Daniel Diniz de Carvalho

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *SH3BGRL2*,
D53, *PRAME*, *DAP12* E *CALCINEURINA A BETA*
POR BCR-ABL E CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS
DESSA REGULAÇÃO NA LMC**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências (Imunologia).**

**Orientador: Prof. Dr. João Gustavo P.
Amarante-Mendes**

Área de concentração: Imunologia

**São Paulo
2009**

RESUMO

CARVALHO, D. D. **Regulação da expressão de *SH3BGRL2*, *D53*, *PRAME*, *DAP12* e *CALCINEURINA A BETA* por BCR-ABL e consequências biológicas dessa regulação na LMC.** 139 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sabe-se que TRAIL, um membro da família do TNF- α e ligante dos receptores de morte, é capaz de matar células tumorais de forma seletiva. Sabe-se também que TRAIL tem sua expressão reduzida em diversos tumores, incluindo-se leucemias positivas para o BCR-ABL. Apesar da literatura estar repleta de informações acerca dos mecanismos moleculares da morte celular mediada por TRAIL, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pela inibição de TRAIL em tumores. Tendo em vista que a expressão de TRAIL pode ser regulada pelo Ácido Retinóico; que PRAME é capaz de inibir a via do ácido retinóico através da proteína EZH2, um membro da família dos polycombs; e que nós observamos anteriormente que a expressão de TRAIL esta inversamente correlacionada com a expressão de BCR-ABL em pacientes com LMC, nós decidimos investigar a associação entre PRAME, EZH2 e TRAIL em leucemia positiva para o BCR-ABL. Nós demonstramos que PRAME, mas não EZH2, tem sua expressão aumentada em células que apresentam o BCR-ABL e sua expressão está associada com a progressão da LMC. Além disto, existe uma correlação positiva entre PRAME e BCR-ABL e uma correlação negativa entre PRAME e TRAIL nestes pacientes. Após inibir a expressão de PRAME ou EZH2 por shRNA em células positivas para o BCR-ABL, foi possível observar um aumento da expressão de TRAIL. Estes dados revelam um novo mecanismo de regulação responsável por diminuir a expressão de TRAIL, e geram novos possíveis alvos para a terapia da LMC e, possivelmente, também para outros tumores.

Palavras-chave: BCR-ABL; PRAME; Leucemia Mielóide Crônica; Câncer.

ABSTRACT

CARVALHO, D. D. **BCR-ABL-mediated regulation of *SH3BGRL2*, *D53*, *PRAME*, *DAP12* e *Calcineurin A beta* and biological consequences of this regulation on CML.** 139 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TRAIL, a member of the TNF- α family and a death receptor ligand, was shown to selectively kill tumor cells. Not surprisingly, TRAIL is down-regulated in a variety of tumor cells, including BCR-ABL-positive leukemia. Although the literature is filled with information about the molecular basis of TRAIL-mediated cell killing, the mechanism responsible for TRAIL inhibition in tumors remains elusive. Because *TRAIL* can be regulated by retinoic acid; *PRAME* was shown to inhibit transcription of retinoic acid receptor target genes through the polycomb protein *EZH2*; and we have found that *TRAIL* is inversely correlated with *BCR-ABL* in CML patients, we decided to investigate the association of *PRAME*, *EZH2* and *TRAIL* in BCR-ABL-positive leukemia. Here, we demonstrate that *PRAME*, but not *EZH2*, is up-regulated in BCR-ABL cells and is associated with the progression of disease in CML patients. In addition, there is a positive correlation between *PRAME* and *BCR-ABL* and an inverse correlation between *PRAME* and *TRAIL* in these patients. Importantly, knocking down of *PRAME* or *EZH2* by RNA interference in a BCR-ABL-positive cell line restores *TRAIL* expression. Our data reveal a novel regulatory mechanism responsible for lowering *TRAIL* expression and provide the basis of alternative targets for combined therapeutic strategies for CML.

Key words: BCR-ABL; *PRAME*; Chronic Myeloid Leukemia; Cancer.

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa resultante de uma expansão clonal de células tronco hematopoiéticas transformadas. A LMC é uma desordem bifásica ou trifásica, onde a fase crônica inicial é caracterizada por uma expansão massiva de precursores mielóides e células maduras que saem da medula óssea prematuramente, porém ainda possuem capacidade de diferenciação normal, a duração média desta fase é de 3 a 4 anos. Na fase acelerada ocorre acentuação da leucocitose, elevação do número de basófilos no sangue periférico e a terapia utilizada começa a não fazer mais efeito. A aquisição de alterações genéticas e/ou epigenéticas causa a progressão até a fase blástica, uma fase aguda e geralmente fatal. Esta fase caracteriza-se por um bloqueio da diferenciação celular que culmina na presença de 20%, ou mais, células blásticas mielóides ou linfóides na medula óssea, podendo, ainda, apresentar um infiltrado extramedular de células blásticas (REN, 2005; SAWYERS, 2004). A incidência da LMC é de dois casos por 100.000 pessoas por ano, representando aproximadamente 15% de todas as leucemias em adultos, sendo que aproximadamente 85% dos pacientes estão na fase crônica no momento do diagnóstico (FADERL *et al.*, 1999).

A anormalidade genética marcante na LMC é uma translocação cromossômica t(9;22) (q34;q11) que funde o gene *BCR* (breakpoint cluster region), localizado no cromossomo 22 ao gene *ABL* (Abelson leukemia virus), do cromossomo 9, produzindo o cromossomo Filadélfia (Ph). Essa translocação gera o gene *BCR-ABL*, que codifica uma proteína quimérica com alta atividade tirosina quinase (PANE *et al.*, 2002).

O cromossomo Ph está presente em aproximadamente 95% dos pacientes com LMC, além de ser encontrado em 15 a 30% dos pacientes com leucemia linfocítica aguda (LLA) e em aproximadamente 2% dos pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) (KALIDAS *et al.*, 2001).

Dependendo do ponto onde o gene *BCR* é quebrado, podem se formar três principais isoformas de proteínas BCR-ABL (MELO, 1996). Essas proteínas podem variar de tamanho (190 kDa, 210kDa e 230 kDa) em função do comprimento da porção N-terminal codificada pelo segmento *BCR*, sendo que o tamanho parece correlacionar-se com o fenótipo e agressividade da doença. Na maioria dos pacientes com LMC a proteína se encontra sob a forma de 210 kDa, enquanto que em pacientes com LLA, o BCR-ABL apresenta-se com 190 kDa, e 230 kDa, no caso da leucemia neutrofílica crônica. Ainda nesse contexto, a proteína de 190 kDa parece apresentar sua atividade tirosina-quinase aumentada em relação à proteína de 210 kDa e 230kDa (MCLAUGHLIN *et al.*, 1987; SAWYERS, 1999).

Em contraste à proteína c-ABL, a BCR-ABL exibe sua atividade tirosina-quinase constitutivamente desregulada e é encontrada exclusivamente no citoplasma da célula (BEN-NERIAH *et al.*, 1986), sendo estas duas características essenciais para a indução da transformação das células na LMC. Vários domínios funcionais têm sido identificados na proteína BCR-ABL que podem contribuir para essa transformação. Na porção ABL esses domínios são o SH1 (domínio responsável pela atividade tirosina-quinase), o SH2 (domínio que se liga à resíduos de fosfotirosina e medeia a interação com outras SRC-quinases e substratos celulares), SH3 (domínio que se liga à seqüências ricas em prolina e são potencialmente inibitórios da atividade quinase) e o domínio de ligação a actina. Na porção BCR, o domínio de homo-oligomerização *coiled-coil*, é o responsável pela ativação do domínio tirosina-quinase do ABL; a tirosina na posição 177 (sítio de ligação ao GRB-2) e a seqüência rica em serina e treonina fosforilados (sítio de ligação ao SH2) são os principais domínios (DEININGER *et al.*, 2000).

A expressão de *BCR-ABL* em células hematopoéticas induz a inibição de apoptose (BEDI *et al.*, 1994), sinalização mitótica constitutivamente ativa (PUIL *et al.*, 1994), adesão alterada às células estromais e à matriz extracelular (GORDON *et al.*, 1987) e degradação de proteínas inibitórias do ABL (DAI *et al.*, 1998). Diversas evidências sugerem que a supressão da apoptose constitui um importante mecanismo pelo qual o BCR-ABL leva à expansão das células mielóides. Dentre estas, a consequência primária da inibição da atividade tirosina quinase em células transformadas pelo *BCR-ABL* é a indução da apoptose (DRUKER *et al.*, 1996;

GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997); em células hematopoiéticas dependentes de fatores de crescimento, a indução de *BCR-ABL* induz a proliferação e sobrevivência destas células após a retirada destes fatores e a subsequente inibição deste gene nestas células induz a apoptose (BEDI *et al.*, 1994); outros estudos demonstram que células que apresentam BCR-ABL são extremamente resistentes à vários estímulos apoptóticos e se tornam sensibilizadas à estes estímulos após a inibição do BCR-ABL (MCGAHON *et al.*, 1994). É importante ressaltar que experimentos usando células primárias têm demonstrado que as células progenitoras apresentam uma resposta proliferativa normal aos fatores de crescimento e não apresentam um potencial proliferativo maior do que progenitores normais (EMANUEL *et al.*, 1991). Além do mais, na ausência de soro e de fatores de crescimento nem os progenitores normais nem os da LMC proliferam, porém os últimos são capazes de manter uma alta viabilidade (BEDI *et al.*, 1994). Assim, estas observações ressaltam a importância da inibição da apoptose mediada por BCR-ABL na expansão de células mielóides, progressão tumoral e resistência à terapia citotóxica na LMC.

Dentre as vias de sinalização alteradas pelo BCR-ABL, algumas aparentemente são cruciais para o aumento da resistência à apoptose, principalmente as vias de RAS (SAWYERS *et al.*, 1995), PI3K/AKT (SKORSKI *et al.*, 1997), JAK/STAT (CARLESSO *et al.*, 1996; ILARIA e VAN ETEN, 1996; SHUAI *et al.*, 1996) e NFkB que estão ativadas e PP2A que esta inibida (NEVIANI *et al.*, 2005). As conseqüências funcionais da desregulação destas vias são as alterações nas atividades e padrões de expressão gênica de moléculas importantes na sobrevivência celular.

Os fatores de transcrição conhecidos como STAT têm sido bastante estudados nas leucemias. Esta família de fatores de transcrição participa de diversos processos, incluindo crescimento celular, diferenciação, apoptose e resposta imune. A ligação de algumas citocinas ou fatores de crescimento aos seus respectivos receptores resultam em uma série de eventos de sinalização que resultam na fosforilação de STAT, dimerização e conseqüente translocação para o núcleo. Alguns genes alvos de STAT são os genes anti-apoptóticos *BCL-xL* e *MCL-1* (STERNBERG e GILLILAND, 2004). Linhagens celulares *BCR-ABL* positivas apresentam uma constitutiva fosforilação e ativação de STAT1 e STAT5. A ativação de STAT5 induz um aumento

da expressão de *PIM-1*, *A1* e *BCL-xL* (GESBERT e GRIFFIN, 2000; HORITA *et al.*, 2000; NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 2002).

A importância da ativação do fator de transcrição NFkB na transformação induzida por BCR-ABL permanece controversa, nas quais, alguns trabalhos mostraram que células hematopoiéticas expressando *BCR-ABL* apresentaram uma maior atividade de ligação ao DNA da subunidade p65 (RelA) do NFkB (HAMDANE *et al.*, 1997). Porém, quando foi utilizada uma forma mutante do Ikb, que não pode ser fosforilada e, portanto, inibe de forma constitutiva o NFkB; foi observado que a ativação deste fator de transcrição não é necessária para a proteção da apoptose, mediada por BCR-ABL, após a retirada de fatores de crescimento ou após a exposição a agentes que causam dano ao DNA. Por outro lado, a atividade do NFkB é necessária para que células hematopoiéticas transformadas com o *BCR-ABL* formem tumores em camundongos *nude* e para a transformação de células primárias da medula óssea (REUTHER *et al.*, 1998).

A via de sinalização do RAS encontra-se constitutivamente ativada em células expressando BCR-ABL e a inibição desta via diminui a capacidade do BCR-ABL de transformar células da medula óssea murina (SAWYERS *et al.*, 1995). Como explicado anteriormente, a proteína BCR-ABL apresenta um sítio de ligação ao GRB-2, esta proteína adaptadora é capaz de se associar ao SOS, que forma uma plataforma para o recrutamento de RAS, permitindo a troca do GDP por um GTP e, conseqüentemente, ativando-o (PENDERGAST *et al.*, 1993; PUILL *et al.*, 1994). Esta constante ativação de RAS induz a uma maior expressão de *MCL-1* em células primárias de pacientes com LMC, enquanto que a inibição de *MCL-1* induz uma menor sobrevivência de células K562, que expressam o *BCR-ABL* de forma constitutiva, tanto resistente quanto sensível ao Imatinibe, produzindo efeitos sinérgicos com este fármaco (AICHBERGER *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que a proteína serina/treonina fosfatase PP2A, um supressor de tumor, está funcionalmente inativada na crise blástica devido ao aumento da transcrição de SET, um inibidor de PP2A, mediada por BCR-ABL (NEVIANI *et al.*, 2005). Esta inativação permite a hiperfosforilação e, conseqüentemente, inativação dos substratos pró-apoptóticos de PP2A, como o BAD. Além disto, a hiperfosforilação de algumas quinases como AKT e ERK leva a uma

prolongada ativação destas proteínas, induzindo a sinalização de vias de sobrevivência e proliferação. A reativação de PP2A em células BCR-ABL positivas promove a desfosforilação destes fatores, suprimindo a proliferação e induzindo apoptose.

Por fim, sabe-se que o BCR-ABL é capaz de ativar a via de sinalização PI3K/AKT (SKORSKI *et al.*, 1997), sendo que a inibição farmacológica desta via, em células *BCR-ABL* positivas, com Wortmannin, leva à uma menor formação de colônia (SKORSKI *et al.*, 1995). Não se sabe precisamente como o BCR-ABL ativa a PI3K e, conseqüentemente, fosforila o AKT. Aparentemente, a tirosina 177 do BCR-ABL tem um papel central nesta ativação, por recrutar o complexo GRB2/GAB2 e fosforilar GAB2, que se transforma em um sítio de ligação para o domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K (SATTLER *et al.*, 2002). O AKT ativado irá fosforilar e, assim, regular a atividade de diversos substratos, promovendo o aumento da sobrevivência. Entre os substratos de AKT encontram-se: BAD, caspase-9, MDM2, mTOR, FoxO1, FoxO3a e FoxO4 (BURGERING e MEDEMA, 2003; CARDONE *et al.*, 1998; DATTA *et al.*, 1997; MAYO e DONNER, 2001).

A fosforilação, mediada pelo AKT, dos fatores de transcrição da família FoxO regula a sua localização celular, pois após a fosforilação eles migram do núcleo para o citoplasma, tornando-se, assim, inativos. Os fatores desta família regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação, reparo de danos no DNA, controle do ciclo celular, metabolismo da glicose e apoptose (ACCILI e ARDEN, 2004; TRAN *et al.*, 2002). Entre os genes alvos, encontram-se os genes que codificam as proteínas pró-apoptóticas: *FasL*, *p27^{Kip1}*, *BIM* e *TRAIL* (DIJKERS *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002).

A proteína TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* ou Apo2L) foi primeiramente descrita em 1995, como sendo uma proteína capaz de induzir apoptose de forma bastante rápida e recebeu este nome devido a sua alta homologia com outros membros da família do TNF e devido à sua semelhança com o FasL (Apo1L) (PITTI *et al.*, 1996; WILEY *et al.*, 1995). O TRAIL é uma proteína transmembrânica com um domínio N-terminal citoplasmático curto e um domínio C-terminal extracelular longo, com capacidade de se ligar aos seus receptores. A ligação do TRAIL aos receptores TRAIL-R1 (DR4) ou TRAIL-R2 (DR5) resulta na

trimerização do receptor, o que permite a ligação do FADD (Fas-Associated via Death Domain), uma proteína adaptadora, e na formação do DISC (*death-inducing signalling complex*). A proteína FADD tem dois domínios funcionais, um domínio C-terminal que interage com os DR4 ou DR5 e um domínio N-terminal, que é capaz de recrutar as pró-caspases 8 e 10 para o DISC, onde estas caspases são ativadas, permitindo a transmissão do sinal de apoptose (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007). Após a caspase 8 ser ativada no DISC, ela terá dois substratos preferenciais, a caspase 3 e BID, a ativação da primeira levará diretamente à cascata da caspase, levando à apoptose, enquanto que a clivagem de BID irá ativar a via intrínseca de apoptose (Figura 1).

Intrigantemente a cascata de sinalização intracelular induzida por TRAIL não leva somente a ativação das caspases efetoras e, conseqüentemente, à inicialização da apoptose, mas pode também induzir outras vias de sinalização, como por exemplo a ativação de NF- κ B, AKT e MAPKs (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007). Apesar de todo o conhecimento dos mecanismos moleculares da indução de apoptose por TRAIL, pouco se sabe sobre sua atividade na diferenciação e proliferação celular.

O TRAIL tem demonstrado duas funções importantes na defesa contra tumores. Primeiro, esta proteína é capaz de induzir apoptose seletivamente em células tumorais, enquanto que células normais são altamente insensíveis (ASHKENAZI *et al.*, 1999; WALCZAK *et al.*, 1999; WANG e EL-DEIRY, 2003); por fim, o TRAIL é crítico na vigilância imunológica contra o desenvolvimento de tumores (TAKEDA *et al.*, 2002; TAKEDA *et al.*, 2001; TAKEDA *et al.*, 2004), sendo necessário para a atividade das células T contra os tumores (SCHMALTZ *et al.*, 2002). Isso se reflete nos camundongos TRAIL^{-/-}, que apresentam maior susceptibilidade à iniciação tumoral e à metástase (CRETNEY *et al.*, 2002; SEDGER *et al.*, 2002).

Figura 1: Vias de sinalização ativadas pela ligação de TRAIL com seus receptores. (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

Somente recentemente começou-se a ter um conhecimento mais aprofundado, ao nível molecular, da regulação transcricional do *TRAIL*. Diferentes trabalhos têm demonstrado um aumento do mRNA deste gene por ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001) e por citocinas, como os interferons (α , β e γ) (CHEN *et al.*, 2001; FANGER *et al.*, 1999; KAYAGAKI *et al.*, 1999) e o TNF (SIEGMUND *et al.*, 2001). Muito destes estudos têm identificado seqüências no promotor de TRAIL que são necessárias na regulação por estes indutores, dentre os fatores de transcrição identificados, importantes para a regulação da expressão deste gene, podemos citar o ISGF-3 (*INF-stimulated gene-factor 3*) (SATO *et al.*, 2001), NFκB, FOXO3a (FKHRL1), FKHR (GHAFARI *et al.*, 2003; MODUR *et al.*, 2002) e EGR-2 e EGR-3 (DROIN *et al.*, 2003).

Tendo em vista a capacidade de TRAIL induzir apoptose seletivamente em células tumorais (ASHKENAZI *et al.*, 1999; WALCZAK *et al.*, 1999; WANG e EL-DEIRY, 2003), ele se tornou uma potencial molécula para o tratamento do câncer, utilizando-se TRAIL recombinante, assim como tem se buscado alvos terapêuticos na

sua via de sinalização, utilizando-se por exemplo anticorpos monoclonais capazes de ativar DR4 ou DR5 (ASHKENAZI *et al.*, 1999; CHUNTHARAPAI *et al.*, 2001).

Devido à alta resistência das células *BCR-ABL*⁺ à apoptose, o transplante de medula óssea tem sido o único tratamento definitivo para a LMC. Porém, a maioria dos pacientes não estão aptos a receber este tratamento, seja devido à idade avançada ou em função da ausência de um doador HLA-compatível (GOLDMAN e DRUKER, 2001). A descoberta que o BCR-ABL é necessário na patogenia da LMC e que sua atividade tirosina-quinase é importante na transformação celular fez com que a ABL quinase se tornasse um alvo interessante para a intervenção terapêutica (DEININGER, 2004). Assim, foi desenvolvido o Mesilato de Imatinibe (Glivec ou STI571), um derivado de 2-fenilaminapirimidina, que apresenta grande especificidade pela tirosina-quinase ABL (DRUKER *et al.*, 1996) e que inibe competitivamente e em concentrações micro molares a ligação do ATP com o domínio quinase de ABL (MAHON *et al.*, 2000). Dessa forma, a atividade enzimática da proteína BCR-ABL é suprimida, levando a morte da célula leucêmica por diminuir sua resistência à apoptose. Esse fármaco tem demonstrado ser capaz de induzir a apoptose seletivamente em células *BCR-ABL*⁺ e tem obtido sucesso no tratamento de pacientes com LMC (OHNO, 2006).

Apesar das altas taxas de resposta hematológica e citogenética, tem sido observado, em um crescente número de pacientes com LMC, a resistência ao Mesilato de Imatinibe, principalmente em pacientes nos estágios mais avançados da doença. Os dois principais mecanismos de resistência são o aumento da expressão de *BCR-ABL* devido, principalmente, a uma amplificação gênica e, mais freqüentemente, à aquisição ou seleção de mutações pontuais específicas em várias regiões críticas do *BCR-ABL* (GORRE e SAWYERS, 2002; HOCHHAUS *et al.*, 2002; SOVERINI *et al.*, 2004).

Entretanto, algumas linhagens celulares apresentam resistência ao Imatinibe sem apresentar uma maior expressão de *BCR-ABL* ou mutações nesta proteína. De fato, 10 a 50% dos pacientes com LMC, que apresentam resistência secundária ao Imatinibe, não apresentam mutações detectáveis no *BCR-ABL*, sugerindo, neste processo de resistência, o envolvimento de outros mecanismos, que não estão sobre controle direto da atividade de tirosina-quinase de BCR-ABL (MAHON *et al.*, 2000).

Assim, enquanto o Imatinibe e as novas gerações de inibidores têm melhorado o tratamento da LMC, um entendimento detalhado das vias de sinalização que são ativadas pelo BCR-ABL, tanto dependentes quanto independentes de sua atividade tirosina-quinase, é necessário para uma compreensão detalhada da leucemia induzida pelo BCR-ABL. Essa informação poderá ser utilizada em novas estratégias terapêuticas que poderão ser aplicadas independentemente ou combinado com inibidores de atividade tirosina-quinase para o tratamento da LMC. Isto tem estimulado alguns grupos, entre os quais o nosso, a utilizarem uma abordagem genômica, como técnicas de DNA *Microarray*, para detectar a expressão diferencial de alguns genes que possivelmente estejam envolvidos neste processo de transformação maligna e resistência ao Imatinibe.

Em trabalhos prévios no nosso laboratório, ainda não publicados, foram estabelecidas três linhagens celulares transfectadas com o oncogene *BCR-ABL*, as quais expressam, de forma constitutiva, a proteína BCR-ABL: HL60.BCR-ABL, HeLa.BCR-ABL e SKW.6.4.BCR-ABL. A expressão gênica global dessas células foi comparada com suas respectivas contrapartes, transfectadas apenas com o vetor vazio, a saber, HL60, HeLa e SKW6.4. Para obtenção da expressão gênica utilizou-se a técnica de hibridização em DNA *Microarrays*, realizado com *CodeLink™ Bioarray Chips* (GE Health Care), compostos por oligonucleotídeos representando cerca de 20.000 genes humanos distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (Human Unigene, NCBI). Os dados extraídos de cada *Microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutiva, presentes nos chips como controles internos (*GAPDH* e β *ACTINA*), e os genes expressos diferencialmente nas células *BCR-ABL*⁺ em relação às negativas foram identificados pelas razões dos valores de intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras teste e controle, pelo programa *CodeLink Expression v.2.3* (GE Health Care).

Desse modo, a análise de expressão gênica diferencial, detectou 465 genes cuja expressão está aumentada em células HL60.BCR-ABL e HeLa.BCR-ABL. Além disso, 70 genes apresentaram expressão diminuída, sendo que a maioria apresentou uma alteração discreta (Figura 2). Não foram selecionados genes diferencialmente expressos em SKW6.4.BCR-ABL, pois nesta linhagem a presença do BCR-ABL não

produziu um fenótipo de resistência à apoptose. Dentre os genes selecionados que apresentaram uma maior variação e cuja função parece ser importante na patogenia das leucemias *BCR-ABL*⁺ encontram-se os genes que codificam as proteínas SH3BGR2 (*SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2*); TPD52L1 (*tumor protein D52-like 1*), também conhecida como D53; PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*); DAP12, também conhecido como TYROBP (*tyro protein tyrosine kinase binding protein*) e CALCINEURINA A BETA. Os três primeiros apresentaram uma expressão aumentada e os dois últimos apresentaram uma expressão diminuída.

Figura 2: Número de genes que são modulados pela expressão de BCR-ABL nas células HL60, HeLa e SKW.6.4.

O gene que codifica a proteína SH3BGR2 está localizado no cromossomo 6, na região 6q13-15, uma região associada com a diminuição da heterogeneidade em várias formas de tumores sólidos como câncer de próstata (ROKMAN *et al.*, 2001), carcinomas hepatocelulares (SAKAKURA *et al.*, 1999) e câncer de mama (RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Essa proteína se localiza principalmente no núcleo e na região perinuclear, possui uma região rica em prolina que apresenta um domínio SH3 e, através de bioinformática, é classificada como pertencente à superfamília de proteínas “Thioredoxin-like” que agrupa um grande número de proteínas com atividade de oxirredução, sugerindo que a proteína SH3BGR2 possa estar envolvida

no controle de processos celulares dependentes de oxirredução (MAZZOCCO *et al.*, 2002). Dentre os processos regulados por essa família de proteínas podemos citar: defesa ao estresse oxidativo, proliferação celular, transdução de sinais e regulação da transcrição (ARNER e HOLMGREN, 2000; KONTOU *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 1997).

O gene que codifica a proteína D53 também está localizado no cromossomo 6, na região 6q22-23 (BYRNE *et al.*, 1996). Esta proteína apresenta grande homologia com os membros da família D52 (D52, D53 e D54), incluindo um domínio *coiled-coil* o que indica interação proteína-proteína. Esta família de proteínas está envolvida na transdução de sinal mediada por cálcio e na proliferação celular (BYRNE *et al.*, 1998). Sabe-se que o gene *D53* está presente em um “*cluster*” de genes implicados na divisão celular, morte celular e segregação de cromossomos, e que a sua regulação é dependente da fase do ciclo celular, sendo seu pico de expressão na transição de G2-M (BOUTROS e BYRNE, 2005). Entretanto, foi recentemente demonstrado que a indução da expressão de *D53* em linhagem celular 3T3, não induz aumento da proliferação ou capacidade de crescimento independente de ancoragem, enquanto a expressão ectópica de *D52* é capaz de induzir estes fenótipos. Da mesma forma, a redução da expressão de *D52* em células SK-BR-3 é capaz de induzir apoptose, enquanto a redução de *D53*, não (SHEHATA *et al.*, 2008).

O gene que codifica a proteína DAP12 está localizado no cromossomo 19, na região 19q13.1. Essa proteína está associada à ativação de células natural killer (NK), já que vários receptores de ativação de NK dependentes de DAP12 têm sido identificados (LANIER, 2005; TOMASELLO e VIVIER, 2005). Além disso, as células NK exercem importante papel na resposta imune anti-leucêmica na LMC, pois apresentam atividade citotóxica somente contra as células progenitoras leucêmicas (LIM e COLEMAN, 1997). Finalmente, sabe-se que células NK quando transfectadas com o *BCR-ABL* têm sua atividade citotóxica reduzida, porém não se sabe quais os mecanismos moleculares envolvidos (CHIOREAN *et al.*, 2003).

O gene que codifica a proteína CALCINEURINA A BETA está localizado no cromossomo 10, na região 10q21-22. Sabe-se que esta molécula apresenta funções pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, dependendo do contexto celular (ASADA *et al.*, 1998; JAYARAMAN e MARKS, 2000; LOTEM *et al.*, 1999; TOMBAL *et al.*, 2000;

WANG *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1995). Porém não se sabe o comportamento desta molécula em células que apresentam o BCR-ABL.

O gene que codifica a proteína PRAME foi inicialmente descrito em um paciente que apresentava um quadro de melanoma recorrente, sendo encontrado um antígeno capaz de iniciar uma resposta imune citotóxica mediada por linfócitos T autólogos, a esse antígeno foi dado o nome de PRAME (*PReferentially expressed Antigen of MElanoma*) (IKEDA *et al.*, 1997). Em trabalhos subseqüentes, ao se analisar o perfil de expressão gênica em diferentes estágios da progressão do melanoma, foi demonstrado que o *PRAME* é expresso em melanomas primários, porém não é expresso em tecidos de pele saudável ou em lesões melanocíticas benignas. Sugerindo que a expressão de *PRAME* é um evento da transformação do melanócito (HAQQ *et al.*, 2005).

Em seguida, foi demonstrado que o *PRAME* é freqüentemente expresso em diferentes tumores e sua expressão se correlaciona com o prognóstico e a sobrevida dos pacientes. Sabe-se que este gene é expresso em carcinomas de pulmão; mama; renal; tumores de cabeça e pescoço; linfomas de Hodgkin's; sarcomas; tumores de Wilm e meduloblastoma (BEER *et al.*, 2002; BOON *et al.*, 2003; IKEDA *et al.*, 1997; NEUMANN *et al.*, 1998; WILLENBROCK *et al.*, 2006). Além de ser expresso em leucemias, como nas fases aguda e crônica das leucemias mielocíticas e linfocíticas; leucemia linfoblástica aguda; leucemia mielóide aguda e, aparentemente, ocorre um aumento durante a progressão da leucemia mielóide crônica (GREINER *et al.*, 2004; PAYDAS *et al.*, 2005; RADICH *et al.*, 2006; STEINBACH *et al.*, 2002a; STEINBACH *et al.*, 2002b; VAN BAREN *et al.*, 1998).

Um outro tumor onde normalmente encontra-se uma alta expressão de *PRAME* é o neuroblastoma, no qual foi observada a expressão deste gene em 93% dos tumores primários e em 100% dos pacientes em estágios mais avançados. Neste tumor observam-se associações altamente significativas entre a alta expressão de *PRAME* e o estágio mais avançado da doença e a um prognóstico desfavorável (OBERTHUER *et al.*, 2004). No caso do tumor de mama, foi observado que a alta expressão de *PRAME* funciona como um marcador molecular para um prognóstico desfavorável, sendo que a alta expressão de *PRAME* se correlaciona com uma maior

probabilidade de desenvolver metástases e com uma menor sobrevida do paciente (VAN 'T VEER *et al.*, 2002).

Diferentemente de outros antígenos do tipo “*cancer-testis*” (CTA), a expressão de *PRAME* também é observada em alguns tecidos saudáveis. Além dos testículos, foi observada sua expressão em ovários, glândulas adrenais, endométrio e células CD34⁺ da medula óssea (IKEDA *et al.*, 1997; STEINBACH *et al.*, 2002b). A alta expressão de antígenos do tipo CTA nos testículos pode ser explicada pela ampla demetilação de ilhas de CpG no genoma das células germinais masculinas, porém muito pouco se sabe sobre a causa da expressão aumentada de *PRAME* nos tumores. Como a maioria dos estudos tem usado técnicas baseadas na quantificação da expressão de mRNA, está claro que os níveis dos transcritos deste gene são altamente induzidos em amostras tumorais, porém não se sabe se isto ocorre devido a amplificações gênicas, maiores taxas de transcrição ou uma maior meia-vida do mRNA. Não foram descritas até o momento alterações genéticas como mutações e translocações neste gene. Porém, recentemente foi demonstrado que a hipometilação das ilhas de CpG presentes no promotor do *PRAME* é responsável pela sua maior expressão em tumores humanos (SCHENK *et al.*, 2007).

Surpreendentemente, uma ampla família de genes “*PRAME-like*” e pseudogenes têm sido observadas no genoma humano. Foram observados 22 “*PRAME-like*” genes e 10 Pseudogenes, os quais têm surgido recentemente na evolução por meio de extensivas duplicações gênicas (BIRTLE *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre a expressão destes genes e suas possíveis funções. O genoma de camundongo contém vários genes “*PRAME-like*” em uma região ortóloga, porém não está claro se um ortólogo funcional do *PRAME* existe.

Assim sendo, surge a questão se a expressão de *PRAME* está implicada nas causas da transformação oncogênica ou se isto é apenas uma consequência da doença. Dados recentes indicam que o *PRAME* pode ser importante na progressão tumoral por interferir com a sinalização do receptor do ácido retinóico - RAR (EPPING *et al.*, 2005). A sinalização do ácido retinóico é essencial no desenvolvimento, determinação da diferenciação celular e homeostase do tecido. O ácido retinóico (RA) induz a transcrição de diversos genes alvos por se ligar e ativar o seu receptor, resultando em diferenciação e parada do ciclo celular em células responsivas

(ALTUCCI *et al.*, 2001). Assim sendo, a perda da responsividade ao ácido retinóico é benéfica para as células tumorais.

A sequência de aminoácidos da proteína PRAME revela a presença de sete possíveis regiões de ligação aos receptores nucleares. Estas regiões apresentam o motivo LXXLL (onde L é leucina e X é qualquer outro aminoácido) e normalmente estão presentes em proteínas que se ligam e modulam a atividade de receptores nucleares hormonais. Assim, foi verificado se o PRAME possuiria a capacidade de reprimir a transativação de diversos receptores nucleares e foi notado que esta proteína é capaz de inibir apenas a sinalização do RAR (EPPING *et al.*, 2005).

O RAR reprime a transcrição dos genes alvo na ausência do seu ligante e ativa a transcrição após a ligação com o ácido retinóico (RA). Foi observado que o PRAME se liga diretamente ao RAR e inibe a transativação, mesmo na presença do ácido retinóico, agindo assim, como um repressor dominante da via do RAR. A expressão ectópica de PRAME, em células sensíveis ao RA, foi capaz de induzir resistência à parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose induzidos pelo RA. Além disto, a inibição da expressão de *PRAME* por RNA de interferência em linhagens de melanoma resistentes ao ácido retinóico, restaurou a sensibilidade e induziu a expressão dos genes alvos *RARβ* e *p21*. Outro dado importante, é que o xenotransplante de melanoma com o *PRAME* inibido pode ser tratado com ácido retinóico, resultando em tumores com tamanho significativamente menor quando comparado com tumores sem a inibição deste gene (EPPING *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual o PRAME inibe a trans-ativação mediada pelo RAR é independente do recrutamento de histona deacetilases (HDACs), e dependente do recrutamento da proteína EZH2 (Figura 3), do grupo dos polycombs, já que em ensaios de co-imunoprecipitação foi possível observar a interação de PRAME e EZH2. Além disto, o silenciamento de *EZH2* é capaz de reverter a inibição da via do RAR mediado por PRAME. Também é importante ressaltar que mutação pontual no domínio com atividade histona metil-transferase, chamado SET, da proteína EZH2 também restaura a sinalização do RAR e, por fim, o silenciamento do gene *EED*, que codifica uma proteína fundamental do complexo PRC2 também é capaz de recuperar a sinalização do RAR (EPPING *et al.*, 2005).

Figura 3: Inibição da via do ácido retinóico mediada por PRAME (EPPING *et al.*, 2005).

Sabe-se que existem pelo menos quatro diferentes complexos formados pelas proteínas polycombs. Destes, dois são extremamente importantes para o silenciamento gênico, o PRC1 (*polycomb repressor complex 1*) e PRC2. A metilação da lisina 27 de histona H3 (H3K27) é catalizada pelo PRC2, um complexo que depende de três principais componentes: EED (“embryonic ectoderm development”), SUZ12 (“suppressor of zeste 12”) e EZH2 (“enhancer of zeste homologue 2”), este último possui um domínio SET, com atividade histona metil-transferase. A lisina 27 da histona H3 trimetilada serve como um sítio de ligação para o complexo PRC1, que possui as proteínas RING1A, RING1B e BMI1. Apesar de não ser conhecido o mecanismo exato pelo qual as proteínas do complexo polycomb reprimem a transcrição, sabe-se que os componentes RING1A-B funcionam como uma ubiquitina ligase para a monoubiquitinação da lisina 119 da histona H2A e, aparentemente, a proteína BMI1 é capaz de aumentar este efeito (CAO *et al.*, 2005; DE NAPOLES *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004). Assim, é possível que a ubiquitinação da histona H2A possa interferir com a dinâmica do nucleossoma ou com a estabilidade da RNA polimerase e, portanto, inibir a expressão dos genes onde os complexos PRC1 e 2 estão agindo.

Três trabalhos recentes mostram evidências que locais do genoma onde ocorre metilação da H3K27 estão sujeitos à metilação *de novo* de ilhas CpG no DNA, em células tumorais, o que permitiria um silenciamento ainda mais estável destes genes (OHM *et al.*, 2007; SCHLESINGER *et al.*, 2007; WIDSCHWENDTER *et al.*, 2007).

Mais recentemente, quatro grupos descreveram que as proteínas UTX e JMJD3 são capazes de demetilar lisina 27 di ou trimetilada, na histona H3 (AGGER *et al.*, 2007; DE SANTA *et al.*, 2007; LAN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007). Estes achados têm grande importância em como o silenciamento gênico mediado pelo grupo dos polycombs pode ser revertido.

Assim sendo, é possível que a expressão de *TRAIL*, que é induzida pelo ácido retinóico (ALTUCCI *et al.*, 2001), seja regulada por PRAME, um repressor dominante da via do ácido retinóico (EPPING *et al.*, 2005), em um processo dependente de EZH2, uma proteína do grupo dos polycombs. Este processo, se comprovado, teria grande relevância na fisiopatologia e terapêutica da LMC e, possivelmente, também de outros tumores.

Logo, a hipótese deste trabalho é que *PRAME* tenha sua expressão aumentada na LMC o que, por inibir a via do ácido retinóico, irá reduzir a expressão de *TRAIL*, um importante supressor tumoral.

6 CONCLUSÕES

Identificamos um novo mecanismo de regulação da expressão de *TRAIL*, dependente da alta expressão de *PRAME* e da presença de EZH2. Esta via foi demonstrada como sendo responsável pela diminuição de expressão de *TRAIL* em pacientes com LMC e sugerida como sendo responsável por este processo em outros tumores.

O *PRAME* é um potencial biomarcador de progressão tumoral na LMC.

O *PRAME* e o EZH2 são dois interessantes alvos terapêuticos na LMC, e possivelmente em outros tumores, devido à sua capacidade de bloquear a expressão de *TRAIL*.

A inibição de *PRAME* ou de *EZH2* é capaz aumentar a capacidade tumoricida do Mesilato de Imatinibe, *in vitro*. Reforçando a teoria de que estas moléculas são dois importantes alvos terapêuticos na LMC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, volume, 4, 421-426, 2004.

AGGER, K.; CLOOS, P. A.; CHRISTENSEN, J.; PASINI, D.; ROSE, S.; RAPPSILBER, J.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; SALCINI, A. E.; HELIN, K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. **Nature**, volume, 7163, 731-734, 2007.

AGGER, K.; CLOOS, P. A.; RUDKJAER, L.; WILLIAMS, K.; ANDERSEN, G.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. **Genes Dev**, volume, 10, 1171-1176, 2009.

AICHBERGER, K. J.; MAYERHOFER, M.; KRAUTH, M. T.; SKVARA, H.; FLORIAN, S.; SONNECK, K.; AKGUL, C.; DERDAK, S.; PICKL, W. F.; WACHECK, V.; SELZER, E.; MONIA, B. P.; MORIGGL, R.; VALENT, P.; SILLABER, C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of Imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. **Blood**, volume, 8, 3303-3311, 2005.

ALTUCCI, L.; ROSSIN, A.; RAFFELSBERGER, W.; REITMAIR, A.; CHOMIENNE, C.; GRONEMEYER, H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. **Nat Med**, volume, 6, 680-686, 2001.

ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem**, volume, 20, 6102-6109, 2000.

ASADA, A.; ZHAO, Y.; KONDO, S.; IWATA, M. Induction of thymocyte apoptosis by Ca²⁺-independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation. **J Biol Chem**, volume, 43, 28392-28398, 1998.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr Opin Cell Biol**, volume, 2, 255-260, 1999.

ASHKENAZI, A.; PAI, R. C.; FONG, S.; LEUNG, S.; LAWRENCE, D. A.; MARSTERS, S. A.; BLACKIE, C.; CHANG, L.; MCMURTREY, A. E.; HEBERT, A.; DEFORGE, L.; KOUMENIS, I. L.; LEWIS, D.; HARRIS, L.; BUSSIÈRE, J.;

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

KOEPPEN, H.; SHAHROKH, Z.; SCHWALL, R. H. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. **J Clin Invest**, volume, 2, 155-162, 1999.

AZA-BLANC, P.; COOPER, C. L.; WAGNER, K.; BATALOV, S.; DEVERAUX, Q. L.; COOKE, M. P. Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. **Mol Cell**, volume, 3, 627-637, 2003.

BARNES, D. J.; SCHULTHEIS, B.; ADEDEJI, S.; MELO, J. V. Dose-dependent effects of BCR-ABL in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia. **Oncogene**, volume, 42, 6432-6440, 2005.

BARRADAS, M.; ANDERTON, E.; ACOSTA, J. C.; LI, S.; BANITO, A.; RODRIGUEZ-NIEDENFUHR, M.; MAERTENS, G.; BANCK, M.; ZHOU, M. M.; WALSH, M. J.; PETERS, G.; GIL, J. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. **Genes Dev**, volume, 10, 1177-1182, 2009.

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**, volume, 8, 2038-2044, 1994.

BEER, D. G.; KARDIA, S. L.; HUANG, C. C.; GIORDANO, T. J.; LEVIN, A. M.; MISEK, D. E.; LIN, L.; CHEN, G.; GHARIB, T. G.; THOMAS, D. G.; LIZYNESS, M. L.; KUICK, R.; HAYASAKA, S.; TAYLOR, J. M.; IANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med**, volume, 8, 816-824, 2002.

BEN-NERIAH, Y.; DALEY, G. Q.; MES-MASSON, A. M.; WITTE, O. N.; BALTIMORE, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/ABL hybrid gene. **Science**, volume, 4760, 212-214, 1986.

BIRTLE, Z.; GOODSTADT, L.; PONTING, C. Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes. **BMC Genomics**, volume, 120, 2005.

BOON, K.; EDWARDS, J. B.; SIU, I. M.; OLSCHNER, D.; EBERHART, C. G.; MARRA, M. A.; STRAUSBERG, R. L.; RIGGINS, G. J. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. **Oncogene**, volume, 48, 7687-7694, 2003.

BOUTROS, R.; BYRNE, J. A. D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells. **Exp Cell Res**, volume, 1, 152-165, 2005.

BOYUM, A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. **Lymphology**, volume, 2, 71-76, 1977.

BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/AKT is off duty. **J Leukoc Biol**, volume, 6, 689-701, 2003.

BYRNE, J. A.; MATTEI, M. G.; BASSET, P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). **Genomics**, volume, 3, 523-532, 1996.

BYRNE, J. A.; NOURSE, C. R.; BASSET, P.; GUNNING, P. Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. **Oncogene**, volume, 7, 873-881, 1998.

CAO, R.; TSUKADA, Y.; ZHANG, Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. **Mol Cell**, volume, 6, 845-854, 2005.

CARDONE, M. H.; ROY, N.; STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S.; FRANKE, T. F.; STANBRIDGE, E.; FRISCH, S.; REED, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, volume, 5392, 1318-1321, 1998.

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. **J Exp Med**, volume, 3, 811-820, 1996.

CHEN, Q.; GONG, B.; MAHMOUD-AHMED, A. S.; ZHOU, A.; HSI, E. D.; HUSSEIN, M.; ALMASAN, A. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. **Blood**, volume, 7, 2183-2192, 2001.

CHIOREAN, E. G.; DYLLA, S. J.; OLSEN, K.; LENVIK, T.; SOIGNIER, Y.; MILLER, J. S. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). **Blood**, volume, 9, 3527-3533, 2003.

CHUAQUI, R. F.; BONNER, R. F.; BEST, C. J.; GILLESPIE, J. W.; FLAIG, M. J.; HEWITT, S. M.; PHILLIPS, J. L.; KRIZMAN, D. B.; TANGREA, M. A.; AHAM, M.; LINEHAN, W. M.; KNEZEVIC, V.; EMMERT-BUCK, M. R. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nat Genet**, volume, 509-514, 2002.

CHUNTHARAPAI, A.; DODGE, K.; GRIMMER, K.; SCHROEDER, K.; MARSTERS, S. A.; KOEPPEN, H.; ASHKENAZI, A.; KIM, K. J. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. **J Immunol**, volume, 8, 4891-4898, 2001.

CLARKE, N.; JIMENEZ-LARA, A. M.; VOLTZ, E.; GRONEMEYER, H. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. **Embo J**, volume, 15, 3051-3060, 2004.

COLLINS, S. A.; GUINN, B. A.; HARRISON, P. T.; SCALLAN, M. F.; O'SULLIVAN, G. C.; TANGNEY, M. Viral vectors in cancer immunotherapy: which vector for which strategy? **Curr Gene Ther**, volume, 2, 66-78, 2008.

CRETNEY, E.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; GLACCUM, M.; PESCHON, J. J.; SMYTH, M. J. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. **J Immunol**, volume, 3, 1356-1361, 2002.

DAI, Z.; QUACKENBUSH, R. C.; COURTNEY, K. D.; GROVE, M.; CORTEZ, D.; REUTHER, G. W.; PENDERGAST, A. M. Oncogenic ABL and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. **Genes Dev**, volume, 10, 1415-1424, 1998.

DANIELS, R. A.; TURLEY, H.; KIMBERLEY, F. C.; LIU, X. S.; MONGKOLSAPAYA, J.; CH'EN, P.; XU, X. N.; JIN, B. Q.; PEZZELLA, F.; SCREATON, G. R. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. **Cell Res**, volume, 6, 430-438, 2005.

DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y.; GREENBERG, M. E. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, volume, 2, 231-241, 1997.

DE NAPOLES, M.; MERMOUD, J. E.; WAKAO, R.; TANG, Y. A.; ENDOH, M.; APPANAH, R.; NESTEROVA, T. B.; SILVA, J.; OTTE, A. P.; VIDAL, M.; KOSEKI, H.; BROCKDORFF, N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. **Dev Cell**, volume, 5, 663-676, 2004.

DE SANTA, F.; TOTARO, M. G.; PROSPERINI, E.; NOTARBARTOLO, S.; TESTA, G.; NATOLI, G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. **Cell**, volume, 6, 1083-1094, 2007.

DEININGER, M. W. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. **J Cancer Res Clin Oncol**, volume, 2, 59-72, 2004.

DEININGER, M. W.; VIEIRA, S.; MENDIOLA, R.; SCHULTHEIS, B.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. **Cancer Res**, volume, 7, 2049-2055, 2000.

DIJKERS, P. F.; MEDEMA, R. H.; LAMMERS, J. W.; KOENDERMAN, L.; COFFER, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. **Curr Biol**, volume, 19, 1201-1204, 2000.

DROIN, N. M.; PINKOSKI, M. J.; DEJARDIN, E.; GREEN, D. R. Egr family members regulate nonlymphoid expression of Fas ligand, TRAIL, and tumor necrosis factor during immune responses. **Mol Cell Biol**, volume, 21, 7638-7647, 2003.

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. **Nat Med**, volume, 5, 561-566, 1996.

EMANUEL, P. D.; BATES, L. J.; CASTLEBERRY, R. P.; GUALTIERI, R. J.; ZUCKERMAN, K. S. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. **Blood**, volume, 5, 925-929, 1991.

EPPING, M. T.; BERNARDS, R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. **Cancer Res**, volume, 22, 10639-10642, 2006.

EPPING, M. T.; WANG, L.; EDEL, M. J.; CARLEE, L.; HERNANDEZ, M.; BERNARDS, R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. **Cell**, volume, 6, 835-847, 2005.

EPPING, M. T.; WANG, L.; PLUMB, J. A.; LIEB, M.; GRONEMEYER, H.; BROWN, R.; BERNARDS, R. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 45, 17777-17782, 2007.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. **Oncology (Williston Park)**, volume, 2, 169-180; discussion 181, 184, 1999.

FALSCHLEHNER, C.; EMMERICH, C. H.; GERLACH, B.; WALCZAK, H. TRAIL signalling: decisions between life and death. **Int J Biochem Cell Biol**, volume, 7-8, 1462-1475, 2007.

FANGER, N. A.; MALISZEWSKI, C. R.; SCHOOLEY, K.; GRIFFITH, T. S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **J Exp Med**, volume, 8, 1155-1164, 1999.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; LE COUTRE, P.; MOLOGNI, L.; FANELLI, M.; BERTAZZOLI, C.; MARCHESI, E.; DI NICOLA, M.; BIONDI, A.; CORNEO, G. M.; BELOTTI, D.; POGLIANI, E.; LYDON, N. B. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells Mol Dis**, volume, 3, 380-394, 1997.

GESBERT, F.; GRIFFIN, J. D. Bcr/ABL activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. **Blood**, volume, 6, 2269-2276, 2000.

GHAFFARI, S.; JAGANI, Z.; KITIDIS, C.; LODISH, H. F.; KHOSRAVI-FAR, R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 11, 6523-6528, 2003.

GOLDMAN, J. M.; DRUKER, B. J. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. **Blood**, volume, 7, 2039-2042, 2001.

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**, volume, 6128, 342-344, 1987.

GORRE, M. E.; SAWYERS, C. L. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, volume, 4, 303-307, 2002.

GREINER, J.; RINGHOFFER, M.; TANIGUCHI, M.; LI, L.; SCHMITT, A.; SHIKU, H.; DOHNER, H.; SCHMITT, M. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. **Int J Cancer**, volume, 5, 704-711, 2004.

GRIFFITH, T. S.; STOKES, B.; KUCABA, T. A.; EAREL, J. K., JR.; VANOOSTEN, R. L.; BRINCK, E. L.; NORIAN, L. A. TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application. **Curr Gene Ther**, volume, 1, 9-19, 2009.

HAMDANE, M.; DAVID-CORDONNIER, M. H.; D'HALLUIN, J. C. Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappaB). **Oncogene**, volume, 19, 2267-2275, 1997.

HAQQ, C.; NOSRATI, M.; SUDILOVSKY, D.; CROTHERS, J.; KHODABAKHSH, D.; PULLIAM, B. L.; FEDERMAN, S.; MILLER, J. R., 3RD; ALLEN, R. E.; SINGER, M. I.; LEONG, S. P.; LJUNG, B. M.; SAGEBIEL, R. W.; KASHANI-SABET, M. The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 17, 6092-6097, 2005.

HOCHHAUS, A.; KREIL, S.; CORBIN, A. S.; LA ROSEE, P.; MULLER, M. C.; LAHAYE, T.; HANFSTEIN, B.; SCHOCH, C.; CROSS, N. C.; BERGER, U.; GSCHAIÐMEIER, H.; DRUKER, B. J.; HEHLMANN, R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to Imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, volume, 11, 2190-2196, 2002.

HOEK, K. S.; SCHLEGEL, N. C.; BRAFFORD, P.; SUCKER, A.; UGUREL, S.; KUMAR, R.; WEBER, B. L.; NATHANSON, K. L.; PHILLIPS, D. J.; HERLYN, M.; SCHADENDORF, D.; DUMMER, R. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. **Pigment Cell Res**, volume, 4, 290-302, 2006.

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. **J Exp Med**, volume, 6, 977-984, 2000.

IKEDA, H.; LETHE, B.; LEHMANN, F.; VAN BAREN, N.; BAURAIN, J. F.; DE SMET, C.; CHAMBOST, H.; VITALE, M.; MORETTA, A.; BOON, T.; COULIE, P. G. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. **Immunity**, volume, 2, 199-208, 1997.

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. **J Biol Chem**, volume, 49, 31704-31710, 1996.

INSINGA, A.; MONESTIROLI, S.; RONZONI, S.; GELMETTI, V.; MARCHESI, F.; VIALE, A.; ALTUCCI, L.; NERVI, C.; MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. **Nat Med**, volume, 1, 71-76, 2005.

JAGANI, Z.; SINGH, A.; KHOSRAVI-FAR, R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, volume, 1, 63-84, 2008.

JAYARAMAN, T.; MARKS, A. R. Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. **J Biol Chem**, volume, 9, 6417-6420, 2000.

KALIDAS, M.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia. **Jama**, volume, 8, 895-898, 2001.

KAPLAN, J. M. Adenovirus-based cancer gene therapy. **Curr Gene Ther**, volume, 6, 595-605, 2005.

KAYAGAKI, N.; YAMAGUCHI, N.; NAKAYAMA, M.; ETO, H.; OKUMURA, K.; YAGITA, H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. **J Exp Med**, volume, 9, 1451-1460, 1999.

KESSLER, J. H.; BEEKMAN, N. J.; BRES-VLOEMANS, S. A.; VERDIJK, P.; VAN VELEN, P. A.; KLOOSTERMAN-JOOSTEN, A. M.; VISSERS, D. C.; TEN BOSCH, G. J.; KESTER, M. G.; SIJTS, A.; WOUTER DRIJFHOUT, J.; OSSENDORP, F.; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. **J Exp Med**, volume, 1, 73-88, 2001.

KIKUCHI, S.; NAGAI, T.; KUNITAMA, M.; KIRITO, K.; OZAWA, K.; KOMATSU, N. Active FKHRL1 overcomes Imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Cancer Sci**, volume, 12, 1949-1958, 2007.

KONTOU, M.; WILL, R. D.; ADELFAK, C.; WITTIG, R.; POUSTKA, A.; HIRSCH-KAUFFMANN, M.; SCHWEIGER, M. Thioredoxin, a regulator of gene expression. **Oncogene**, volume, 12, 2146-2152, 2004.

LAN, F.; BAYLISS, P. E.; RINN, J. L.; WHETSTINE, J. R.; WANG, J. K.; CHEN, S.; IWASE, S.; ALPATOV, R.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; ROBERTS, T. M.; CHANG, H. Y.; SHI, Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. **Nature**, volume, 7163, 689-694, 2007.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, volume, 225-274, 2005.

LEE, M. G.; VILLA, R.; TROJER, P.; NORMAN, J.; YAN, K. P.; REINBERG, D.; DI CROCE, L.; SHIEKHATTAR, R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. **Science**, volume, 5849, 447-450, 2007.

LIM, S. H.; COLEMAN, S. Chronic myeloid leukemia as an immunological target. **Am J Hematol**, volume, 1, 61-67, 1997.

LOTEM, J.; KAMA, R.; SACHS, L. Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 21, 12016-12020, 1999.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. BID, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, volume, 4, 481-490, 1998.

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**, volume, 3, 1070-1079, 2000.

MAYO, L. D.; DONNER, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 20, 11598-11603, 2001.

MAZZOCCO, M.; MAFFEI, M.; EGEO, A.; VERGANO, A.; ARRIGO, P.; DI LISI, R.; GHIOTTO, F.; SCARTEZZINI, P. The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich (SH3BGR) gene establishes a new family of highly conserved small proteins related to Thioredoxin Superfamily. **Gene**, volume, 1-2, 233-239, 2002.

MCGAHON, A.; BISSONNETTE, R.; SCHMITT, M.; COTTER, K. M.; GREEN, D. R.; COTTER, T. G. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. **Blood**, volume, 5, 1179-1187, 1994.

MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. N. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 18, 6558-6562, 1987.

MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, volume, 5, 751-756, 1996.

MODUR, V.; NAGARAJAN, R.; EVERS, B. M.; MILBRANDT, J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. **J Biol Chem**, volume, 49, 47928-47937, 2002.

NAKAMURA, H.; NAKAMURA, K.; YODOI, J. Redox regulation of cellular activation. **Annu Rev Immunol**, volume, 351-369, 1997.

NEBBIOSO, A.; CLARKE, N.; VOLTZ, E.; GERMAIN, E.; AMBROSINO, C.; BONTEMPO, P.; ALVAREZ, R.; SCHIAVONE, E. M.; FERRARA, F.; BRESCIANI, F.; WEISZ, A.; DE LERA, A. R.; GRONEMEYER, H.; ALTUCCI, L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. **Nat Med**, volume, 1, 77-84, 2005.

NEUMANN, E.; ENGELSBERG, A.; DECKER, J.; STORKEL, S.; JAEGER, E.; HUBER, C.; SELIGER, B. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? **Cancer Res**, volume, 18, 4090-4095, 1998.

NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; TROTTA, R.; NOTARI, M.; BLASER, B. W.; LIU, S.; MAO, H.; CHANG, J. S.; GALIETTA, A.; UTTAM, A.; ROY, D. C.; VALTIERI, M.; BRUNER-KLISOVIC, R.; CALIGIURI, M. A.; BLOOMFIELD, C. D.; MARCUCCI, G.; PERROTTI, D. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. **Cancer Cell**, volume, 5, 355-368, 2005.

NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; HOSER, G.; KOSSEV, P.; WASIK, M. A.; SKORSKI, T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. **Blood**, volume, 12, 4531-4539, 2002.

NIMMANAPALLI, R.; POROSNICU, M.; NGUYEN, D.; WORTHINGTON, E.; O'BRYAN, E.; PERKINS, C.; BHALLA, K. Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of BCR-ABL-positive human acute leukemia cells. **Clin Cancer Res**, volume, 2, 350-357, 2001.

OBERTHURER, A.; HERO, B.; SPITZ, R.; BERTHOLD, F.; FISCHER, M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. **Clin Cancer Res**, volume, 13, 4307-4313, 2004.

OEHLER, V. G.; GUTHRIE, K. A.; CUMMINGS, C. L.; SABO, K.; WOOD, B. L.; GOOLEY, T.; YANG, T.; EPPING, M. T.; SHOU, Y.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E.; LADNE, P.; STIREWALT, D. L.; ABKOWITZ, J. L.; RADICH, J. P. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. **Blood**, volume, 2009.

OHM, J. E.; MCGARVEY, K. M.; YU, X.; CHENG, L.; SCHUEBEL, K. E.; COPE, L.; MOHAMMAD, H. P.; CHEN, W.; DANIEL, V. C.; YU, W.; BERMAN, D. M.; JENUWEIN, T.; PRUITT, K.; SHARKIS, S. J.; WATKINS, D. N.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. **Nat Genet**, volume, 2, 237-242, 2007.

OHNO, R. Treatment of chronic myeloid leukemia with Imatinib mesylate. **Int J Clin Oncol**, volume, 3, 176-183, 2006.

PANE, F.; INTRIERI, M.; QUINTARELLI, C.; IZZO, B.; MUCCIOLI, G. C.; SALVATORE, F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. **Oncogene**, volume, 56, 8652-8667, 2002.

PAYDAS, S.; TANRIVERDI, K.; YAVUZ, S.; DIESEL, U.; BASLAMISLI, F.; BURGUT, R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. **Am J Hematol**, volume, 4, 257-261, 2005.

PENDERGAST, A. M.; QUILLIAM, L. A.; CRIPE, L. D.; BASSING, C. H.; DAI, Z.; LI, N.; BATZER, A.; RABUN, K. M.; DER, C. J.; SCHLESSINGER, J.; ET AL. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. **Cell**, volume, 1, 175-185, 1993.

PITTI, R. M.; MARSTERS, S. A.; RUPPERT, S.; DONAHUE, C. J.; MOORE, A.; ASHKENAZI, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **J Biol Chem**, volume, 22, 12687-12690, 1996.

POPNIKOLOV, N. K.; GATALICA, Z.; ADEGBOYEGA, P. A.; NORRIS, B. A.; PASRICHA, P. J. Downregulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L in Barrett's esophagus with dysplasia and adenocarcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, volume, 2, 161-165, 2006.

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 J**, volume, 4, 764-773, 1994.

QUINTARELLI, C.; DOTTI, G.; DE ANGELIS, B.; HOYOS, V.; MIMS, M.; LUCIANO, L.; HESLOP, H. E.; ROONEY, C. M.; PANE, F.; SAVOLDO, B. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. **Blood**, volume, 5, 1876-1885, 2008.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 8, 2794-2799, 2006.

REN, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nat Rev Cancer**, volume, 3, 172-183, 2005.

REUTHER, J. Y.; REUTHER, G. W.; CORTEZ, D.; PENDERGAST, A. M.; BALDWIN, A. S., JR. A requirement for NF-kappaB activation in BCR-ABL-mediated transformation. **Genes Dev**, volume, 7, 968-981, 1998.

REZVANI, K.; YONG, A. S.; TAWAB, A.; JAFARPOUR, B.; ENIAFE, R.; MIELKE, S.; SAVANI, B. N.; KEYVANFAR, K.; LI, Y.; KURLANDER, R.; BARRETT, A. J. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. **Blood**, volume, 10, 2245-2255, 2009.

RHODES, D. R.; YU, J.; SHANKER, K.; DESHPANDE, N.; VARAMBALLY, R.; GHOSH, D.; BARRETTE, T.; PANDEY, A.; CHINNAIYAN, A. M. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. **Neoplasia**, volume, 1, 1-6, 2004.

RICHARDSON, A. L.; WANG, Z. C.; DE NICOLO, A.; LU, X.; BROWN, M.; MIRON, A.; LIAO, X.; IGLEHART, J. D.; LIVINGSTON, D. M.; GANESAN, S. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. **Cancer Cell**, volume, 2, 121-132, 2006.

RODRIGUEZ, C.; CAUSSE, A.; URSULE, E.; THEILLET, C. At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains. **Genes Chromosomes Cancer**, volume, 1, 76-84, 2000.

ROKMAN, A.; KOIVISTO, P. A.; MATIKAINEN, M. P.; KUUKASJARVI, T.; POUTIAINEN, M.; HELIN, H. J.; KARHU, R.; KALLIONIEMI, O. P.; SCHLEUTKER, J. Genetic changes in familial prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Prostate**, volume, 3, 233-239, 2001.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; AGIRRE, X.; CASTILLEJO, J. A.; NAVARRO, G.; JOSE-ENERIZ, E. S.; GARATE, L.; CORDEU, L.; CERVANTES, F.; PROSPER, F.; HEINIGER, A.; TORRES, A. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. **Leuk Res**, volume, 11, 1521-1528, 2007.

ROTH, R. B.; HEVEZI, P.; LEE, J.; WILLHITE, D.; LECHNER, S. M.; FOSTER, A. C.; ZLOTNIK, A. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. **Neurogenetics**, volume, 2, 67-80, 2006.

SAKAKURA, C.; HAGIWARA, A.; TANIGUCHI, H.; YAMAGUCHI, T.; YAMAGISHI, H.; TAKAHASHI, T.; KOYAMA, K.; NAKAMURA, Y.; ABE, T.; INAZAWA, J. Chromosomal aberrations in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, volume, 12, 2034-2039, 1999.

SATO, K.; HIDA, S.; TAKAYANAGI, H.; YOKOCHI, T.; KAYAGAKI, N.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; TANAKA, N.; TANIGUCHI, T.; OGASAWARA, K. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. **Eur J Immunol**, volume, 11, 3138-3146, 2001.

SATTLER, M.; MOHI, M. G.; PRIDE, Y. B.; QUINNAN, L. R.; MALOUF, N. A.; PODAR, K.; GESBERT, F.; IWASAKI, H.; LI, S.; VAN ETEN, R. A.; GU, H.; GRIFFIN, J. D.; NEEL, B. G. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. **Cancer Cell**, volume, 5, 479-492, 2002.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, volume, 7015, 294-297, 2004.
SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, volume, 17, 1330-1340, 1999.

SAWYERS, C. L.; MCLAUGHLIN, J.; WITTE, O. N. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the BCR-ABL oncogene. **J Exp Med**, volume, 1, 307-313, 1995.

SCHENK, T.; STENGEL, S.; GOELLNER, S.; STEINBACH, D.; SALUZ, H. P. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. **Genes Chromosomes Cancer**, volume, 9, 796-804, 2007.

SCHLESINGER, Y.; STRAUSSMAN, R.; KESHET, I.; FARKASH, S.; HECHT, M.; ZIMMERMAN, J.; EDEN, E.; YAKHINI, Z.; BEN-SHUSHAN, E.; REUBINOFF, B. E.; BERGMAN, Y.; SIMON, I.; CEDAR, H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. **Nat Genet**, volume, 2, 232-236, 2007.

SCHMALTZ, C.; ALPDOGAN, O.; KAPPEL, B. J.; MURIGLAN, S. J.; ROTOLO, J. A.; ONGCHIN, J.; WILLIS, L. M.; GREENBERG, A. S.; ENG, J. M.; CRAWFORD, J. M.; MURPHY, G. F.; YAGITA, H.; WALCZAK, H.; PESCHON, J. J.; VAN DEN BRINK, M. R. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. **Nat Med**, volume, 12, 1433-1437, 2002.

SCHUETTENGROBER, B.; CHOURROUT, D.; VERVOORT, M.; LEBLANC, B.; CAVALLI, G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. **Cell**, volume, 4, 735-745, 2007.

SEDDER, L. M.; GLACCUM, M. B.; SCHUH, J. C.; KANALY, S. T.; WILLIAMSON, E.; KAYAGAKI, N.; YUN, T.; SMOLAK, P.; LE, T.; GOODWIN, R.; GLINIAK, B. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. **Eur J Immunol**, volume, 8, 2246-2254, 2002.

SHEHATA, M.; BIECHE, I.; BOUTROS, R.; WEIDENHOFER, J.; FANAYAN, S.; SPALDING, L.; ZEPS, N.; BYTH, K.; BRIGHT, R. K.; LIDEREAU, R.; BYRNE, J. A. Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52. **Clin Cancer Res**, volume, 16, 5050-5060, 2008.

SHUAI, K.; HALPERN, J.; TEN HOEVE, J.; RAO, X.; SAWYERS, C. L. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, volume, 2, 247-254, 1996.

SHYAMSUNDAR, R.; KIM, Y. H.; HIGGINS, J. P.; MONTGOMERY, K.; JORDEN, M.; SETHURAMAN, A.; VAN DE RIJN, M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; POLLACK, J. R. A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. **Genome Biol**, volume, 3, R22, 2005.

SIEGMUND, D.; HAUSSER, A.; PETERS, N.; SCHEURICH, P.; WAJANT, H. Tumor necrosis factor (TNF) and phorbol ester induce TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) under critical involvement of NF-kappa B essential modulator (NEMO)/IKKgamma. **J Biol Chem**, volume, 47, 43708-43712, 2001.

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 J**, volume, 20, 6151-6161, 1997.

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**, volume, 2, 726-736, 1995.

SOVERINI, S.; MARTINELLI, G.; AMABILE, M.; POERIO, A.; BIANCHINI, M.; ROSTI, G.; PANE, F.; SAGLIO, G.; BACCARANI, M. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. **Clin Chem**, volume, 7, 1205-1213, 2004.

STAHL, M.; DIJKERS, P. F.; KOPS, G. J.; LENS, S. M.; COFFER, P. J.; BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. **J Immunol**, volume, 10, 5024-5031, 2002.

STEARMAN, R. S.; DWYER-NIELD, L.; ZERBE, L.; BLAINE, S. A.; CHAN, Z.; BUNN, P. A., JR.; JOHNSON, G. L.; HIRSCH, F. R.; MERRICK, D. T.; FRANKLIN, W. A.; BARON, A. E.; KEITH, R. L.; NEMENOFF, R. A.; MALKINSON, A. M.; GERACI, M. W. Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. **Am J Pathol**, volume, 6, 1763-1775, 2005.

STEINBACH, D.; HERMANN, J.; VIEHMANN, S.; ZINTL, F.; GRUHN, B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, volume, 2, 118-123, 2002a.

STEINBACH, D.; VIEHMANN, S.; ZINTL, F.; GRUHN, B. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, volume, 1, 89-91, 2002b.

STERNBERG, D. W.; GILLILAND, D. G. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. **J Clin Oncol**, volume, 2, 361-371, 2004.

SU, A. I.; COOKE, M. P.; CHING, K. A.; HAKAK, Y.; WALKER, J. R.; WILTSHIRE, T.; ORTH, A. P.; VEGA, R. G.; SAPINOSO, L. M.; MOQRICH, A.; PATAPOUTIAN, A.; HAMPTON, G. M.; SCHULTZ, P. G.; HOGENESCH, J. B. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 7, 4465-4470, 2002.

SU, A. I.; WILTSHIRE, T.; BATALOV, S.; LAPP, H.; CHING, K. A.; BLOCK, D.; ZHANG, J.; SODEN, R.; HAYAKAWA, M.; KREIMAN, G.; COOKE, M. P.; WALKER, J. R.; HOGENESCH, J. B. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, volume, 16, 6062-6067, 2004.

TAKEDA, K.; SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; HAYAKAWA, Y.; KAYAGAKI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. **J Exp Med**, volume, 2, 161-169, 2002.

TAKEDA, K.; SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; HAYAKAWA, Y.; YAMAGUCHI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. **Cell Immunol**, volume, 2, 194-200, 2001.

TAKEDA, K.; YAMAGUCHI, N.; AKIBA, H.; KOJIMA, Y.; HAYAKAWA, Y.; TANNER, J. E.; SAYERS, T. J.; SEKI, N.; OKUMURA, K.; YAGITA, H.; SMYTH, M. J. Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy. **J Exp Med**, volume, 4, 437-448, 2004.

TAN, J.; YANG, X.; ZHUANG, L.; JIANG, X.; CHEN, W.; LEE, P. L.; KARUTURI, R. K.; TAN, P. B.; LIU, E. T.; YU, Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. **Genes Dev**, volume, 9, 1050-1063, 2007.

TOMASELLO, E.; VIVIER, E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. **Eur J Immunol**, volume, 6, 1670-1677, 2005. TOMBAL, B.; WEERARATNA, A. T.; DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade

responsible for the death of prostatic cancer cells. **Prostate**, volume, 4, 303-317, 2000.

TRAN, H.; BRUNET, A.; GRENIER, J. M.; DATTA, S. R.; FORNACE, A. J., JR.; DISTEFANO, P. S.; CHIANG, L. W.; GREENBERG, M. E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. **Science**, volume, 5567, 530-534, 2002.

UNO, K.; INUKAI, T.; KAYAGAKI, N.; GOI, K.; SATO, H.; NEMOTO, A.; TAKAHASHI, K.; KAGAMI, K.; YAMAGUCHI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; KOYAMA-OKAZAKI, T.; SUZUKI, T.; SUGITA, K.; NAKAZAWA, S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. **Blood**, volume, 9, 3658-3667, 2003.

VAN 'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, volume, 6871, 530-536, 2002.

VAN BAREN, N.; CHAMBOST, H.; FERRANT, A.; MICHAUX, L.; IKEDA, H.; MILLARD, I.; OLIVE, D.; BOON, T.; COULIE, P. G. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. **Br J Haematol**, volume, 5, 1376-1379, 1998.

VAN HAAFTEN, G.; DALGLIESH, G. L.; DAVIES, H.; CHEN, L.; BIGNELL, G.; GREENMAN, C.; EDKINS, S.; HARDY, C.; O'MEARA, S.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; HINTON, J.; LATIMER, C.; ANDREWS, J.; BARTHORPE, S.; BEARE, D.; BUCK, G.; CAMPBELL, P. J.; COLE, J.; FORBES, S.; JIA, M.; JONES, D.; KOK, C. Y.; LEROY, C.; LIN, M. L.; MCBRIDE, D. J.; MADDISON, M.; MAQUIRE, S.; MCLAY, K.; MENZIES, A.; MIRONENKO, T.; MULDERRIG, L.; MUDIE, L.; PLEASANCE, E.; SHEPHERD, R.; SMITH, R.; STEBBINGS, L.; STEPHENS, P.; TANG, G.; TARPEY, P. S.; TURNER, R.; TURRELL, K.; VARIAN, J.; WEST, S.; WIDAA, S.; WRAY, P.; COLLINS, V. P.; ICHIMURA, K.; LAW, S.; WONG, J.; YUEN, S. T.; LEUNG, S. Y.; TONON, G.; DEPINHO, R. A.; TAI, Y. T.; ANDERSON, K. C.; KAHNOSKI, R. J.; MASSIE, A.; KHOO, S. K.; TEH, B. T.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. **Nat Genet**, volume, 5, 521-523, 2009.

VIGNESWARAN, N.; BAUCUM, D. C.; WU, J.; LOU, Y.; BOUQUOT, J.; MULLER, S.; ZACHARIAS, W. Repression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but not its receptors during oral cancer progression. **BMC Cancer**, volume, 108, 2007.

WALCZAK, H.; MILLER, R. E.; ARIAIL, K.; GLINIAK, B.; GRIFFITH, T. S.; KUBIN, M.; CHIN, W.; JONES, J.; WOODWARD, A.; LE, T.; SMITH, C.; SMOLAK, P.; GOODWIN, R. G.; RAUCH, C. T.; SCHUH, J. C.; LYNCH, D. H.

Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. **Nat Med**, volume, 2, 157-163, 1999.

WANG, H.; WANG, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; VIDAL, M.; TEMPST, P.; JONES, R. S.; ZHANG, Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. **Nature**, volume, 7010, 873-878, 2004.

WANG, H. G.; PATHAN, N.; ETHELL, I. M.; KRAJEWSKI, S.; YAMAGUCHI, Y.; SHIBASAKI, F.; MCKEON, F.; BOBO, T.; FRANKE, T. F.; REED, J. C. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. **Science**, volume, 5412, 339-343, 1999.

WANG, S.; EL-DEIRY, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. **Oncogene**, volume, 53, 8628-8633, 2003.

WATARI, K.; TOJO, A.; NAGAMURA-INOUE, T.; NAGAMURA, F.; TAKESHITA, A.; FUKUSHIMA, T.; MOTOJI, T.; TANI, K.; ASANO, S. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. **FEBS Lett**, volume, 2-3, 367-371, 2000.

WIDSCHWENDTER, M.; FIEGL, H.; EGLE, D.; MUELLER-HOLZNER, E.; SPIZZO, G.; MARTH, C.; WEISENBERGER, D. J.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; JACOBS, I.; LAIRD, P. W. Epigenetic stem cell signature in cancer. **Nat Genet**, volume, 2, 157-158, 2007.

WILEY, S. R.; SCHOOLEY, K.; SMOLAK, P. J.; DIN, W. S.; HUANG, C. P.; NICHOLL, J. K.; SUTHERLAND, G. R.; SMITH, T. D.; RAUCH, C.; SMITH, C. A.; ET AL. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunity**, volume, 6, 673-682, 1995.

WILLENBROCK, K.; KUPPERS, R.; RENNE, C.; BRUNE, V.; ECKERLE, S.; WEIDMANN, E.; BRAUNINGER, A.; HANSMANN, M. L. Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, volume, 5, 596-604, 2006.

WILLIAMS, R. T.; SHERR, C. J. The INK4-ARF (CDKN2A/B) locus in hematopoiesis and BCR-ABL-induced leukemias. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, volume, 461-467, 2008.

ZHAO, Y.; TOZAWA, Y.; ISEKI, R.; MUKAI, M.; IWATA, M. Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid-induced apoptosis. **J Immunol**, volume, 12, 6346-6354, 1995.