aktivována již zmíněná mTOR závislá dráha s antiapoptotickým účinkem (J. Liu et al. 2016). Hladiny proapoptotických proteinů Bax a kaspázy 3 jsou v imatinib rezistentních buňkách sniženy, ale exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 zůstává v senzitivních i rezistentních buňkách beze změny (Bertacchini et al. 2015; J. Liu et al. 2016). Dále byla v imatinib rezistentních buňkách prokázána zvýšená hladina cyklinu D1 podporujícího progresi skrze G1 fázi buněčného cyklu a snížená hladina inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21, který proto nemůže inhibovat cyklin D1 (Liang a Slingerland 2003; J. Liu et al. 2016). Zvýšená hladina cyklinu D1 je způsobená tím, že fosforylovaná a aktivovaná Akt kináza potlačí kinázovou aktivitu glykogen syntázy kinázy 3 beta (GSK3 $\beta$ ) (L. Zhang, Zhou, a Dijke 2013). Ve studii bylo prokázáno, že léčba dasatinibem cílícím na mTOR dráhu

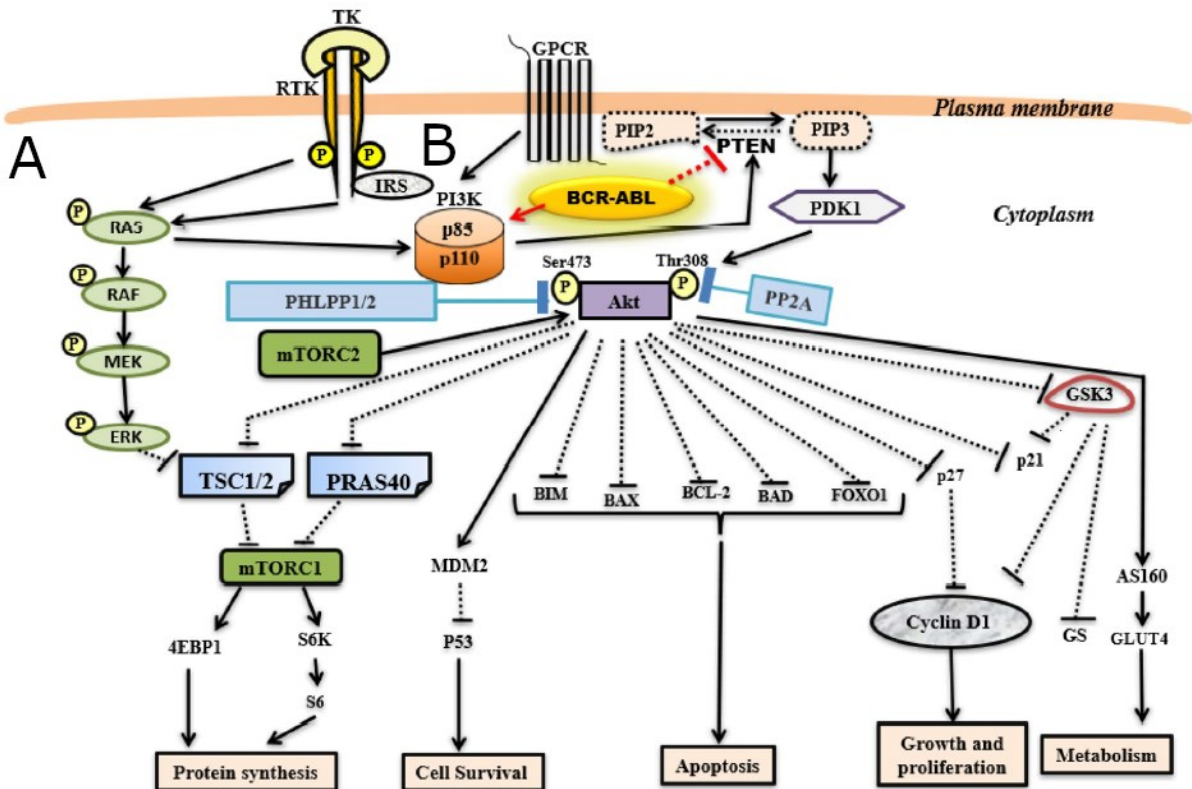
potlačuje rezistenci na imatinib, tedy způsobuje apoptózu imatinib rezistentních buněk za současného sníženého uvolňování exosomů. Aktivace PI3K/Akt signální dráhy byla zjištěna tak, že všechny výše uvedené proteiny byly zvýšeně exprimované v rezistentních buňkách (J. Liu et al. 2016). Exosomy z rezistentních buněk navíc obsahovaly zvýšenou hladinu NKG2D (J. Liu et al. 2016). NKG2D receptor zprostředkuje odpověď NK buněk a právě NKG2D ligandy u leukemických buněk s mutacemi v tyrosin-kinázové doméně zlepšují imunitní odpověď indukovanou NK buňkami imunitního systému (Kim et al. 2021).

V leukemických kmenových buňkách (LSC) byl zjištěn jiný vliv TGF- $\beta$ 1. Pomocí něj dochází k regulační inhibici Akt a transkripční faktor Foxo3a zůstává v jádře. Tento transkripční faktor zvyšuje přežití LSC při léčbě imatinibem. Potlačení TGF- $\beta$ 1 spolu s imatinibem by tak mohlo být dalším terapeutickým cílem (Naka et al. 2010).

### 4.3 MAPK dráha

Další důležitou aktivovanou dráhou u CML je mitogenem aktivovaná protein-kinázová (MAPK) dráha (Obr. 3, strana 8). Dochází k dimerizaci tyrosin-kinázových receptorů a vzájemné fosforylaci, přeměně neaktivní formy Ras-GDP na Ras-GTP. To způsobí fosforylační aktivaci tzv. kinázové kaskády, tedy: Raf, mitogenem aktivované proteinkinázy 1/2 (MEK 1/2) a extracelulární signální regulované kinázy ERK 1/2, což vede k regulaci proteinové syntézy (Cetin, Ilker Saygili, a Yilmaz 2021). V endoteliálních buňkách je aktivována kináza ERK 1/2 a tím je podpořena angiogeneze (Taverna et al. 2012).





Obr. 3 – Signální dráhy regulované BCR-ABL v CML: MAPK dráha (A) a PI3K/Akt dráha (B). (Převzato (Singh et al. 2021)).

#### 4.4 JAK/STAT3 dráha

Po vazbě různých druhů ligandů, např. cytokinů a růstových faktorů na receptor Janusových tyrosin-kináz (JAK) dojde k jejich dimerizaci a vzájemné fosforylaci, a poté se na ně může navázat přenašeč signálu a aktivátor transkripce (STAT3). STAT3 je následně fosforylován a dimerizuje. Vzniklé dimery mohou být transportovány do jádra, kde dojde k regulaci genové exprese. U CML STAT3 spouští expresi antiapoptotických proteinů Bcl-x1, Bcl-2 či podporuje progresi buněčného cyklu prostřednictvím cyklinu D1. Fosfatázy mohou naopak zabránit aktivaci STAT3 (Nair, Tolentino, a Hazlehurst 2012). U CML je také zkoumána závislost mezi STAT3 a IFITM3 (Hrdinova et al. 2021).

#### 4.5 Proteomické studie exosomů z rezistentních CML buněk

V proteomické studii Hrdinova et al. bylo identifikováno 3218 proteinů v exosomech z K562 buněk (Hrdinova et al. 2021). Dále bylo zjištěno, že v rezistentních buňkách K562 a exosomech od nich odvozených je zvýšená hladina povrchových markerů CD146, CD36 a interferonem indukovaný transmembránový protein 3 (IFITM3) (Hrdinova et al. 2021). CD36 slouží jako povrchový receptor pro příjem mastných kyselin. CD36 se vyskytuje u buněk v blastické fázi CML a u leukemických kmenových buněk (LSC) vykazující vyšší oxidaci

mastných kyselin v myším modelu CML gonadální tukové tkáně. Gonadální tuková tkáň může podporovat růst leukemických buněk a rezistenci na léčiva (Ye et al. 2016). IFITM3 spouští antivirovou odpověď v buňce (Narayana et al. 2015). V primárním mozkovém nádoru TGF- $\beta$  spolu s IFITM3/STAT3 způsobí migraci nádorových buněk (H. Wang et al. 2020). Vliv IFITM3 na proliferaci a invazi byl potvrzen i u nádorových buněk žaludku, kde by mohl být ovlivněn matrixovou metaloproteinázou 9 (MMP9) (Hu et al. 2014). Role TGF- $\beta$ 1 a MMP9 byla zaznamenána i u CML (Zhu et al. 2011). Největší rozdíl v expresi byl ukázán u CD146, který může být použit jako identifikační marker pro rezistentní buňky K562 (Hrdinova et al. 2021). U rezistentních buněk obsahujících amplifikaci genu *BCR-ABL* byla dále ukázána zvýšená exprese BCR-ABL mRNA a proteinu BCR-ABL, což bylo prokázáno i v jejich exosomech (Hrdinova et al. 2021).

V proteomické studii Li et al. se 85 %, tedy přibližně 2300 exosomálních proteinů neliší u pacientů rezistentních a senzitivních na imatinib, z toho 62 exosomálních proteinů se nacházelo ve všech vzorcích imatinib rezistentní skupiny (Li et al. 2021). Díky bioinformatické analýze bylo nově identifikováno 234 exosomálních proteinů, tedy 8,82%, v porovnání s exosomálními databázemi Exocarta a Vesiclepedia (Li et al. 2021). U CML rezistentních pacientů byla v exosomech detekována zvýšená translace a biosyntéza peptidů, což souvisí se zvýšeným výskytem cytosolických proteinů, ribosomálních proteinů a ribozomálních podjednotek. Následně byl zjištěn snížený výskyt proteinů souvisejících s metabolismem lipidů, tedy skládáním a remodelací komplexů proteinlipidů, transportem lipidů a cholesterolu. U většiny vzorků byla výrazně zvýšena exprese ribosomálních proteinů 60S podjednotky RPL13 a RPL14 (Li et al. 2021). Výrazně zvýšená byla hladina enolázy 2 (ENO2) využívané při glykolýze (Li et al. 2021). Její zvýšená exprese u akutní lymfoblastické leukemie souvisí s relapsem a proliferací buněk (C.-C. Liu et al. 2018). Nedostatkem studie Li et al. je, že exosomy získané z plasmy nebyly tumor specifické, tedy mohly pocházet z různých buněk těla pacientů (Li et al. 2021). Dále je třeba brát v potaz, že kohorta pacientů byla o velikosti 18 pacientů, tedy příliš malá na prokázání a pocházely z jedné čínské nemocnice.

#### 4.6 miRNA a cirkulární RNA přenášené exosomy

MiRNA je nekódující jednořetězcová RNA o velikosti 21-25 párů bazí (He a Hannon 2004). V jádře pomocí enzymu ribonukleázy Drosha s endonukleázovou aktivitou vzniká pre-miRNA z primárního transkriptu pri-miRNA (Lee et al. 2003). Tato pre-miRNA je následně transportována do cytoplasmy, kde dochází k naštěpení druhou ribonukleázou, tentokrát Dicer (Lee et al. 2003). Produktem je vzájemně komplementární komplex miRNA. Jedna z miRNA,

mechanismus výběru dosud není přesně znám, se po interakci s RISC váže na 3'UTR, tedy na 3' konec mRNA netranslatované oblasti a touto vazbou potlačí translaci cílové mRNA (He a Hannon 2004).

Cirkulární RNA je nekódující RNA, která je transkribována z protein-kódující sekvence skládající se z exonů. Její vznik je dán tzv. procesem „backsplicing“, kdy dochází k vytvoření smyčky a následně cirkulární molekuly. Cirkulární RNA může ovlivnit spoustu dějů, např. regulaci genů na posttranskripční úrovni a má pozitivní i negativní vliv na funkci proteinů. Cirkulární RNA může být pozitivním i negativním regulátorem onemocnění. Často se cirkulární RNA u nádorových onemocnění využívá jako biomarker, protože je volně cirkulující v lidských tekutinách, např. v plazmě a moči. Takto cirkulovat mohou i exosomy přenášející cirkulární RNA a jsou též využitelné jako potenciální biomarkery (Kristensen et al. 2019).

#### 4.6.1 Cirkulární Hsa\_circ\_0058493

Cirkulární Hsa\_circ\_0058493 kódující exonem 4-5 genu *RHBDD1* je exosomálně i na buněčné úrovni zvýšena v rezistentních K562 buňkách. K této signifikantně zvýšené expresi dochází zejména v periferních krevních mononukleárních buňkách u pacientů rezistentních na imatinib bez mutace v kinázové doméně. Inhibice cirkulární Hsa\_circ\_0058493 spouští apoptózu leukemických buněk *in vitro*. MiR-548b-3p byla detekována jako potenciální inhibitor této cirkulární RNA snižující její expresi v rezistentních K562 buňkách (Zhong et al. 2021). Funkce této cirkulární RNA nebyla dosud dostatečně prozkoumána a jedná se o nový objev nejen u CML. V karcinomu jaterních buněk také dochází ke zvýšené expresi hsa\_circ\_0058493 související s jeho metastázami (A. Wu et al. 2021). Avšak pro objasnění její molekulární funkce u CML je třeba dalších studií.

#### 4.6.2 MiR-365

Podle studie Min et al. exosomy pocházející z imatinib rezistentních buněk K562 přenáší zvýšené množství miR-365 do imatinib senzitivních K562 buněk. Tím mohou snížit jejich apoptózu a senzitivitu na imatinib. V senzitivních K562 buňkách dojde po inkubaci s exosomy z rezistentních buněk ke zvýšení exprese miR-365, snížení exprese aktivované kaspázy 3 a proapoptického proteinu Bax. Rezistence zprostředkovaná miR-365 byla ověřena transfekcí imatinib senzitivních buněk linie K562 prekuzory pro miR-365. Následně byla změřena jejich chemosenzitivita či byl proveden western blot proapoptických proteinů (Min et al. 2018).

#### 4.6.3 MiR-21

Zvýšená hladina miR-21 byla identifikována v K562 i LAMA84 buněčných liniích. Úloha miR-21 spočívá v inhibici PTEN, který proto nemůže blokovat signální dráhu PI3K/Akt (Taverna et al. 2015). Po léčbě kurkuminem, přírodní látkou z rostliny *Curcuma longa*, dochází k přenosu miR-21 z K562 a LAMA84 buněk do jejich exosomů (Payton, Sandusky, a Alworth 2007; Taverna et al. 2015). Snížení miR-21 v leukemických buňkách a s tím související blokace PI3K/Akt (Taverna et al. 2015) by podle dosavadních studií mohlo indukovat apoptózu leukemických buněk (J. Liu et al. 2016).

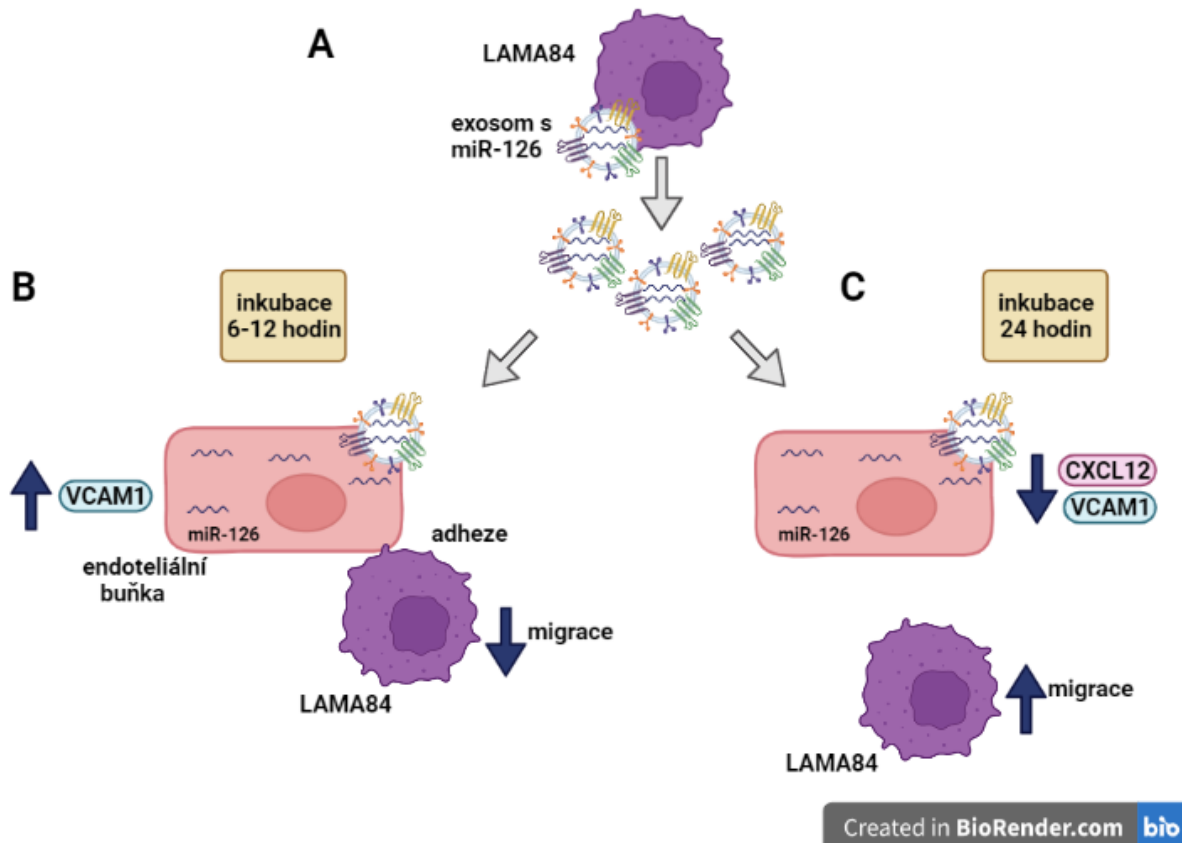
#### 4.6.4 MiR-126

Jedná se o miRNA přenášenou exosomy z buněčné linie LAMA84 do endoteliálních buněk odvozených z lidské pupečnickové žíly (HUVEC) (Obr. 4, strana 12) (Taverna et al. 2014). MiR-126 snižuje expresi VCAM1 a CXCL12 (Taverna et al. 2014). V HUVEC buňkách nejprve ošetřených exosomy z LAMA84 buněk po dobu 6 až 12 hodin se zvýšila exprese adhezni molekuly VCAM1. HUVEC byly následně inkubované s LAMA84 buňkami a došlo k jejich adhezi. V případě, že byly HUVEC buňky nejprve ošetřené LAMA84 exosomy po dobu 24 hodin a následně inkubovány s LAMA84 buňkami, došlo naopak k poklesu exprese VCAM1 a CXCL12 a snížení buněčné adheze a ke zvýšení migrace LAMA84 buněk (Taverna et al. 2014). Tento rozdíl v buněčné adhezi může být vysvětlen tím, že prvním krokem buněčné migrace je adheze a je proto nutné, aby nejdříve leukemické buňky adherovaly na endoteliální buňky a následně po 24 hodinách dochází k migraci leukemických buněk pravděpodobně tím, že miR-126 sníží expresi adhezních molekul (Taverna et al. 2014).

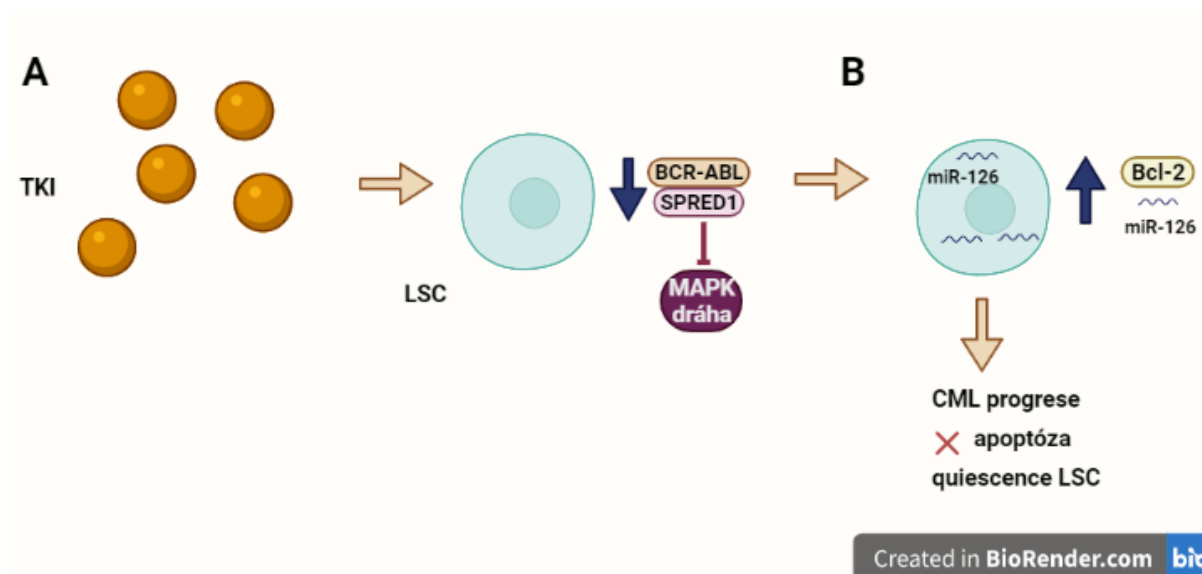
Odstranění chemokinu CXCL12 z endoteliálních buněk sníží množství LSC (Agarwal et al. 2019). V další studii byl popsán přenos miR-126 prostřednictvím exosomů z buněčné linie HUVEC do buněčné linie K562 a do LSC, což podporuje jejich quiescenci a přežívání (B. Zhang et al. 2018). Hladina miR-126 je u LSC snižena oproti HSC, což je způsobeno BCR-ABL kinázou, která aktivuje negativní regulátor SPRED1. Aktivovaný SPRED1 brání transportu miR-126 z jádra i jejímu zrání. Avšak léčba TKIs zvyšuje hladinu miR-126 a Bcl-2 u LSC a podporuje jejich přežívání a quiescenci (Obr. 5, strana 13). Následně dochází k progresi CML a nižšímu přežití myších CML modelů. (B. Zhang et al. 2018). V další studii bylo potvrzeno, že knockdown SPRED-1 v LSC, endoteliálních buňkách a LSC myšího modelu spouští formování buněčných kolonií, dochází k vytvoření blastů a nižšímu přežití myší následkem zvýšené exprese miR-126. Dochází k přechodu z chronické do akcelerované či blastické fáze onemocnění. V HSC buňkách pacientů v blastické fázi dochází ke snížení exprese

SPRED-1 a naopak zvýšení exprese miR-126 v porovnání s chronickou fází. Dále bylo prokázáno, že umlčení genu pro SPRED-1 v HSC a endoteliálních buňkách podporuje rezistenci na TKI a progresi CML (Qiao et al. 2022).

Delece miR-126 v LSC či v endoteliálních buňkách nebo nově navržený inhibitor CpG-miR-126i blokuje expresi miR-126 zvýší antileukemický efekt TKI léčby *in vivo* (B. Zhang et al. 2018).



Obr. 4 – Úloha miR-126 přenášená exosomy: LAMA84 buňky produkují exosomy s miR-126 (A), které jsou pohlceny endoteliálními buňkami a po inkubaci s exosomy po dobu 6 až 12 hodin se v endoteliálních buňkách zvýší VCAM1. Následkem toho dojde k adhezi LAMA84 k endoteliálním buňkám (B). Naopak inkubace exosomů z LAMA84 buněk s endoteliálními buňkami po dobu 24 hodin sníží expresi CXCL12 a VCAM1 v endoteliálních buňkách. Dochází k narušení adhezivní leukemických buněk a zvýší se jejich migrace (C). (Vytvořeno pomocí BioRender.com).



Obr. 5 – Vliv miR-126 na LSC: Působení TKI snižuje aktivitu BCR-ABL, což souvisí se snížením SPRED-1 a naopak aktivací MAPK dráhy (A). Inhibice SPRED-1 také souvisí se zvýšením exprese miR-126 a antiapoptického proteinu Bcl-2 (B). Ovlivnění LSC má za následek jejich quiescenci, progresi CML a snížení apoptózy. (Vytvořeno pomocí BioRender.com).

#### 4.6.5 MiR-320

Jedná se o rodinu tumor-supresivní miRNA, která pomáhá zastavit proliferaci leukemických buněk a způsobuje apoptózu *in vitro* i *in vivo* (Jurkovicova et al. 2015; Xishan et al. 2015; Gao et al. 2019). MiR-320 snižuje expresi BCR-ABL v K562 buňkách pomocí vazby na jeho 3'-UTR (Xishan et al. 2015; Gao et al. 2019) a zabraňuje fosforylaci a aktivaci PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B (Xishan et al. 2015). MiR-320 je snížena u krevních vzorků pacientů s atypickými transkripty BCR-ABL rezistentních na imatinib ve srovnání se senzitivní kontrolou (Jurkovicova et al. 2015) a také v LSC oproti MSC zdravých osob, což u CML pacientů souvisí s relapsem a nízkou mírou dožití (Xishan et al. 2015). U zdravých osob je v krvi prokázána nejnižší exprese miR-320 v porovnání s rezistentními a senzitivními pacienty s atypickými transkripty BCR-ABL (Jurkovicova et al. 2015).

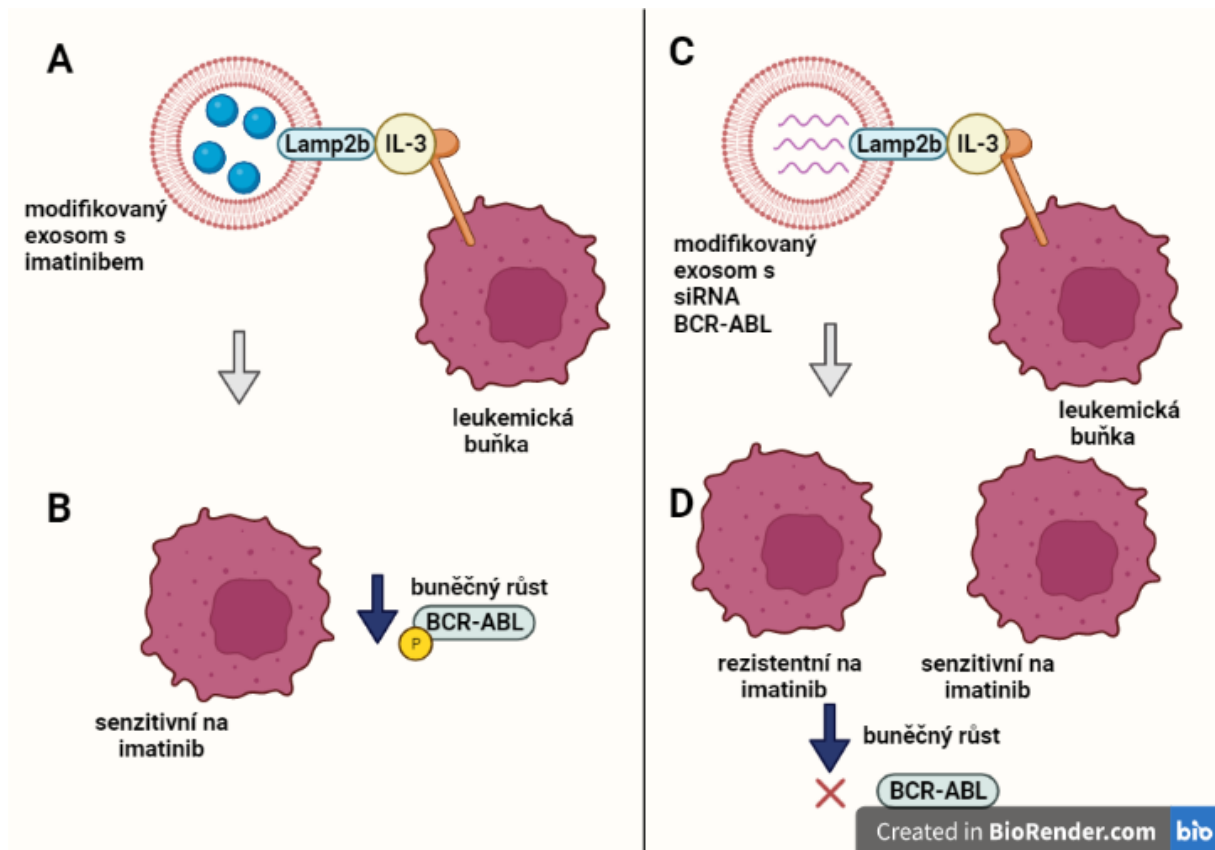
Bylo zjištěno, že množství miR-320 je zvýšené v exosomech z K562 buněk. Pomocí heterogenního jaderného ribonukleoproteinu A1 (HNRNPA1) leukemických buněk je selektivně transportována do exosomů a tím dochází ke snížení miR-320 v leukemických buňkách. Exosomy tedy ochrání leukemické buňky před vlivem miR-320 na snížení exprese BCR-ABL. V klinických vzorcích pacientů byla potvrzena zvýšená exprese miR-320 a HNRNPA1, avšak míra exprese se lišila dle stadia CML. V chronické fázi byla miR-320 intracelulárně zvýšena a exosomálně snížena v porovnání s blastickou fází onemocnění, kde tomu bylo naopak. HNRNPA1 byl signifikantně zvýšen v blastické fázi. (Gao et al. 2019).

#### 4.6.6 MiR-328

Snížená hladina miR-328 a její následná degradace v lysozomech byla identifikována ve dvou imatinib rezistentních buněčných liniích K562 (Dong et al. 2019). MiR-328 negativně ovlivňuje expresi člena 2 ze superrodiny G ATP vazebných transportérů (ABCG2) (Dong et al. 2019). Tento transportér je proto u imatinib rezistentních linií zvýšen na genové i proteinové úrovni, pomocí něj dochází k intracelulárnímu snížení imatinibu a poklesu apoptózy (Kosztyu et al. 2014; Dong et al. 2019). Dong et al. navrhli možný terapeutický cíl spočívající ve zvýšení exprese miR-328, respektive zabránění její lysozomální degradace, čímž dojde ke snížení exprese imatinib pumpujícího transportéru ABCG2 a zlepšení odpovědi na léčbu imatinibem. Tento účinek prokázaly exosomy získané z rakovinných buněk HEK293T transfekované miR-328 a poté alkalizované, které byly přidány k rezistentním K562 buňkám (Dong et al. 2019).

#### 4.7 Modifikované exosomy potlačující rezistenci CML buněk

Jako potenciální léčba byly využity modifikované exosomy z buněčné linie HEK293T lidských embryonálních ledvinových buněk obsahující SV40 T antigen (Bairoch 2018). Použití modifikovaných exosomů bylo založeno na zjištění, že exprese receptoru pro interleukin 3 (IL-3-R) je vyšší u LSC v porovnání s HSC (Nievergall et al. 2014). Modifikované exosomy na svém povrchu obsahují Lamp2b protein fúzovaný s fragmentem interleukinu 3 (IL-3), který se váže na IL-3-R u K562 a LAMA84 leukemických buněk (Obr. 6, strana 15). Interakce leukemických buněk a modifikovaných exosomů byla potvrzena i u CML rezistentních myši. Byly vytvořeny dva modely modifikovaných exosomů, v prvním modelu byly HEK293T buňky produkující modifikované exosomy léčeny imatinibem, který se díky tomu dostal do exosomů. Druhý model spočíval v transfekci siRNA pro BCR-ABL do HEK293T produkující modifikované exosomy. Exosomy z prvního modelu přenesly imatinib do leukemických buněk a významně snížily buněčný růst a fosforylaci BCR-ABL *in vitro*. Druhým způsobem modifikované exosomy transfekované siRNA cílenou proti BCR-ABL také potlačily buněčný růst, a navíc snížily hladinu BCR-ABL mRNA i BCR-ABL proteinu u imatinib senzitivních LAMA84 a K562 buněk, ale i u rezistentní K562 leukemické buněčné linie. Efekt exosomů obsahujících siRNA proti BCR-ABL byl ukázán také *in vivo*, kdy u myši obsahující imatinib rezistentní buňky došlo ke snížení růstu nádoru (Bellavia et al. 2017).



Obr. 6 – Interakce modifikovaných exosomů s imatinib senzitivními a rezistentními leukemickými buňkami a jejich vliv: Modifikované exosomy mají na svém povrchu Lamp2b fúzovaný s částí IL-3 a interagují přes IL-3-R receptor s leukemickou buňkou (A,C). Exosomy nabožené imatinibem snižují buněčný růst senzitivních buněk a fosforylaci BCL-ABL (B). Exosomy s siRNA BCR-ABL snižují buněčný růst rezistentních i senzitivních leukemických buněk a inhibují BCR-ABL (D). (Vytvořeno pomocí BioRender.com).

#### 4.8 Mesenchymální kmenové buňky a exosomy od nich odvozené

Mesenchymální kmenové buňky (MSC), také nazývané mesenchymální stromální buňky, jsou multipotentní kmenové buňky nacházející se v kostní dřeni. Regulují funkci hematopoetických kmenových buněk přes chemokin CXCL12 (Katayama et al. 2006). Chemokin CXCL12 produkovaný mesenchymálními kmenovými buňkami se váže na CXCR4 receptor CML buněk, což způsobí migraci leukemických buněk a jejich ochranu před buněčnou smrtí (Vianello et al. 2010). Inhibice receptoru CXCR4 podporuje léčbu imatinibem a apoptózu leukemických buněk. Dochází totiž k aktivaci kaspázy 3 (Vianello et al. 2010; Agarwal et al. 2019). Exosomy z CML buněk v závislosti na množství snižují hladinu CXCL12 v MSC kostní dřeni (Gao et al. 2019). Právě odstranění chemokinu CXCL12 z MSC může mít vliv na proliferaci a znovuoobnovení LSC (Agarwal et al. 2019).

Výsledky studie Zhang et al. ukazují, že exosomy produkované MSC z lidské kostní dřeni (BM-MS) přenášejí miR-15a, která je schopna zastavit buněčný cyklus v G0/G1 fázi,



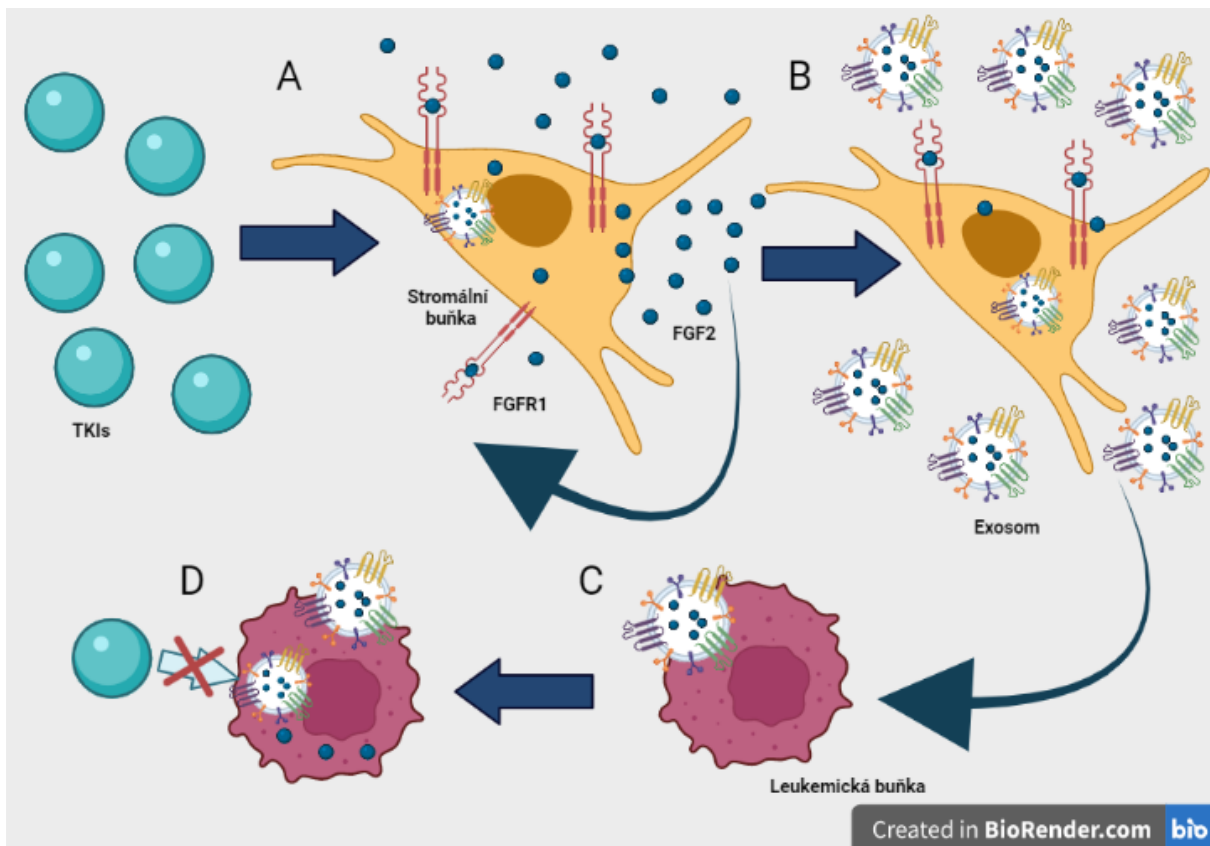
a tudíž zastavit proliferaci CML buněk *in vitro*. Naopak vysoká koncentrace exosomů, tedy 100 – 200 µg/ml, z BM-MSC v kombinaci s imatinibem zvýší proliferaci a sníží apoptózu CML buněk *in vitro* (X. Zhang et al. 2020). U CML buněk inkubovaných s BM-MSC exosomy společně s imatinibem dojde ke zvýšení exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2, snížení exprese kaspázy 3, ale exprese proapoptotického proteinu Bax se nezmění (X. Zhang et al. 2020). Vianello et al. dříve potvrdili zvýšenou expresi antiapoptotického proteinu Bcl-xl patřícího do rodiny proteinů Bcl-2 a ochranu leukemických buněk díky BM-MSC (Vianello et al. 2010). Výše uvedené funkce vedou k hypotéze, že exosomy z BM-MSC způsobují rezistenci na TKIs. Je však otázkou, za jakých okolností takto vysokou koncentraci exosomů BM-MSC uvolňují v lidském organismu. *In vivo* v modelové myši přítomnost exosomů z BM-MSC podpořila růst nádoru, snížila expresi kaspázy 3 a zvýšila expresi Bcl-2 (X. Zhang et al. 2020).

V jiné studii byly použity exosomy izolované z mezenchymálních stromálních buněk nacházejících se v krvi lidské pupečnickové šňůry (hUC-MSC) (Y. Liu et al. 2018). Za přítomnosti imatinibu exosomy z hUC-MSC na rozdíl od BM-MSC spouští apoptózu aktivací kaspázové signální dráhy, kdy dojde ke zvýšení množství aktivovaných kaspáz 3 a 9 a proteinu Bax, a naopak ke snížení exprese Bcl-2. Avšak bez přítomnosti imatinibu exosomy z hUC-MSC neovlivňují životaschopnost a apoptózu buněčné linie K562 (Y. Liu et al. 2018). Lze předpokládat, že by mohly být využité jako podpůrná léčba k imatinibu. Pomocí hUC-MSC dojde k fosforylaci p38 MAPK dráhy a inhibici proliferace leukemických buněk linie K562 (Tian et al. 2010). V této studii nebyla prověřena role imatinibu.

#### 4.8.1 Autokrinní FGF2-FGFR1 ovlivnění leukemických buněk

Podle studie Aguayo et al. je zvýšena hladina fibroblastického růstového faktoru (FGF2) v plazmě u pacientů s CML (Aguayo et al. 2000). Jedná se o faktor produkováný stromálními kmenovými buňkami a hematopoetickými buňkami, který je uložen do extracelulární matrix v kostní dřeni a hraje důležitou roli v hematopoéze (Allouche a Bikfalvi 1995). Exosomy obsahující FGF2 jsou pohlceny buňkami linie K562, které následkem toho lépe přežívají v prostředí s TKIs (Javidi-Sharifi et al. 2019). Pokud jsou pacienti léčeni TKIs, tak stromální buňky kostní dřene produkují více FGF2 (Javidi-Sharifi et al. 2019). Růst stromálních buněk kostní dřene, produkce FGF2 a sekrece exosomů jsou podpořeny autokrinní aktivací receptoru fibroblastického růstového faktoru (FGFR1) prostřednictvím vazby FGF2 (Obr. 7, strana 17). Inhibice FGFR1 receptoru na stromálních buňkách vedla ke snížení produkce exosomů (Javidi-Sharifi et al. 2019). V dřívější studii u pacientů rezistentních na imatinib byla ukázána zvýšená exprese FGF2 ve stromálních buňkách a hematopoetických progenitorech. Po léčbě

ponatinibem u pacientů bez mutace v tyrosin-kinázové doméně dojde ke snížení FGF2 na normální hodnotu v kostní dřeni (Traer et al. 2014).



Obr. 7 – Znárodnění autokrinní aktivace stromálních buněk kostní dřene pomocí FGF2. Léčba TKIs způsobí autokrinní ovlivnění stromálních buněk pomocí FGF2-FGFR1(A) a zvýšené uvolňování exosomů s FGF2 (B), které jsou pohlceny leukemickými buňkami (C). Následkem přenosu FGF2 dochází v leukemických buňkách k ochraně před TKIs (D). Pozn.: Poměry velikostí molekul nebyly zachovány z důvodu lepší ilustrace probíhajícího děje (Vytvořeno pomocí BioRender.com).

#### 4.8.2 Ovlivnění rezistence pomocí USP6- miR-146a-5p

Enzym ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza 6 (USP6) svou deubikvitinační aktivitou brání degradaci mitochondriálního enzymu glutaminázy 1 (GLS1) v imatinib rezistentních K562 buňkách. Zvýšená exprese USP6 vede ke snížení apoptózy spuštěné imatinibem a byla prokázána ve vzorcích pacientů rezistentních na imatinib. Enzym USP6, a tedy i exprese glutaminázy 1 mohou být negativně ovlivněny miR-146a-5p (Chen et al. 2022).

Expres miR-146a-5p je ve vzorcích z imatinib rezistentních pacientů snížena. Naopak exosomy z hUC-MSC po inkubaci s imatinib rezistentními K562 buňkami zvýší expresi miR-146-5p v rezistentních buňkách a v kombinaci s imatinibem spouští apoptózu. Tyto exosomy by mohly být využity k další studii a případné terapii (Chen et al. 2022).

Exosomy získané z MSC od dárců by mohly být využity pro potenciální léčbu pacienta s GvHD, která se vyskytuje po transplantaci i u CML pacientů (Kordelas et al. 2014). V této studii byl ze vzorků MSC exosomů čtyř potenciálních dárců vybrán ten, který obsahoval nejvíce transformujícího růstového faktoru (TGF- $\beta$ ), prozánětlivého cytokinu IFN- $\gamma$  a protizánětlivého cytokinu IL-10. Během terapie byla prokázána snížená prozánětlivá odpověď pacienta, zlepšení symptomů GvHD, a tedy sníženo množství steroidů. Přesto pacient zemřel po 7 měsících na zápal plic (Kordelas et al. 2014).

## 5 Vliv kostní dřeně, její remodelace a angiogeneze

Červená kostní dřeň je mikroprostředí nacházející se u dospělých osob v plochých kostech, zejména v obratlích, hrudní kosti, žebrech, lebce, kyčelních a ramenních kostech. Je tvořena hematopoetickými kmenovými buňkami (HSC) a jejich progenitory (erytrocyty, leukocyty a trombocyty), MSC, endoteliálními buňkami a osteoblasty (Yamaguchi et al. 2021). Toto mikroprostředí je důležité pro správnou hematopoezu. Při onemocnění, jako je chronická myeloidní leukemie, dochází k narušení kostní dřeně pomocí leukemických buněk, k jejímu následnému osidlování leukemickými buňkami, remodelaci a vytvoření prostředí podporujícího leukemické buňky. Během tohoto procesu jsou leukemické buňky přeměněny na leukemické kmenové buňky (LSC) a mohou proliferovat a znovu se obnovovat stejně jako HSC (Yamaguchi et al. 2021). Podpora leukemického mikroprostředí je také ovlivněna MSC, které komunikují přes CXCL12-CXCR-4 buněčný receptor s CML buňkami (Vianello et al. 2010). Mikroprostředí kostní dřeně prostřednictvím exosomů ovlivňuje angiogenezi a adhezi leukemických buněk (Taverna et al. 2012).

### 5.1 Vliv exosomů na angiogenezi

Angiogeneze má důležitou roli nejen u pevných nádorů, ale i u CML. V kostní dřeni dochází ke zvýšení počtu a formování zásobujících krevních cév. To má za následek progresi leukemických buněk a rozvoj leukemie. Dochází také ke zvýšení hladin angiogenních faktorů: vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), FGF2, dále tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) a hepatocytární růstový faktor (HGF) (Aguayo et al. 2000). Pokud bereme v úvahu fázi onemocnění, tak dochází k diferenciální expresi HGF při transformaci do blastické fáze, kdy se hladina HGF zvýší (Zhelyazkova et al. 2008). Důležitou roli v angiogenezi mají endoteliální buňky. Na jejich buněčné receptory se váží FGF2 a VEGF, ovlivňují tyrosin-kinázovou aktivitu a spouští signální dráhy: kinázy Src, malé GTPázy Ras, PI3K a fosfolipázy C (PLC) vedoucí k proliferaci a migraci těchto buněk (Cross a Claesson-Welsh 2001).

Exosomy uvolněné z leukemických buněk LAMA84 a patientských vzorků mají vliv na endoteliální buňky a dochází k angiogenezi *in vitro* i *in vivo* (Taverna et al. 2012). Stejný vliv exosomů byl potvrzen i v jiné studii zabývající se buněčnou linií K562 (Mineo et al. 2012). Exosomy z K562 buněk podporují angiogenezi aktivací Src dependentní dráhy (Mineo et al. 2012), která způsobí uvolnění prozánětlivého cytokinu IL-8 z endoteliálních buněk (Taverna et al. 2012). Bylo prokázáno, že exosomy spolu s IL-8 dále zvyšují expresi adhezních molekul, ICAM-1 a VCAM-1 v endoteliálních buňkách. Následkem toho endoteliální buňky interagují s leukemickými buňkami (Taverna et al. 2012). Po adhezi rakovinných buněk na endoteliální buňky dochází k narušení mezibuněčných spojů endoteliálních buněk, které má za následek zvýšenou permeabilitu endoteliální tkáně (Cai, Jiang, a Mansel 1999). K narušení mezibuněčných spojů endoteliálních buněk a změně v buněčné lokalizaci vaskulárního endoteliálního kadherinu (VE-kadherinu) a  $\beta$ -kateninu dochází u CML právě vlivem exosomů (Taverna et al. 2012).

Dalším faktorem podporujícím formování krevních cév endoteliálních buněk je zvýšená hladina miR-210 obsažená v exosomech, které byly získány z hypoxických K562 leukemických buněk (Tadokoro et al. 2013). MiR-210 přispívá k rozvoji angiogeneze inhibicí jejího negativního regulátoru tyrosin-kinázového ligandu EFNA-3 (Fasanaro et al. 2008; Tadokoro et al. 2013). Za hypoxických podmínek miR-210 ovlivní také angiogenní faktor VEGF a podporuje tak migraci endoteliálních buněk (Fasanaro et al. 2008). Tato migrace a angiogeneze může být ovlivněna i pomocí exosomů K562, které mají vliv na zvýšení VEGFR na genové úrovni u endoteliálních buněk. Jak již bylo popsáno výše, na tyto receptory se váží angiogenní faktory a dochází k stimulaci signálních drah jako např. PI3K/Akt (Taverna et al. 2016). Dalším faktorem pozitivně ovlivňující migraci HUVEC a angiogenezi u CML je miR-92a, která je transportována K562 exosomy (Umezu et al. 2013). V endoteliálních buňkách následně dochází ke snížení proangiogenního faktoru integrinu  $\alpha 5$  (Umezu et al. 2013). Snížení integrinu  $\alpha 5$  potvrzuje jiná studie, která se ale zabývala účinkem miR-92a jako negativního regulátoru angiogeneze na rozdíl od Umezu et al. Tyto odlišné negativní účinky miR-92a na angiogenezi lze vysvětlit tím, že byly prokázány na modelu ischemické myši po infarktu myokardu, tedy u angiogeneze neprobíhající u CML (Bonauer et al. 2009). MiR-92a-3p přenášená K562 exosomy nemá pouze angiogenní vliv u CML, ale také cílí na tukovou tkáň,

tedy dochází k ovlivnění adipogeneze mesenchymálních kmenových buněk a ke snížení váhy pacienta v pokročilých stádiích onemocnění CML (Wan et al. 2019).

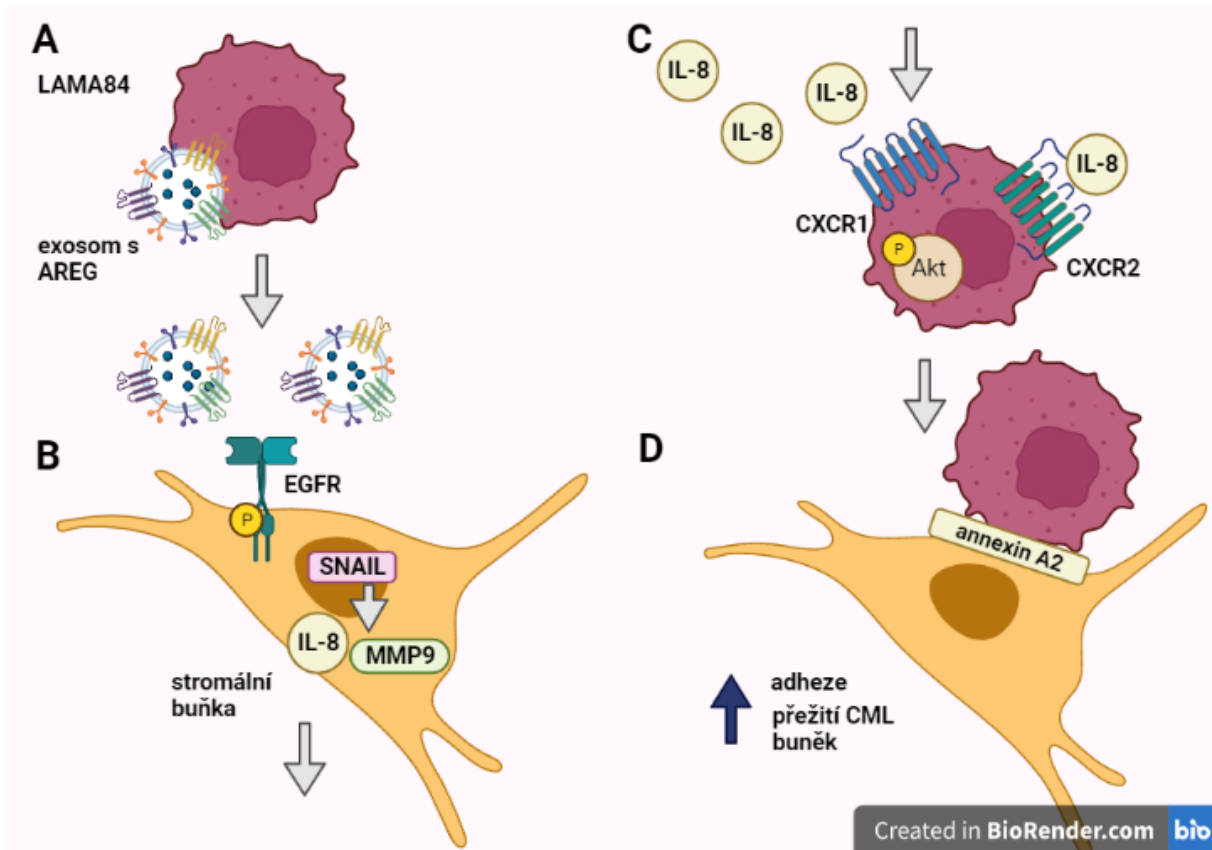
MiR-126 pomocí angiogenních faktorů FGF2 a VEGF podporuje aktivaci MAPK dráhy, fosforylaci ERK1/2 v endoteliálních buňkách a následnou angiogenezi. Dochází k tomu zejména inaktivací negativního regulátoru MAPK dráhy SPRED-1 (S. Wang et al. 2008). MiR-126 je přenášena exosomy pocházejících z leukemických buněk do endoteliálních buněk, které následně ovlivní (Taverna et al. 2014). Ovlivnění endoteliálních buněk pomocí SPRED-1 a miR-126 bylo potvrzeno i v jiné studii (Qiao et al. 2022).

Leukemické buňky ošetřené kurkuminem transportují miR-21 do exosomů, čímž dochází ke snížení exprese angiogenního faktoru VEGF v těchto buňkách (Taverna et al. 2015). Exosomy přenášejí miR-21 do endoteliálních buněk, kde následkem toho dochází ke snížení signálního proteinu RhoB (Taverna et al. 2016). Jedná se o Rho GTPázu, cílicí na dynamiku aktinového cytoskeletu a její inhibice vede v buňkách ke stabilizaci mezibuněčných kontaktů VE-kadherinu a k zastavení migrace endoteliálních buněk (Taverna et al. 2016; Pronk et al. 2017). Na pohyblivost endoteliálních buněk má také vliv myristoylovaný substrát C-kinázy bohatý na alanin (MARCKS). MARCKS byl signifikantně snížen pomocí miR-21 v exosomech pocházejících z buněk léčených kurkuminem v porovnání s kontrolními exosomy. Kurkumin oslabil schopnost exosomů podporovat angiogenezi potlačením uvolňováním IL-8 z endoteliálních buněk a snížením VCAM-1 v endoteliálních buňkách. Potenciální léčba kurkuminem má tedy inhibiční vliv jak na leukemické buňky, tak i na angiogenezi endoteliálních buněk (Taverna et al. 2016). Avšak tato hypotéza by měla být podpořena dalším výzkumem, zejména jaký vliv má tato přírodní látka na tyrosin-kinázové inhibitory, zda nedochází k jejich vzájemnému negativnímu ovlivnění.

## 5.2 Vliv exosomů na remodelaci kostní dřene

Exosomy z LAMA84 buněk aktivují EGFR signální dráhu ve stromálních buňkách, což má za následek zvýšenou adhezi LAMA84 buněk k HS-5 stromálním buňkám (Obr. 8, strana 21). K této adhezní funkci je nutný receptor endoteliálního růstového faktoru (EGFR) a jeho ligandy. Zejména zvýšená hladina ligandu AREG byla identifikována u exosomů z LAMA84 buněk. U třinácti nově diagnostikovaných pacientů byl AREG přítomný v buňkách i exosomech, avšak nebyl vždy zvýšený v porovnání s CD34+ buňkami. Stromální buňky jsou exosomálním ligandem AREG ovlivněny, dochází k interakci mezi AREG a EGFR receptorem stromálních buněk a dojde ke zvýšení exprese transkripčního faktoru SNAIL a jeho

transkripčních cílů IL-8 a MMP9. Dochází také ke zvýšení exprese annexinu A2 přispívajícího k adhezi leukemických buněk na stromální buňky (Corrado et al. 2016). IL-8 je uvolňovaný ze stromálních buněk působením exosomů a jeho vazbou na receptor CXCR1 a CXCR2 leukemických buněk ovlivní zvýšení jejich adheze, ale i migrace a indukuje fosforylaci Akt vedoucí k přežití (Waugh a Wilson 2008; Corrado et al. 2014).



Obr. 8—Exosomy z leukemických buněk podpoří adhezi CML buněk na stromální buňky v kostní dřeni a přežití leukemických buněk: LAMA84 buňky uvolní exosomy s AREG, který je ligandem pro EGFR na stromálních buňkách (A). Přes tento receptor dochází ke stimulaci stromálních buněk, aktivaci SNAIL, MMP9 a IL-8 (B). IL-8 je uvolněn a působí na LAMA84 buňky vazbou na jejich CXCR1 a CXCR2, což vede k fosforylaci Akt (C). To indukuje adhezi leukemických buněk ke stromálním buňkám a zvyšuje přežití CML buněk (D). (Vytvořeno pomocí BioRender.com)

Další úlohou exosomů je přenášet miR-320 z leukemických buněk do MSC kostní dřeni. Dochází k ovlivnění MSC, k potlačení osteogeneze *in vitro* i *in vivo*, ke změně mikroprostředí kostní dřeni a růstu leukemických buněk (Gao et al. 2019).

## 6 Růst nádoru a proliferace leukemických buněk

Při růstu nádoru, proliferaci a přežití leukemických buněk dochází ke spuštění antiapoptotických signálů pomocí LAMA84 exosomů. Tyto exosomy obsahují TGF- $\beta$ 1 a pomocí vazby na TGF- $\beta$ 1 receptor leukemických buněk autokrinně ovlivní aktivaci PI3K/Akt signální dráhy nezávislé na SMAD 2/3 (L. Zhang, Zhou, a Dijke 2013; Raimondo et al. 2015).

Při aktivaci této signální dráhy *in vivo* i *in vitro* následně dochází k fosforylaci Akt. Je také aktivována MAPK/ERK dráha a signální dráha spouštějící nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B). Dochází ke snížení apoptózy, a tedy ke zvýšené hladině Bcl-xl, survivinu a zvýšeně se exprimuje také Bcl-w. Exosomy naopak sníží expresi proapoptotických proteinů BAD, Bax a PUMA v leukemických buňkách (Raimondo et al. 2015). Vliv PI3K/Akt dráhy byl potvrzen i v hemangioblastech, tedy multipotentních kmenových buňkách, nově diagnostikovaných CML pacientů (Fang et al. 2004; Zhu et al. 2011). Avšak s tím rozdílem, že kromě aktivace PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B dochází i k aktivaci matrixové MMP9. MMP9 indukuje zvýšenou hladinu s-KitL a s-ICAM-1 na genové i proteinové úrovni. Podle Zhu et al. může solubilní mezibuněčná adhezivní molekula 1 (s-ICAM-1) bránit rozpoznávání nádorových buněk buňkami imunitního systému (Zhu et al. 2011).

## 7 Diskuze a závěr

V této bakalářské práci byly shrnuty dosud objevené funkce exosomů u CML, mezi které patří ovlivnění proliferace leukemických buněk, vznik rezistence na TKIs, změna adheze, remodelace kostní dřeně a angiogeneze.

Pro studium vlivu exosomů se nejčastěji používají modelové buněčné linie LAMA84 a K562 senzitivní a rezistentní na TKIs nejčastěji imatinib, případně se využívají patientské vzorky (Taverna et al. 2014; J. Liu et al. 2016; Hrdinova et al. 2021). TKIs znamenaly průlom v léčbě CML, protože inhibují specifickou fúzní kinázu BCR-ABL přítomnou pouze u CML buněk (B. J. Druker et al. 1996). Ovšem v průběhu léčby může dojít ke vzniku rezistence, na které se mohou podílet i exosomy. Exosomy z rezistentních buněk přenášejí proteiny, nukleové kyseliny, chemokiny do senzitivních buněk, u kterých následkem toho dojde ke vzniku rezistence či ke zlepšení přežívání (Min et al. 2018). Přenášené molekuly v cílových buňkách snižují proapoptotické proteiny kaspázu 3 a Bax a naopak zvyšují antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (Raimondo et al. 2015; J. Liu et al. 2016; B. Zhang et al. 2018; Min et al. 2018). Mezi tyto molekuly patří např. Hsa\_circ\_0058493 a miR-365, které jsou nabohaceny v exosomech i v rezistentních buňkách (Min et al. 2018; Zhong et al. 2021). Způsob, jakým tyto molekuly vyvolávají rezistenci je odlišný, respektive u Hsa\_circ\_0058493 není dosud znám (Zhong et al. 2021). Efekt přenosu exosomů z rezistentních K562 buněk na senzitivní K562 buňky byl studován i na úrovni proteinů a byly navrženy další molekuly, kterými exosomy přispívají k lepšímu přežívání senzitivních buněk v imatinibu. Mohlo by se jednat o přenos BCR-ABL mRNA, BCR-ABL proteinu či o přenos proteinů spojených s progresí rakoviny CD146, IFITM3 a CD36 (Hrdinova et al. 2021). Proteiny CD146, IFITM3 a CD36 by navíc mohly sloužit jako markery rezistence na imatinib (Hrdinova et al. 2021), nicméně ve vzorcích z imatinib rezistentních pacientů byly detekovány zvýšené hladiny ribosomálních proteinů (Li et al., 2021). Rozdíl ve výsledcích proteomických studií exosomů poukazuje na to, že buněčná linie nemůže plně odrážet komplexitu CML *in vivo*.

Exosomy jsou schopny ovlivňovat proliferaci i autokrinně prostřednictvím aktivace PI3K/Akt/mTOR signální dráhy ligandem TGF- $\beta$ 1 (Raimondo et al. 2015; J. Liu et al. 2016). Může být také podpořeno zvýšené uvolňování exosomů související s mTOR nezávislou dráhou (J. Liu et al. 2016). Navíc rezistence na TKIs a přežívání leukemických buněk v prostředí imatinibu může být také posíleno přímou interakcí mezi buňkami (Vianello et al. 2010) či exosomy z okolních buněk např. exosomy ze stromálních buněk kostní dřeně přenášejícími



FGF2 do leukemických buněk, které jsou následně ochráněny před TKIs (Javidi-Sharifi et al. 2019)

Mikroprostředí kostní dřeně a angiogeneze jsou dalším místem působení exosomů a i u exosomů izolovaných z patientských vzorků byl prokázán angiogenní efekt (Taverna et al. 2012). Je známo, že hypoxie podporuje angiogenezi, a proto není překvapující, že exosomy z hypoxických K562 buněk podporují formování krevních cév přenosem miR-210 (Tadokoro et al. 2013). Exosomy z leukemických buněk remodelují kostní dřeň tak, aby podporovala leukemické buňky na úkor zdravých buněk. Děje se tak např. přenosem tumor supresivní miR-320, která v MSC potlačí expresi genů účastnících se osteogeneze a hematopoézy (Gao et al. 2019). Exosomy z leukemických buněk přenášejí miR-92a, ovlivňují endoteliální buňky a dochází ke zvýšení exprese IL-8 a adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 a dále k aktivaci Src dráhy (Taverna et al. 2012; Mineo et al. 2012; Umezu et al. 2013; Tadokoro et al. 2013). Angiogeneze může být také podpořena exosomy z leukemických buněk přenášejícími miR-126 do endoteliálních buněk, což způsobí zvýšení angiogenních faktorů FGF2 a VEGF (S. Wang et al. 2008; Taverna et al. 2014).

Je tedy zřejmé, že exosomy hrají důležitou roli v komunikaci mezi leukemickými buňkami, ale i mezi odlišnými buněčnými typy a přispívají tak k rozvoji rezistence na TKIs a k modifikaci mikroprostředí kostní dřeně ve prospěch leukemických buněk.

Na druhou stranu je možné exosomy využít pro zasáhnutí těchto procesů a spuštění apoptózy leukemických buněk. Modifikované exosomy z HEK293T buněk přenášející imatinib či siRNA pro BCR-ABL byly testovány jako potenciální léčba CML (Bellavia et al. 2017). Exosomy z HEK293T buněk byly také využity k přenosu miR-328, která v cílových buňkách sníží expresi transportéru ABCG2 přenášejícího imatinib ven z buněk (Dong et al. 2019). Proapoptotický účinek na senzitivní i rezistentní leukemické mohou mít exosomy z hUC-MS (Y. Liu et al. 2018; Chen et al. 2022).

## 8 Seznam použité literatury

Agarwal, Puneet, Stephan Isringhausen, Hui Li, Andrew J. Paterson, Jianbo He, Álvaro Gomariz, Takashi Nagasawa, César Nombela-Arrieta, a Ravi Bhatia. 2019. „Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells". *Cell Stem Cell* 24 (5): 769-784.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.02.018>.

Aguayo, Alvaro, Hagop Kantarjian, Taghi Manshoury, Cristi Gidel, Elihu Estey, Deborah Thomas, Charles Koller, et al. 2000. „Angiogenesis in Acute and Chronic Leukemias and Myelodysplastic Syndromes". *Blood* 96 (6): 2240–45. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2240>.

Allouche, M., a A. Bikfalvi. 1995. „The Role of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in Hematopoiesis". *Progress in Growth Factor Research* 6 (1): 35–48. [https://doi.org/10.1016/0955-2235\(95\)00041-0](https://doi.org/10.1016/0955-2235(95)00041-0).

Baikie, A. G., W. M. Court-Brown, Karin E. Buckton, D. G. Harnden, Patricia A. Jacobs, a Ishbel M. Tough. 1960. „A Possible Specific Chromosome Abnormality in Human Chronic Myeloid Leukæmia". *Nature* 188 (4757): 1165–66. <https://doi.org/10.1038/1881165a0>.

Bairoch, Amos. 2018. „The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource". *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 29 (2): 25–38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>.

Bellavia, Daniele, Stefania Raimondo, Giovanna Calabrese, Stefano Forte, Marta Cristaldi, Agostina Patinella, Lorenzo Memeo, et al. 2017. „Interleukin 3- Receptor Targeted Exosomes Inhibit in Vitro and in Vivo Chronic Myelogenous Leukemia Cell Growth". *Theranostics* 7 (5): 1333–45. <https://doi.org/10.7150/thno.17092>.

\*Bergsagel, Daniel E. 1967. „The Chronic Leukemias". *Canadian Medical Association Journal* 96 (25): 1615–20.

\*Bertacchini, Jessika, Nazanin Heidari, Laura Mediani, Silvano Capitani, Mohammad Shahjahani, Ahmad Ahmadzadeh, a Najmaldin Saki. 2015. „Targeting PI3K/AKT/MTOR Network for Treatment of Leukemia". *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (12): 2337–47. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1867-5>.

Bhutra, Steven, Divya Lenkala, Bonnie LaCroix, Meng Ye, a R. Stephanie Huang. 2014. „Identifying and Validating a Combined mRNA and MicroRNA Signature in Response to Imatinib Treatment in a Chronic Myeloid Leukemia Cell Line". *PLOS ONE* 9 (12): e115003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115003>.

Bonauer, Angelika, Guillaume Carmona, Masayoshi Iwasaki, Marina Mione, Masamichi Koyanagi, Ariane Fischer, Jana Burchfield, et al. 2009. „MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice". *Science* 324 (5935): 1710–13. <https://doi.org/10.1126/science.1174381>.

Buchdunger, E., A. Matter, a B. J. Druker. 2001. „Bcr-Abl Inhibition as a Modality of CML Therapeutics". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1551 (1): M11-18.  
[https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(01\)00022-1](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(01)00022-1).

Cai, J., W. G. Jiang, a R. E. Mansel. 1999. „Phosphorylation and Disorganization of Vascular-Endothelial Cadherin in Interaction between Breast Cancer and Vascular Endothelial Cells". *International Journal of Molecular Medicine* 4 (2): 191–95.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.4.2.191>.

\*Cetin, Zafer, Eyup Ilker Saygili, a Mehmet Yilmaz. 2021. „Crosstalk between CML Cells with HUVECS and BMSCs through CML Derived Exosomes". *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 26 (3): 444–67. <https://doi.org/10.2741/4901>.

Corrado, Chiara, Stefania Raimondo, Laura Saieva, Anna Maria Flugy, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2014. „Exosome-Mediated Crosstalk between Chronic Myelogenous Leukemia Cells and Human Bone Marrow Stromal Cells Triggers an Interleukin 8-Dependent Survival of Leukemia Cells". *Cancer Letters* 348 (1–2): 71–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.009>.

Corrado, Chiara, Laura Saieva, Stefania Raimondo, Alessandra Santoro, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2016. „Chronic Myelogenous Leukaemia Exosomes Modulate Bone Marrow Microenvironment through Activation of Epidermal Growth Factor Receptor". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (10): 1829–39.  
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12873>.

Cortes, J.E., H. Kantarjian, N.P. Shah, D. Bixby, M.J. Mauro, I. Flinn, T. O'Hare, et al. 2012. „Ponatinib in Refractory Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias". *New England Journal of Medicine* 367 (22): 2075–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205127>.

Created with BioRender.com, dostupné na BioRender.com

\*Cross, Michael J, a Lena Claesson-Welsh. 2001. „FGF and VEGF Function in Angiogenesis: Signalling Pathways, Biological Responses and Therapeutic Inhibition". *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (4): 201–7. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X).

Dong, Yan, Yao Lin, Xiaotong Gao, Yingxin Zhao, Zhuo Wan, Haotian Wang, Mengying Wei, et al. 2019. „Targeted Blocking of MiR328 Lysosomal Degradation with Alkalized Exosomes Sensitizes the Chronic Leukemia Cells to Imatinib". *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (23–24): 9569–82. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10127-3>.

Druker, B. J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, a N. B. Lydon. 1996. „Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells". *Nature Medicine* 2 (5): 561–66.  
<https://doi.org/10.1038/nm0596-561>.

- Druker, Brian J., Stephen G. O'Brien, Jorge Cortes, a Jerald Radich. 2002. „Chronic Myelogenous Leukemia". *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 111–35. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2002.1.111>.
- Fader, Claudio, a Maria I. Colombo. 2006. „Multivesicular Bodies and Autophagy in Erythrocyte Maturation". *Autophagy* 2 (2): 122–25. <https://doi.org/10.4161/auto.2.2.2350>.
- Fang, Baijun, Lianming Liao, Mingxia Shi, Shaoguang Yang, a Robert Zhao. 2004. „Multipotency of Flk1+CD34- progenitors derived from human fetal bone marrow". *The Journal of laboratory and clinical medicine* 143 (4): 230–40. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2003.11.008>.
- Fasanaro, Pasquale, Yuri D'Alessandra, Valeria Di Stefano, Roberta Melchionna, Sveva Romani, Giulio Pompilio, Maurizio C. Capogrossi, a Fabio Martelli. 2008. „MicroRNA-210 Modulates Endothelial Cell Response to Hypoxia and Inhibits the Receptor Tyrosine Kinase Ligand Ephrin-A3". *The Journal of Biological Chemistry* 283 (23): 15878–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800731200>.
- Gao, Xiaotong, Zhuo Wan, Mengying Wei, Yan Dong, Yingxin Zhao, Xutao Chen, Zhelong Li, Weiwei Qin, Guodong Yang, a Li Liu. 2019. „Chronic Myelogenous Leukemia Cells Remodel the Bone Marrow Niche via Exosome-Mediated Transfer of MiR-320". *Theranostics* 9 (19): 5642–56. <https://doi.org/10.7150/thno.34813>.
- Gorre, M. E., M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, a C. L. Sawyers. 2001. „Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification". *Science (New York, N.Y.)* 293 (5531): 876–80. <https://doi.org/10.1126/science.1062538>.
- Harding, C., John Heuser, a P. Stahl. 1983. „Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes". *The Journal of Cell Biology* 97 (2): 329–39. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>.
- Harris, Tamia A., Munekazu Yamakuchi, Marcella Ferlito, Joshua T. Mendell, a Charles J. Lowenstein. 2008. „MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1516–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707493105>.
- \*He, Lin, a Gregory J. Hannon. 2004. „MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation". *Nature Reviews Genetics* 5 (7): 522–31. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>.
- Heisterkamp, N., K. Stam, J. Groffen, A. de Klein, a G. Grosveld. 1985. „Structural Organization of the Bcr Gene and Its Role in the Ph' Translocation". *Nature* 315 (6022): 758–61. <https://doi.org/10.1038/315758a0>.
- \*Hochhaus, Andreas, Massimo Breccia, Giuseppe Saglio, Valentín García-Gutiérrez, Delphine Réa, Jeroen Janssen, a Jane Apperley. 2020. „Expert opinion—management of

chronic myeloid leukemia after resistance to second-generation tyrosine kinase inhibitors". *Leukemia* 34 (6): 1495–1502. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0842-9>.

Hrdinova, Tereza, Ondrej Toman, Jiri Dresler, Jana Klimentova, Barbora Salovska, Petr Pajer, Oldrich Bartos, et al. 2021. „Exosomes Released by Imatinib- resistant K562 Cells Contain Specific Membrane Markers, IFITM3, CD146 and CD36 and Increase the Survival of Imatinib- sensitive Cells in the Presence of Imatinib". *International Journal of Oncology* 58 (2): 238–50. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5163>.

Hu, Jun, Shuwei Wang, Yan Zhao, Qin hao Guo, Dongsheng Zhang, Jiejing Chen, Juan Li, Qiang Fei, a Yueming Sun. 2014. „Mechanism and Biological Significance of the Overexpression of IFITM3 in Gastric Cancer". *Oncology Reports* 32 (6): 2648–56. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3522>.

Chen, Xiaowen, Yixin Chen, Min Zhang, Hui Cheng, Huirong Mai, Meng Yi, Huanli Xu, Xiuli Yuan, Sixi Liu, a Feiqiu Wen. 2022. „HucMSC Exosomes Promoted Imatinib-Induced Apoptosis in K562-R Cells via a MiR-145a-5p/USP6/GLS1 Axis". *Cell Death & Disease* 13 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04531-3>.

Iervolino, Angela, Giorgia Santilli, Rossana Trotta, Clara Guerzoni, Vincenzo Cesi, Anna Bergamaschi, Carlo Gambacorti-Passerini, Bruno Calabretta, a Danilo Perrotti. 2002. „hnRNP A1 Nucleocytoplasmic Shuttling Activity Is Required for Normal Myelopoiesis and BCR/ABL Leukemogenesis". *Molecular and Cellular Biology* 22 (7): 2255–66. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.7.2255-2266.2002>.

Jabbour, Elias, a Hagop Kantarjian. 2020. „Chronic Myeloid Leukemia: 2020 Update on Diagnosis, Therapy and Monitoring". *American Journal of Hematology* 95 (6): 691–709. <https://doi.org/10.1002/ajh.25792>.

Javidi-Sharifi, Nathalie, Jacqueline Martinez, Isabel English, Sunil K Joshi, Renata Scopim-Ribeiro, Shelton K Viola, David K Edwards V, et al. 2019. „FGF2-FGFR1 signaling regulates release of Leukemia-Protective exosomes from bone marrow stromal cells". Editoval Martin McMahon, Jeffrey Settleman, a Thomas O'Hare. *eLife* 8 (únor): e40033. <https://doi.org/10.7554/eLife.40033>.

Jurkovicova, D., R. Lukackova, M. Magyerkova, L. Kulcsar, M. Krivjanska, V. Krivjansky, a M. Chovanec. 2015. „MicroRNA Expression Profiling as Supportive Diagnostic and Therapy Prediction Tool in Chronic Myeloid Leukemia". *Neoplasma* 62 (6): 949–58. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2015\\_115](https://doi.org/10.4149/neo_2015_115).

Kang, Ka-Won, Jik-Han Jung, Woojune Hur, Jaena Park, Hyunku Shin, Byeonghyeon Choi, Hyesun Jeong, et al. 2018. „The Potential of Exosomes Derived from Chronic Myelogenous Leukaemia Cells as a Biomarker". *Anticancer Research* 38 (7): 3935–42. <https://doi.org/10.21873/anticanres.12679>.

Kantarjian, H. M., a M. Talpaz. 1988. „Definition of the Accelerated Phase of Chronic Myelogenous Leukemia". *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 6 (1): 180–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.1.180>.

Katayama, Yoshio, Michela Battista, Wei-Ming Kao, Andrés Hidalgo, Anna J. Peired, Steven A. Thomas, a Paul S. Frenette. 2006. „Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow". *Cell* 124 (2): 407–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.041>.

Kim, Nayoung, Mi Yeon Kim, Woo Seon Choi, Eunbi Yi, Hyo Jung Lee, a Hun Sik Kim. 2021. „GSK-3 $\alpha$  Inhibition in Drug-Resistant CML Cells Promotes Susceptibility to NK Cell-Mediated Lysis in an NKG2D- and NKP30-Dependent Manner". *Cancers* 13 (8): 1802. <https://doi.org/10.3390/cancers13081802>.

Kolba, Marta D., Wioleta Dudka, Monika Zaręba-Kozioł, Agata Kominek, Paolo Ronchi, Laura Turos, Piotr Chroszcicki, et al. 2019. „Tunneling Nanotube-Mediated Intercellular Vesicle and Protein Transfer in the Stroma-Provided Imatinib Resistance in Chronic Myeloid Leukemia Cells". *Cell Death & Disease* 10 (11): 817. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2045-8>.

Kordelas, L., V. Rebmann, A.-K. Ludwig, S. Radtke, J. Ruesing, T. R. Doeppner, M. Epple, P. A. Horn, D. W. Beelen, a B. Giebel. 2014. „MSC-Derived Exosomes: A Novel Tool to Treat Therapy-Refractory Graft-versus-Host Disease". *Leukemia* 28 (4): 970–73. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.41>.

Kosztyu, Petr, Romana Bukvova, Petr Dolezel, a Petr Mlejnek. 2014. „Resistance to Daunorubicin, Imatinib, or Nilotinib Depends on Expression Levels of ABCB1 and ABCG2 in Human Leukemia Cells". *Chemico-Biological Interactions* 219 (srpen): 203–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.009>.

\*Kristensen, Lasse S., Maria S. Andersen, Lotte V. W. Stagsted, Karoline K. Ebbesen, Thomas B. Hansen, a Jørgen Kjems. 2019. „The Biogenesis, Biology and Characterization of Circular RNAs". *Nature Reviews Genetics* 20 (11): 675–91. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>.

Lahaye, Tanja, Birte Riehm, Ute Berger, Peter Paschka, Martin C. Müller, Sebastian Kreil, Kirsten Merx, et al. 2005. „Response and Resistance in 300 Patients with BCR-ABL–Positive Leukemias Treated with Imatinib in a Single Center". *Cancer* 103 (8): 1659–69. <https://doi.org/10.1002/cncr.20922>.

Lee, Yoontae, Chiyoun Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, et al. 2003. „The Nuclear RNase III Drosha Initiates MicroRNA Processing". *Nature* 425 (6956): 415–19. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.

Lechman, Eric R., Bernhard Gentner, Stanley W. K. Ng, Erwin M. Schoof, Peter van Galen, James A. Kennedy, Silvia Nucera, et al. 2016. „MiR-126 Regulates Distinct Self-Renewal

Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells". *Cancer Cell* 29 (2): 214–28. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.011>.

Li, Mei-Yong, Cui Zhao, Lian Chen, Fang-Yi Yao, Fang-Min Zhong, Ying Chen, Shuai Xu, et al. 2021. „Quantitative Proteomic Analysis of Plasma Exosomes to Identify the Candidate Biomarker of Imatinib Resistance in Chronic Myeloid Leukemia Patients". *Frontiers in Oncology* 11 (prosinec): 779567. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.779567>.

\*Liang, Jiyong, a Joyce M. Slingerland. 2003. „Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression". *Cell Cycle* 2 (4): 336–42. <https://doi.org/10.4161/cc.2.4.433>.

Liu, Cheng-Cheng, Hua Wang, Wei-da Wang, Liang Wang, Wen-Jian Liu, Jing-Hua Wang, Qi-Rong Geng, a Yue Lu. 2018. „ENO2 Promotes Cell Proliferation, Glycolysis, and Glucocorticoid-Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia". *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 46 (4): 1525–35. <https://doi.org/10.1159/000489196>.

Liu, Juan, Yujing Zhang, Aichun Liu, Jinghua Wang, Lianqiao Li, Xi Chen, Xinyu Gao, Yanming Xue, Xiaomin Zhang, a Yao Liu. 2016. „Distinct Dasatinib-Induced Mechanisms of Apoptotic Response and Exosome Release in Imatinib-Resistant Human Chronic Myeloid Leukemia Cells". *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4): 531. <https://doi.org/10.3390/ijms17040531>.

Liu, Ying, Baoquan Song, Yimeng Wei, Fang Chen, Ying Chi, Huifang Fan, Na Liu, Zongjin Li, Zhongchao Han, a Fengxia Ma. 2018. „Exosomes from Mesenchymal Stromal Cells Enhance Imatinib-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells via Activation of Caspase Signaling Pathway". *Cytotherapy* 20 (2): 181–88. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.11.006>.

Mahon, F. X., M. W. Deininger, B. Schultheis, J. Chabrol, J. Reiffers, J. M. Goldman, a J. V. Melo. 2000. „Selection and Characterization of BCR-ABL Positive Cell Lines with Differential Sensitivity to the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571: Diverse Mechanisms of Resistance". *Blood* 96 (3): 1070–79. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.3.1070>.

Maru, Y., a O. N. Witte. 1991. „The BCR Gene Encodes a Novel Serine/Threonine Kinase Activity within a Single Exon". *Cell* 67 (3): 459–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90521-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90521-y).

\*Mashouri, Ladan, Hassan Yousefi, Amir Reza Aref, Ali Mohammad Ahadi, Fatemeh Molaie, a Suresh K. Alahari. 2019. „Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance". *Molecular Cancer* 18 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>.

Mathivanan, Suresh, Hong Ji, a Richard J. Simpson. 2010. „Exosomes: Extracellular Organelles Important in Intercellular Communication". *Journal of Proteomics, Current status*

of cancer proteomics, how far are we from clinical applications?, 73 (10): 1907–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.

Mears, Rainy, Rachel A. Craven, Sarah Hanrahan, Nick Totty, Carol Upton, Sarah L. Young, Poulam Patel, Peter J. Selby, a Rosamonde E. Banks. 2004. „Proteomic Analysis of Melanoma-Derived Exosomes by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry". *Proteomics* 4 (12): 4019–31. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400876>.

\*Meenakshi Sundaram, Daniel Nisakar, Xiaoyan Jiang, Joseph M. Brandwein, Juliana Valencia-Serna, K. C. Remant, a Hasan Uludağ. 2019. „Current Outlook on Drug Resistance in Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Potential Therapeutic Options". *Drug Discovery Today* 24 (7): 1355–69. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.007>.

Milojkovic, Dragana, a Jane Apperley. 2009. „Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia". *Clinical Cancer Research* 15 (24): 7519–27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1068>.

Min, Qing-Hua, Xiao-Zhong Wang, Jing Zhang, Qing-Gen Chen, Shu-Qi Li, Xiao-Qing Liu, Jing Li, et al. 2018. „Exosomes Derived from Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells Mediate a Horizontal Transfer of Drug-Resistant Trait by Delivering MiR-365". *Experimental Cell Research* 362 (2): 386–93. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.12.001>.

Mineo, Marco, Susan H. Garfield, Simona Taverna, Anna Flugy, Giacomo De Leo, Riccardo Alessandro, a Elise C. Kohn. 2012. „Exosomes Released by K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells Promote Angiogenesis in a Src-Dependent Fashion". *Angiogenesis* 15 (1): 33–45. <https://doi.org/10.1007/s10456-011-9241-1>.

Nagar, Bhushan, William G. Bornmann, Patricia Pellicena, Thomas Schindler, Darren R. Veach, W. Todd Miller, Bayard Clarkson, a John Kuriyan. 2002. „Crystal Structures of the Kinase Domain of C-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571)". *Cancer Research* 62 (15): 4236–43.

\*Nair, Rajesh R., Joel H. Tolentino, a Lori A. Hazlehurst. 2012. „Role of STAT3 in Transformation and Drug Resistance in CML". *Frontiers in Oncology* 2 (duben): 30. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00030>.

Naka, Kazuhito, Takayuki Hoshii, Teruyuki Muraguchi, Yuko Tadokoro, Takako Ooshio, Yukio Kondo, Shinji Nakao, Noboru Motoyama, a Atsushi Hirao. 2010. „TGF- $\beta$ -FOXO Signalling Maintains Leukaemia-Initiating Cells in Chronic Myeloid Leukaemia". *Nature* 463 (7281): 676–80. <https://doi.org/10.1038/nature08734>.

Narayana, Sumudu K., Karla J. Helbig, Erin M. McCartney, Nicholas S. Eyre, Rowena A. Bull, Auda Eltahla, Andrew R. Lloyd, a Michael R. Beard. 2015. „The Interferon-Induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry". *The Journal of Biological Chemistry* 290 (43): 25946–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657346>.



- Nieborowska-Skorska, Margaret, Piotr K. Kopinski, Regina Ray, Grazyna Hoser, Danielle Ngaba, Sylwia Flis, Kimberly Cramer, et al. 2012. „Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors". *Blood* 119 (18): 4253–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-385658>.
- Nievergall, Eva, Hayley S. Ramshaw, Agnes S. M. Yong, Mark Biondo, Samantha J. Busfield, Gino Vairo, Angel F. Lopez, Timothy P. Hughes, Deborah L. White, a Devendra K. Hiwase. 2014. „Monoclonal Antibody Targeting of IL-3 Receptor  $\alpha$  with CSL362 Effectively Depletes CML Progenitor and Stem Cells". *Blood* 123 (8): 1218–28. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475194>.
- \*Pando, Alejandro, John L. Reagan, Peter Quesenberry, a Loren D. Fast. 2018. „Extracellular Vesicles in Leukemia". *Leukemia Research* 64 (leden): 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.11.011>.
- Payton, Florastina, Peter Sandusky, a William L. Alworth. 2007. „NMR Study of the Solution Structure of Curcumin". *Journal of Natural Products* 70 (2): 143–46. <https://doi.org/10.1021/np060263s>.
- Pisitkun, Trairak, Rong-Fong Shen, a Mark A. Knepper. 2004. „Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13368–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>.
- Pronk, Manon C. A., Jan S. M. van Bezu, Geerten P. van Nieuw Amerongen, Victor W. M. van Hinsbergh, a Peter L. Hordijk. 2017. „RhoA, RhoB and RhoC differentially regulate endothelial barrier function". *Small GTPases* 10 (6): 466–84. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1339767>.
- Qiao, Junjing, Chen Liang, Dandan Zhao, Le Xuan Truong Nguyen, Fang Chen, Shanshan Suo, Dinh Hoa Hoang, et al. 2022. „Spred1 Deficit Promotes Treatment Resistance and Transformation of Chronic Phase CML". *Leukemia* 36 (2): 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01423-x>.
- Raimondo, Stefania, Laura Saieva, Chiara Corrado, Simona Fontana, Anna Flugy, Aroldo Rizzo, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2015. „Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism". *Cell Communication and Signaling* 13 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0086-x>.
- \*Ren, Ruibao. 2005. „Mechanisms of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia". *Nature Reviews. Cancer* 5 (3): 172–83. <https://doi.org/10.1038/nrc1567>.
- Sahu, Ranjit, Susmita Kaushik, Cristina C. Clement, Elvira S. Cannizzo, Brian Scharf, Antonia Follenzi, Ilaria Potolicchio, Edward Nieves, Ana Maria Cuervo, a Laura Santambrogio. 2011. „Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes". *Developmental cell* 20 (1): 131–39. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.

\*Saußebe, S., a Richard T. Silver. 2015. „Management of Chronic Myeloid Leukemia in Blast Crisis". *Annals of Hematology* 94 (2): 159–65. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2324-0>.

Savina, Ariel, Marcelo Furlán, Michel Vidal, a Maria I. Colombo. 2003. „Exosome Release Is Regulated by a Calcium-Dependent Mechanism in K562 Cells \*". *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 20083–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301642200>.

Schageman, Jeffrey, Emily Zeringer, Mu Li, Tim Barta, Kristi Lea, Jian Gu, Susan Magdaleno, Robert Setterquist, a Alexander V. Vlassov. 2013. „The Complete Exosome Workflow Solution: From Isolation to Characterization of RNA Cargo". *BioMed Research International* 2013: 253957. <https://doi.org/10.1155/2013/253957>.

Schindler, T., W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson, a J. Kuriyan. 2000. „Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase". *Science* 289 (5486): 1938–42. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1938>.

Schrödinger. b.r. *The PyMOL Molecular Graphics System* (verze 4.6). LLC.

Singh, Priyanka, Veerandra Kumar, Sonu Kumar Gupta, Gudia Kumari, a Malkhey Verma. 2021. „Combating TKI Resistance in CML by Inhibiting the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Combination with TKIs: A Review". *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 38 (1): 10. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01462-5>.

Tadokoro, Hiroko, Tomohiro Umezu, Kazuma Ohyashiki, Toshihiko Hirano, a Junko H. Ohyashiki. 2013. „Exosomes Derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells". *The Journal of Biological Chemistry* 288 (48): 34343–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480822>.

Taverna, Simona, Valeria Amodeo, Laura Saieva, Antonio Russo, Marco Giallombardo, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2014. „Exosomal Shuttling of MiR-126 in Endothelial Cells Modulates Adhesive and Migratory Abilities of Chronic Myelogenous Leukemia Cells". *Molecular Cancer* 13 (červenec): 169. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-169>.

Taverna, Simona, Anna Flugy, Laura Saieva, Elise C Kohn, Alessandra Santoro, Serena Meraviglia, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2012. „Role of Exosomes Released by Chronic Myelogenous Leukemia Cells in Angiogenesis". *International Journal of Cancer* 130 (9): 2033–43. <https://doi.org/10.1002/ijc.26217>.

Taverna, Simona, Simona Fontana, Francesca Monteleone, Marzia Pucci, Laura Saieva, Viviana De Caro, Valeria Giunta Cardinale, et al. 2016. „Curcumin Modulates Chronic Myelogenous Leukemia Exosomes Composition and Affects Angiogenic Phenotype via Exosomal MiR-21". *Oncotarget* 7 (21): 30420–39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8483>.

Taverna, Simona, Marco Giallombardo, Marzia Pucci, Anna Flugy, Mauro Manno, Samuele Raccosta, Christian Rolfo, Giacomo De Leo, a Riccardo Alessandro. 2015. „Curcumin Inhibits in Vitro and in Vivo Chronic Myelogenous Leukemia Cells Growth: A Possible Role

for Exosomal Disposal of MiR-21". *Oncotarget* 6 (26): 21918–33.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4204>.

Tian, Kun, Shaoguang Yang, Qian Ren, Zhibo Han, Shihong Lu, Fengxia Ma, Lei Zhang, a Zhongchao Han. 2010. „P38 MAPK Contributes to the Growth Inhibition of Leukemic Tumor Cells Mediated by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells". *Cellular Physiology and Biochemistry* 26 (6): 799–808. <https://doi.org/10.1159/000323973>.

Traer, Elie, Nathalie Javidi-Sharifi, Anupriya Agarwal, Jennifer Dunlap, Isabel English, Jacqueline Martinez, Jeffrey W. Tyner, Melissa Wong, a Brian J. Druker. 2014. „Ponatinib overcomes FGF2-mediated resistance in CML patients without kinase domain mutations". *Blood* 123 (10): 1516–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-518381>.

Umezu, T., K. Ohyashiki, M. Kuroda, a J. H. Ohyashiki. 2013. „Leukemia Cell to Endothelial Cell Communication via Exosomal MiRNAs". *Oncogene* 32 (22): 2747–55.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.295>.

Vianello, Fabrizio, Federica Villanova, Veronica Tisato, Stefania Lymperi, Ka-Kei Ho, Ana R. Gomes, David Marin, et al. 2010. „Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Non-Selectively Protect Chronic Myeloid Leukemia Cells from Imatinib-Induced Apoptosis via the CXCR4/CXCL12 Axis". *Haematologica* 95 (7): 1081–89.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2009.017178>.

Wan, Zhuo, Xutao Chen, Xiaotong Gao, Yan Dong, Yingxin Zhao, Mengying Wei, Wen Fan, Guodong Yang, a Li Liu. 2019. „Chronic Myeloid Leukemia-Derived Exosomes Attenuate Adipogenesis of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells via Transporting MiR-92a-3p". *Journal of Cellular Physiology* 234 (11): 21274–83. <https://doi.org/10.1002/jcp.28732>.

Wang, Hongliang, Feng Tang, Erbao Bian, Yile Zhang, Xinghu Ji, Zhihao Yang, a Bing Zhao. 2020. „IFITM3/STAT3 Axis Promotes Glioma Cells Invasion and Is Modulated by TGF- $\beta$ ". *Molecular Biology Reports* 47 (1): 433–41. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05146-2>.

Wang, Shusheng, Arin B. Aurora, Brett A. Johnson, Xiaoxia Qi, John McAnally, Joseph A. Hill, James A. Richardson, Rhonda Bassel-Duby, a Eric N. Olson. 2008. „An Endothelial-specific microRNA Governs Vascular Integrity and Angiogenesis". *Developmental cell* 15 (2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.002>.

Waugh, David J.J., a Catherine Wilson. 2008. „The Interleukin-8 Pathway in Cancer". *Clinical Cancer Research* 14 (21): 6735–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>.

Wu, Anqi, Yuhao Hu, Yao Xu, Jing Xu, Xinyue Wang, Aiting Cai, Ruoyu Liu, Lin Chen, a Feng Wang. 2021. „Methyltransferase-Like 3-Mediated m6A Methylation of Hsa\_circ\_0058493 Accelerates Hepatocellular Carcinoma Progression by Binding to YTH Domain-Containing Protein 1". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.762588>.

- Wu, S. Q., K. V. Voelkerding, L. Sabatini, X. R. Chen, J. Huang, a L. F. Meisner. 1995. „Extensive Amplification of Bcr/Abl Fusion Genes Clustered on Three Marker Chromosomes in Human Leukemic Cell Line K-562". *Leukemia* 9 (5): 858–62.
- Xishan, Zhu, Lin Ziyang, Du Jing, a Liu Gang. 2015. „MicroRNA-320a acts as a tumor suppressor by targeting BCR/ABL oncogene in chronic myeloid leukemia". *Scientific Reports* 5 (červenec): 12460. <https://doi.org/10.1038/srep12460>.
- \*Yamaguchi, Takanori, Eiji Kawamoto, Arong Gaowa, Eun Jeong Park, a Motomu Shimaoka. 2021. „Remodeling of Bone Marrow Niches and Roles of Exosomes in Leukemia". *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 1881. <https://doi.org/10.3390/ijms22041881>.
- \*Yang, Ke, a Li-wu Fu. 2015. „Mechanisms of Resistance to BCR–ABL TKIs and the Therapeutic Strategies: A Review". *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 93 (3): 277–92. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.001>.
- Ye, Haobin, Biniam Adane, Nabilah Khan, Timothy Sullivan, Mohammad Minhajuddin, Maura Gasparetto, Brett Stevens, et al. 2016. „Leukemic stem cells evade chemotherapy by metabolic adaptation to an adipose tissue niche". *Cell stem cell* 19 (1): 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.001>.
- Zhang, Bin, Le Xuan Truong Nguyen, Ling Li, Dandan Zhao, Bijender Kumar, Herman Wu, Allen Lin, et al. 2018. „Bone Marrow Niche Trafficking of MiR-126 Controls the Self-Renewal of Leukemia Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia". *Nature Medicine* 24 (4): 450–62. <https://doi.org/10.1038/nm.4499>.
- \*Zhang, Long, Fangfang Zhou, a Peter ten Dijke. 2013. „Signaling Interplay between Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor and PI3K/AKT Pathways in Cancer". *Trends in Biochemical Sciences* 38 (12): 612–20. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.001>.
- Zhang, Xiaoyan, Yazhi Yang, Yang Yang, Huijun Chen, Huaijun Tu, a Jian Li. 2020. „Exosomes from Bone Marrow Microenvironment-Derived Mesenchymal Stem Cells Affect CML Cells Growth and Promote Drug Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors". *Stem Cells International* 2020: 8890201. <https://doi.org/10.1155/2020/8890201>.
- Zhelyazkova, A. G., A. B. Tonchev, P. Kolova, L. Ivanova, a L. Gercheva. 2008. „Prognostic Significance of Hepatocyte Growth Factor and Microvessel Bone Marrow Density in Patients with Chronic Myeloid Leukaemia". *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 68 (6): 492–500. <https://doi.org/10.1080/00365510701854991>.
- Zhong, An-Ni, Yi Yin, Bing-Jie Tang, Lei Chen, Hong-Wei Shen, Zhi-Ping Tan, Wen-Qun Li, et al. 2021. „CircRNA Microarray Profiling Reveals hsa\_circ\_0058493 as a Novel Biomarker for Imatinib-Resistant CML". *Frontiers in Pharmacology* 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.728916>.

Zhou, Ting, L. Jeffrey Medeiros, a Shimin Hu. 2018. „Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1". *Current Hematologic Malignancy Reports* 13 (6): 435–45. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>.

Zhu, Xishan, Liang Wang, Bin Zhang, Jing Li, Xiaowei Dou, a Robert Chunhua Zhao. 2011. „TGF-Beta1-Induced PI3K/Akt/NF-KappaB/MMP9 Signalling Pathway Is Activated in Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myeloid Leukaemia Hemangioblasts". *Journal of Biochemistry* 149 (4): 405–14. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr016>.

\* review