MARIA EMILIA ZENTENO

**“RELAÇÃO ENTRE O ONCOGENE BCR-ABL E OS
RECEPTORES DE TIPO TOLL (TLR)”**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas

São Paulo
2010

MARIA EMILIA ZENTENO

**“RELAÇÃO ENTRE O ONCOGENE BCR-ABL E OS
RECEPTORES DE TIPO TOLL (TLR)”**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Gustavo P. Amarante- Mendes

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zenteno, Maria Emilia.

Relação entre o oncogene BCR-ABL e os receptores de tipo
TOLL(TRL) / Maria Emilia Zenteno. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Gustavo Pessini Amarante-Mendes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de
concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Apoptose e o sistema
imune

Versão do título para o inglês: The relationship between the
oncogene BCR-ABL and Toll-like receptors.

Descritores: 1. Câncer 2. TLR 3. Leucemia Mielóide Crônica 4.
BCR-ABL I. Amarante-Mendes, Gustavo Pessini II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de
Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB0155/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Emilia Zenteno.

Título da Dissertação: Relação entre o oncogene BCR-ABL e os receptores de
tipo TOLL(TRL) .

Orientador(a): Gustavo Pessini Amarante-Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2418 - CEP: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (11) 3091-7733 - telefax: (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 417/10 referente ao projeto intitulado: *"Relação entre o oncogene BCR-ABL e os receptores de tipo TOLL (TLR)"* sob a responsabilidade de **Maria Emilia Zenteno**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de agosto de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos.
Aos meus amigos e primos.
Ao meu amor, Santiago.

AGRADECIMENTOS

Para começar, gostaria de agradecer ao meu orientador Gustavo por ter me guiado com responsabilidade e sabedoria. Pra mim foi muito importante seu apoio e atenção nos primeiros momentos do mestrado já que não foi fácil conseguir “decolar”. Agradeço a ele por ter confiado em mim, mesmo porque, imagino que seja difícil orientar uma pessoa tão atrapalhada quanto eu. Por isso e muito mais, os caminhos e prazos para cada experimento por ele estipulado foram de extrema importância para o avanço deste trabalho até a meta específica traçada.

Agradeço aos amigos do Laboratório, que para minha felicidade ainda estão comigo, compartilhando lindos momentos nas horas de trabalho. Ao Welbert, Jackie, Luciana, Tiago, Julia, Barbara, Inaê, Danilo, Rodolfo, Flavia, Gabriella, Bruno e Nathalia. A cada um deles, obrigada pela alegria, pela amizade, pela disposição pra discutir os experimentos do dia a dia, pelos conselhos que recebi deles. Enfim, agradeço ter conhecido pessoas tão legais e sem problemas para quebrar um galho quando precisar. Por estarem aí para me ajudar nos momentos difíceis.

Aos amigos que não estão mais no laboratório, mas que se encarregaram de me ensinar às principais técnicas, necessárias para meu trabalho. Da mesma maneira, que sentaram comigo pacientemente para interpretar e discutir os resultados obtidos. Eles me transmitiram sua experiência e despertaram em mim a capacidade de analisar e questionar os experimentos realizados. Ao Ricardo, Ana Elisa, Monica, Claudia, Daniel, Fabiola, Maira e Luciana Concepción.

Aos amigos do Laboratório da Professora Karina Bortoluci, inclusive a própria prof^a, a Carininha, a Alessandra e a Silvia. Por terem me ajudado com algumas técnicas e terem me emprestado gentilmente alguns reagentes. Por formar parte desta grande família que é o laboratório 244.

A todo o pessoal do Departamento de Imunologia, sempre disponível para compartilhar momentos agradáveis de diversão e por estarem realizando com excelente desempenho seus respectivos trabalhos. Ao Otacilio, Milton, Jotelma, Eni, Tiago, Amanda, Roberto. Aos porteiros da noite que sempre ficaram preocupados toda vez que ia embora após as 10hs da noite.

A toda a galera argentina que me ajudaram nos primeiros momentos em São Paulo e continuam sendo uma boa companhia. A eles que planejaram as nossas

“juntaderas de amigos” todo final de semana e às vezes receberam minhas desculpas por não conseguir ir, já que sempre tinha que fazer alguma coisa no laboratório. A vocês, Silvina, Jorge e Hector (aliás, Chichi), *“muchas gracias”*.

A minha família, minha mãe Teresa, meu pai Ramon, meus irmãos Gustavo e Marisa, a minha melhor amiga Malvina, a minha cunhada Analia. Para todos eles muito obrigada por suportarem minha ausência e serem tão pacientes comigo esperando o glorioso momento de minha volta pra Salta. Mesmo não compreendendo o motivo da distância eles sabem o grande motivo da minha estadia no Brasil e por isso fico feliz. Caros pais, agora estou colhendo os frutos que vocês tinham me falado pra esperar, valeu o sacrifício e não tenho nada para me arrepender. Aqueles valores que vocês me ensinaram foram e são muito importantes no meu desenvolvimento na vida. Obrigada por tudo.

Ao amor da minha vida, Santiago, por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos, suportando todos meus humores. Por *“cebarme unos mates”* enquanto conversávamos sobre aspectos de meu trabalho e do dele. Por ter me dado o apoio e conselhos toda vez que eu precisei e principalmente por ser como ele é, compreensível e paciente.

Agradeço às duas agências de financiamento CNPq e FAPESP que aportaram o dinheiro para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Zenteno ME. Relação entre o oncogene BCR-ABL e os receptores de tipo Toll (TLR) [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Recentemente, a expressão gênica dos receptores TLR foi encontrada em diversos tipos de células tumorais. A sua participação na biologia do câncer é controversa já que foram descritas ações pró e anti-tumorais após a ativação de sua sinalização. Na Leucemia Mielóide Crônica (LMC) nada se tem demonstrado. BCR-ABL é uma oncoproteína quimérica cujo sítio tirosina quinasa constitutivamente ativado promove inúmeras vias de sinalizações que desencadeia a transformação celular. Este trabalho se inicia com a hipótese de existir uma relação entre o oncogene *BCR-ABL* e a expressão dos receptores TLRs. Nós verificamos em células murinas TonB210.1 com expressão de BCR-ABL induzível por doxíciclina que *Tlr1* e *Tlr2* tem sua expressão gênica relativa aumentada na presença da oncoproteína. A regulação positiva de *Tlr1* é dependente da ação tirosina quinasa de BCR-ABL. Também mostramos que as vias p38 e JNK estão reprimindo a expressão de *Tlr1* induzida por BCR-ABL enquanto que a via ERK é utilizada pelo BCR-ABL para promovê-la. Por outro lado, observamos que a ligação de TLR1/TLR2 com seu agonista sintético Pam3CSK4 em células TonB210.1 BCR-ABL positivas induz um aumento da produção de IL-6 e leva ao aumento da resistência a morte quando induzida pelas drogas Ara-C e VP16. Em conclusão, estes resultados indicam que BCR-ABL esta regulando a expressão gênica de alguns TLRs. Por tanto esses dados contribuem para a compreensão sobre o comportamento de células tumorais BCR-ABL positivas em um contexto de infecção e por consequência, dão margem ao estudo de novos alvos de fator de risco para a LMC.

Palavras-chave: BCR-ABL. TLR. Leucemia Mielóide Crônica. Câncer.

ABSTRACT

Zenteno ME. Relationship between the oncogene BCR-ABL and Toll-like receptors (TLR) [Master Thesis (Imunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Recently, the gene expression of TLR receptors have been described in several kinds of tumour cells. Its participation in cancer biology is controversial because roles were already been described in pro and anti-tumoral activities after their signaling activation. In Chronic Myeloid Leukemia (CML) there are no published data. BCR-ABL is a quimeric protein and its tyrosine-kinase site is activated constitutively. Thus, many signaling pathways are activated and several cell processes are altered thereby resulting in cellular transformation. This work has started with the hypothesis that a putative relationship between the oncogene BCR-ABL and the expression of TLR receptors could exists. We verified in murine cells TonB210.1 BCR-ABL expression inducible by doxycycline that *Tlr1* and *Tlr2* have their relative gene expression up-regulated in the presence of the oncoprotein. Therefore the *Tlr1* regulation is dependent of BCR-ABL tyrosine kinase action. Using MAPK inhibitors we showed that p38 and JNK pathways are suppressing the TLR1 induction by BCR-ABL while ERK pathway is used by the oncoprotein for promote it. On the other hand, we observed in TonB210.1 BCR-ABL positive cells that the binding of TLR1/TLR2 heterodimer to their synthetic agonist Pam3CSK4 induced an increased production of IL-6 and when these cells were induced by Ara-C and VP-16 drugs the apoptosis resistance increased. In conclusion, these results indicate that the oncoprotein regulates the gene expression of some TLRs. Therefore, this fact gives us data about the behavior of BCR-ABL positive tumor cells in the context of infection and in consequence the study of new risk factor targets for CML.

Keywords: BCR-ABL. TLR. Chronic Myeloid Leukemia. Cancer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Ligantes de receptores TLR</i>	16
Figura 2. <i>Via de sinalização dos receptores TLR</i>	17
Figura 3. <i>Dominios estruturais das proteínas s-Src e c-Abl</i>	28
Figura 4. <i>Estruturas auto-reguladoras de c-Abl</i>	29
Figura 5. <i>Dominios estruturais da proteína BCR</i>	30
Figura 6. <i>Vias de sinalizações ativadas por BCR-ABL e os processos celulares envolvidos</i>	31
Figura 7. <i>Tratamento de células Ba/F3 e TonB210.1 com doxíciclina para a indução de BCR-ABL</i>	45
Figura 8. <i>STI 571 inibe a capacidade fosforilativa da tirosina quinase de BCR-ABL</i>	46
Figura 9. <i>Perfil de expressão gênica basal dos receptores Tlr nas linhagens murinas Ba/F3 e TonB210.1</i>	47
Figura 10. <i>Análises de expressão gênica dos receptores Tlrs nas linhagens murinas Ba/F3 e TonB210.1</i>	48
Figura 11. <i>Estrutura do gene Tlr1 murino com alguns dos fatores de transcrição preditos</i>	50
Figura 12. <i>Vias das MAPKs regulam a expressão gênica de Tlr1 na presença de BCR-ABL</i>	51
Figura 13. <i>O agonista sintético de TLR1/TLR2, Pam3CSK4, ativou a via de NFκB em uma concentração de 10µg/ml nas células TonB210.1 positivas e negativas para BCR-ABL</i>	53
Figura 14. <i>Células TonB210.1 com expressão de BCR-ABL apresentaram um aumento significativo de IL-6 na presença de Pam3CSK4</i>	54

Figura 15. <i>Pam3CSK4 não alterou a proliferação das células TonB210.1 com e sem a expressão de BCR-ABL.....</i>	55
Figura 16. <i>Células TonB210.1 com expressão de BCR-ABL são resistentes à morte celular induzidas por agentes inibidores da replicação celular.....</i>	56
Figura 17. <i>Modelo de regulação gênica de Tlr1 por BCR-ABL.....</i>	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 RECEPTORES TIPO TOLL (TLR).....	13
1.1.1 Sinalização TLR.....	16
1.2 IMPORTÂNCIA DOS TLRs NO CÂNCER	19
1.2.1 Aspectos pró-tumorais dos TLRs.....	21
1.2.2 TLR na terapia contra o câncer.....	24
1.3 BCR-ABL E LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA	26
1.3.1 Vias de sinalização de BCR-ABL e processos celulares envolvidos .	31
1.3.1.1 Via RAS.....	32
1.3.1.2 Via PI3K	33
1.3.1.3 Via JAK-STAT.....	33
1.3.1.4 Via NFκB.....	34
2 OBJETIVO	36
2.1 METAS ESPECIFICAS.....	36
3 MATERIAIS E METODOS	37
3.1 Materiais.....	37
3.2 Reagentes	37
3.3 Métodos	37
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Padronização de um modelo de BCR-ABL induzível por doxíciclina em células de camundongo	44
5.2 Inibição da ação tirosina-quinasa de BCR-ABL com mesilato de imatinibe (MI) e análises da expressão gênica dos <i>Tlrs</i>	45
5.3 A sinalização das MAPKs está envolvida na regulação da expressão gênica de <i>Tlr1</i>	49
5.4 Ativação da via de NFκB na presença do agonista de TLR1/TLR2.....	52
5.5 Pam3CSK4 induz um aumento da produção de IL-6 nas células BCR-ABL positivas.	53
5.6 A indução com Pam3CSK4 não altera a proliferação das células BCR-ABL positivas.	54
5.7 Pam3CSK4 induz quimioresistência nas células BCR-ABL positivas. .	55
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Regulação dos receptores de tipo Toll por BCR-ABL.	58
6.2 Participação das MAPK na regulação de <i>tlr1</i>	60
6.3 Ativação da via de sinalização de TLR1/TLR2 com Pam3CSK4	61
6.4 Consequências biológicas após ativação da via de sinalização de TLR1/TLR2 com Pam3CSK4.....	64
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS*	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)

A proteína Toll foi identificada inicialmente como uma molécula essencial na determinação dorsoventral de embriões de moscas *Drosophila* (Anderson et al., 1985). Anos mais tarde, Lemaitre et al. acharam uma nova função da proteína Toll, já não no desenvolvimento embrionário senão na defesa imune de moscas adultas contra infecções por *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996). Os autores viram que a indução da proteína Toll estimulava a produção de agentes antimicrobianos. Dessa forma, os dados demonstraram uma ativa participação da sinalização do receptor Toll na ativação da imunidade inata.

Simultaneamente, estudos moleculares mostraram uma alta homologia protéica entre membros das sinalizações da proteína Toll em *Drosophila* e o receptor de IL-1 em mamíferos. Nesse sentido, membros de ambas as sinalizações tais como as proteínas CACTUS e NFkB, respectivamente, compartilham a mesma função e estrutura protéica (Wasserman, 1993). Soma-se o fato das evidências mostrarem similitudes estruturais entre os domínios citoplasmáticos da proteína Toll e o receptor de IL-1 (Gay e Keith, 1991) o que sugere a existência de uma via conservada possivelmente ativada pelo receptor homólogo a proteína Toll em mamíferos. Foi no ano 1997 quando Medzhitov et al. descreveram a estrutura do homólogo humano da proteína Toll da mosca, hoje conhecida como TLR4 (Medzhitov et al., 1997). Mas o descobrimento que revolucionou a forma de observar a interação entre a imunidade inata e adaptativa para o combate de patógenos, foi o fato deles terem observado que mutantes constitutivamente ativados daquele homólogo protéico hToll (Toll humano) leva a ativação de NFkB e indução de genes de citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e moléculas co-estimulatórias como B7.1 (Medzhitov et al., 1997). Dessa forma foi demonstrado que a via Toll/NFkB é conservada desde invertebrados até vertebrados e que sinaliza para a ativação das células do sistema adaptativo e assim as informa da presença de patógenos.

O sistema imune inato a diferença do sistema imune adaptativo, reconhece microorganismos via receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*; PRR) de menor diversidade e especificidade quando comparados ao grande repertório de receptores rearranjados dos linfócitos T e B. Os

PRR têm a características de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) que são moléculas conservadas pertencentes ao patógeno e essenciais pra sua sobrevivência sendo que elas dificilmente apresentam muita variação. Os PRR por outro lado, são moléculas constitutivamente expressas nas células do sistema imune inato, não são clonais e sua ligação não gera memória imunológica.

Os receptores de tipo Toll (*Toll-like Receptors*, ou TLRs) fazem parte da primeira linha de defesa contra patógenos, portanto pertencem ao grupo de PRR. TLRs são uma família de 11 receptores identificados no ser humano e 13 em camundongos. Eles reconhecem uma variedade de estruturas moleculares em bactérias, vírus, fungos e protozoários (Kawai e Akira, 2007). Esses receptores são expressos nas células apresentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells*; APCs), células epiteliais, endoteliais e linfócitos T. A sinalização desses receptores culmina na indução de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, interferons de tipo I (IFN- α e - β) e a expressão de moléculas co-estimuladoras (Akira e Takeda, 2004).

A indução da expressão das moléculas B7 pela ligação dos receptores TLRs com PAMPs é um processo fundamental na ativação do sistema imune adaptativo. No transcurso do tempo evolutivo os receptores de tipo Toll foram selecionados para o reconhecimento de moléculas não próprias e a conseqüente estimulação do sistema imune. Em organismos superiores a indução de moléculas co-estimuladoras dirigida pela ligação dos TLRs, representa um grande avanço evolutivo já que esse processo permite a ativação e diferenciação de linfócitos T efetores. Sendo assim, os TLRs montam uma eficiente resposta imune efetora para a eliminação de microorganismos invasores.

Os TLRs são proteínas transmembrânicas tipo I cuja estrutura extracelular é formada por um ectodomínio com repetições ricas em leucinas (LRR), responsável pelo reconhecimento de PAMPs, e um domínio citoplasmático homólogo à região homônima do Receptor de IL-1 denominado Toll/IL-1 receptor (TIR), que desencadeia a sinalização dos TLRs (Bowie e O'Neill, 2000).

Existem dois grupos principais segundo sua localização celular (**Figura 1**). Os TLRs de membrana plasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11) e os TLRs endossomais (TLR3, 7, 8, 9). Existe outra subclassificação dependendo do tipo de ligante reconhecido pelos receptores. Neste sentido, a subfamília composta pelos TLR1, 2 e

6 reconhecem lipopeptídeos, enquanto os TLR3, 7, 8 e 9 compõem o grupo de reconhecimento dos ácidos nucleicos. TLR5 reconhece a proteína flagelina, principal componente do flagelo das bactérias presentes na lamina própria intestinal. Finalmente, o TLR4 se une a vários ligantes estruturalmente não relacionados, reconhecendo, principalmente, lipopolisacarídeos (LPS) da parede celular das bactérias gram-negativas, mas também a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (RSV), o paclitaxel, a fibronectina e proteínas de choque térmico (*heat shock protein*; HSPs) (Akira et al., 2006). TLR2 forma heterodímeros com TLR1, 6, CD36, para distinguir uma ampla variedade de PAMPs, tais como, peptidoglicanas, lipopeptídeos de bactérias gram-positivas e micoplasma, e zymosan de fungos, evidenciando cooperação entre os mesmos TLRs para o reconhecimento antigênico (Alexopoulou et al., 2001). O TLR11 do camundongo reconhece componentes ainda desconhecido de bactérias uropatogênicas e também as moléculas tipo profilina do parasita *Toxoplasma gondii* (Zhang et al., 2004).

Entre os TLRs endossomais; TLR3 reconhece RNA de dupla fita (*double strand RNA*; dsRNA) produzidos por vírus durante sua replicação (Alexopoulou et al., 2001); TLR7 reconhece RNA de fita simples (*single strand RNA*; ssRNA) provenientes de retrovírus, mas apresenta ligantes artificiais, tais como as moléculas sintéticas do tipo imidazoquinolinas, cujo representante principal é o imiquimod, assim também os análogos de guanosinas, tais como, loxorribine, embora exista outro ligante para este receptor, os siRNA (*small interference RNA*). TLR8 têm uma alta homologia com TLR7 e por essa questão também participa no reconhecimento de ssRNA (Heil et al., 2004) e TLR9 se liga a motivos CpG desmetilados, encontrados com frequência no DNA de vírus e bactérias.

Figura 1. *Ligantes de receptores TLR.*
 FONTE: Adaptado de Kawai e Akira (2010).

1.1.1 Sinalização TLR

A sinalização dos TLRs ativa a indução dos genes de citocinas inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β e IL-12, assim também induz a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador. Basicamente, dependendo do estímulo, podem ser ativados os fatores de transcrição $\text{NF}\kappa\text{B}$ e AP-1 para produção de citocinas inflamatórias e/ou IRFs para a produção de interferons tipo I (IFN- α e - β). Assim, moléculas provenientes de patógenos extracelulares serão reconhecidos principalmente pelos TLRs de membrana plasmática, TLR1, 2, 6, 4 e 5 que estimulam a produção apenas de citocinas pro-inflamatórias. Já, moléculas associadas a patógenos intracelulares como vírus ou bactérias que replicam dentro de endossomos, contatam e ativam os TLRs endossomais os quais induzem a produção de interferon de tipo I cujo principal efeito é a inibição da replicação celular das células infectadas.

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras que possuem domínios TIR em sua estrutura para interagir com o domínio TIR intracelular dos TLRs. São quatro as moléculas adaptadoras envolvidas na sinalização dos receptores TLRs, MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM (ou TICAM2) (Akira e Takeda, 2004). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção de TLR3, e ativa NFkB e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias. Por outro lado, TLR3 utiliza a molécula TRIF para sinalizar a produção de interferon de tipo I e citocinas inflamatórias via ativação dos fatores de transcrição, IRF3 e NFkB, respectivamente. TRAM e TIRAP são mais duas moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e pelo TLR2 e 4 para recrutar MyD88, respectivamente (**Figura 2**). Desta maneira, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas **via dependente de MyD88** para a produção de citocinas inflamatórias e **via dependente de TRIF** para a produção de interferon de tipo I principalmente.

Figura 2. Via de sinalização dos receptores TLR.
 FONTE: (Kawai e Akira, 2007)

Como pode ser observado na **Figura 2**, TLR4 é o único receptor que utiliza as quatro moléculas adaptadoras para desencadear sua sinalização. A produção de

citocinas inflamatórias induzidas por este receptor necessita da ativação de NFkB pelas duas vias, dependente de MyD88 e TRIF.

Na **via dependente de MyD88**, inicialmente é recrutada e ativada a molécula IRAK4 (*IL-1 receptor-associated kinase 4*) após a ligação do receptor TLR com seu PAMPs cognato. Esta ativação promove a interação de TRAF6, uma E3 ligasa que cataliza a poliubiquitinação de Ly63 (K63) de proteínas alvos. Dessa forma, o complexo regulatório de TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*) é recrutado e ubiquitinado com a conseqüente ativação desta molécula. A partir de TAK1 duas vias diferentes são ativadas. Por um lado, a cauda de ubiquitinas na K63 recruta a proteína NEMO do complexo inibitório IKK, envolvido na ativação de NFkB, e o aproxima da molécula TAK1. Dessa forma a quinasa TAK1 consegue fosforilar e ativar a subunidade IKKβ com a subseqüente fosforilação e degradação da proteína inibidora de NFkB, IκBα. Por fim, NFkB fica liberado e consegue translocar pro núcleo celular e ativar a transcrição de citocinas inflamatórias, as quais incluem IL-6 e IL-12. A outra via ativada por TAK1 é a via das MAPKs. Sendo TAK1 uma MAPKKK, ela é encarregada da ativação das vias de p38MAPK, JNK e ERK. Assim, diversos fatores de transcrição são ativados inclusive o fator AP-1. Tal fator é um fator de transcrição dimérico composto por monômeros das subfamílias protéicas c-jun, c-fos e ATF, sendo o c-jun o que têm o papel mais relevante na resposta inflamatória da sinalização TLR (Kawai e Akira, 2010).

A **via dependente de TRIF** se inicia com a ligação dos receptores TLR3 ou 4. Esta molécula adaptadora recruta TRAF6 que ativa TAK1 para a posterior ativação de NFkB. Provavelmente por mecanismos de ubiquitinação similares aos descritos anteriormente para a sinalização dependente de MyD88. Uma molécula primordial para ativação de NFkB via TRIF na resposta pela ativação de TLR3 é a proteína RIP1. Deficiências nas moléculas que ubiquitinizam RIP1, não mostram ativação de NFkB via TRIF embora exista ativação pela via dependente de MyD88. Desta maneira, com a ativação de NFkB e MAPK, a partir da ativação previa de TAK1, é induzida a produção de citocinas inflamatórias. Simultaneamente, assim como TAK1 na via de MyD88, TRIF sinaliza para outra via que induz a produção de interferon-β na estimulação do receptor de TLR3. Assim, TRIF se associa com a proteína TRAF3 e sinaliza a ativação da proteína TBK1 (TANK-binding kinase1) que por sua vez

fosforila e ativa o fator de transcrição IRF3 pra este translocar ao núcleo e induzir a produção de interferon- β .

Além das duas vias descritas acima, existe outra sinalização desencadeada pelos receptores de reconhecimento de ácidos nucleídos, TLR7 e 9. Tal via caracteriza-se pela produção de interferon de tipo I (IFN- β e IFN- α) de forma dependente de MyD88, independente de TRIF e com ativação do fator de transcrição IRF7 (*Interferon Regulatory Factor 7*). Esses receptores de tipo Toll são constitutivamente expressos em células dendríticas plasmocitóides (pDC) conhecidas como células típicas produtoras de IFN tipo I e por tal motivo com relevante participação na resposta imune anti-viral. A produção de interferon de tipo I pelas células pDC na estimulação dos receptores TLRs encontra-se seriamente comprometida na ausência da proteína ICSBP (*Interferon Consensus Site Binding Protein*), também conhecido como IRF8 (Kawai e Akira). Ele é um fator de transcrição da via de sinalização dos IFN- α e - β , que estimula um processo de retroalimentação positiva para aumentar a produção de IFN de tipo I. Esse fato determina um papel fundamental desta proteína, assim como da ativação dos TLR7 e 9, para a produção das citocinas essenciais para o combate das doenças virais (Honda et al., 2004; Kawai et al., 2004).

1.2 IMPORTÂNCIA DOS TLRs NO CÂNCER

A inflamação é um processo fundamental na resposta imune, principalmente porque estimula a ação do sistema para eliminação de patógenos, para o reparo e remodelação tissular e a volta a homeostases. Para que tudo isso aconteça, precisa de um alerta inicial através da secreção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de células do sistema imune. Recentemente, importantes observações concluíram que o estabelecimento do estado de inflamação crônica por infecção ou injúria é um importante fator de risco para o câncer (Coussens e Werb, 2002). Alguns exemplos neste sentido foram observados no desenvolvimento do câncer de estômago na presença de inflamação crônica estimulada pela infecção com *Helicobacter pylori* e a transformação neoplásica de células hepáticas em infecções com vírus da Hepatite B e C (Fukata e Abreu, 2009; Peek e Blaser, 2002). Acredita-se que o microambiente tumoral compartilha características similares ao local de inflamação

crônica, mesmo na inflamação estéril produzida na ausência de patógeno (Dvorak, 1986). De certa maneira, esses locais possuem fatores que suportam a iniciação, manutenção e progressão da neoplasia de células vizinhas. O principal fato que comprova esta afirmação é a diminuição do risco de desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias pelo uso de drogas anti-inflamatórias (Gupta e Dubois, 2001; Robak et al., 2008).

O reparo e geração de tecido após insultos injuriosos é um processo complexo no quais receptores de tipo Toll foram primariamente envolvidos. A sinalização dos TLRs resulta ser essencial na manutenção da integridade tissular e reparo do tecido danificado em modelos de injuria colônica provocada por infecção, radiação ou químicos (Fukata et al., 2005; Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2008; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Assim também, TLR participa ativamente na regeneração tissular após a parcial hepatectomia (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2008; Seki et al., 2005). Sua contribuição baseia-se na produção de citocinas e fatores que são sinais de sobrevivências para as células teciduais que repovoarão o local injuriado ao tempo que previnem a apoptose daquelas. Um desses fatores é a produção de prostaglandina, via regulação de Cox-2 pelas células do estroma tecidual na inflamação por injuria (Brown et al., 2007; Fukata et al., 2006). Conseqüentemente, a prostaglandina e outros produtos da ativação dos TLRs, tais como quimiocinas, VEGF e metaloproteasas de matriz extracelular (Fukata et al., 2006; Pull et al., 2005; Rakoff-Nahoum et al., 2004), têm efeitos na arquitetura tissular ao estarem envolvidos na angiogênese e remodelação do tecido danificado.

Recentes evidências demonstraram que TLRs pode também regular a morte celular. Tal regulação pode ser um efeito direto, como demonstrado por Monick et al. em células de macrófagos estimulados por LPS que leva ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como A1, c-IAP1, c-IAP2 e XIAP (Monick et al., 2001). Ou um efeito indireto de regulação da morte a partir da liberação de fatores após ativação da sinalização TLR que age nas células vizinhas. Como foi mostrado por nosso grupo de pesquisa através do trabalho que explica a ação da PGE2 presente no sobrenadante de cultura de macrófagos tratados com LPS na resistência à morte por AICD (*activation-induced cell death*) de hibridomas de linfócitos T (Weinlich et al., 2008).

Na inflamação não infecciosa, a ativação dos receptores TLRs pode acontecer pelo reconhecimento de moléculas intracelulares derivadas de células que morreram por necrose, mas não por apoptose. Este grupo de moléculas chamasse conjuntamente de DAMPs (*Damage Associated Molecules Patterns*) já que indicam sinais de perigo por perda da integridade tissular provocada por injúria e formam parte dos ligantes endógenos de TLRs. Entre eles podemos citar moléculas associadas à estrutura da mitocôndria como são as HSPs (*Heat Shock Proteins*) e a molécula associada à cromatina, HMGB1 (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009).

1.2.1 Aspectos pró-tumorais dos TLRs

O papel dos TLR na biologia do câncer atingiu maior relevância devido aos múltiplos processos celulares que sua sinalização controla, além da simples ativação do sistema imune. A literatura é variada e às vezes, controversa na hora de definir uma função específica para esses receptores imunes. Enfim, a relação entre TLRs e câncer não está determinada e tudo mostra que a o envolvimento destes depende do tipo de câncer e suas características microambientais. A **Tabela 1** fornece exemplos de processos celulares que demonstram o envolvimento direto da sinalização dos TLR no benefício das células tumorais.

Tabela 1 - Efeitos pró-tumorais dos TLRs

Pró-tumoral	TLR
Pró-angiogênico	2,9
Proliferação	3,4
Quimioresistência	4
Ativação de Treg	4,5

FONTE: Adaptada de Wolska et al. (2009).

O primeiro indicativo de que a sinalização TLR poderia ter um efeito pro-tumoral vem de trabalhos de transferência adotiva de células transformadas. Foi observado que o estímulo dos receptores TLRs com seus agonistas desencadeia o crescimento dos tumores. Em modelos murino de câncer, utilizando linhagens

celulares de hepatocarcinoma, foi evidenciado o crescimento tumoral quando LPS foi injetado intraperitonealmente (Luo et al., 2004).

Paralelamente, estudos indicam que células de vários tipos de tumores induzem a expressão dos receptores TLRs quando comparados as células controles normais (**Tabela 2**). Tal expressão em células de câncer mostrou ter um papel essencial no desenvolvimento das neoplasias. Assim, foi demonstrado que camundongos deficientes de tais receptores imunes são protegidos da formação de tumores quando induzidos em modelos experimentais (Fukata et al., 2007; Swann et al., 2008; Wolska et al., 2009). Ensaios *in vitro* demonstraram que o silenciamento gênico com siRNA (*small interference*; RNA) do receptor TLR4 em linhagens de câncer de próstata provoca a diminuição da capacidade proliferativa após a ligação com LPS (Kundu et al., 2008). Em um trabalho similar, a diminuição da expressão gênica de TLR2, também com siRNA, de células de hepatocarcinoma induz a redução do crescimento tumoral em camundongos Balb/c (Huang et al., 2007). Em conclusão, as evidências demonstram que a regulação gênica positiva dos receptores do tipo Toll nas células tumorais leva a produção protéica deles capazes de sinalizar e provocar o crescimento celular observado.

Tabela 2 - Expressão dos receptores TLRs em diversos tipos cânceres humanos

Células e tecidos	TLR
Carcinoma Gástrico	TLR4, 5, 9 (IHQ); 4, 5 (FT)
Câncer Colon	TLR1-4 (PCR); TLR2 (FT)
Carcinoma Hepatocelular	TLR2, 3, 4, 6, 9 (PCR)
Câncer de Ovario Epitelial	TLR4 (PCR, IHQ, WB, FT)
Carcinoma de células escamosas epiteliais	TLR5, 9 (IHQ, FT)
Câncer de mama	TLR4, 9 (PCR, DNAarray); TLR9 (IHQ, WB, FACS, FT)
Câncer de Próstata	TLR9 (IHQ, WB, FT)
Câncer de Pulmão	TLR2, 3, 4, 9 (PCR); TLR4 (FACS); TLR9 (IHQ, HIS, FT)
Melanoma	TLR3 (WB); TLR4 (PCR, IHQ); TLR3, 4 (FT)
Neuroblastoma	TLR4 (PCR, FACS, FT)

FONTE: Adaptada de Yu e Chen (2008).

IHQ: Imunohistoquímica; PCR: Reação em cadeia da Polimerase; FT: Função testada; WB: Western Blotting; FACS: Citometria de Fluxo; HIS: Hibridização *in situ*.

Existem controvérsias respeito a funcionalidade dos receptores TLR nas células transformadas. Diversos efeitos foram descritos após ativação da sinalização dos TLR em células tumorais. Algumas das evidências que conetam directamente os

TLRs com o desenvolvimento do câncer vêm de estudos *in vitro* de ativação da sinalização diretamente nas células transformadas. Assim, Huang et al. demonstraram que a ligação de TLR2 com *Listeria monocytogenes* em células de hepato-carcinoma promove o crescimento tumoral e estimula o aumento da produção de IL-6 e óxido nítrico (Huang et al., 2007). Outros fenótipos foram observados pelos autores, tais como aumento da proliferação celular, resistência a apoptose e metástases das células tumorais ao regular a secreção de metaloproteínas e integrinas. Em relação ao fenótipo de remodelação da matriz extracelular e promoção de metástase, observou-se que o estímulo com agonista de TLR9 em linhagens tumorais de mama MDA e MDB-231 promoveu a invasão celular ao aumentar a atividade da metaloproteinase de matriz 13 (MMP13) (Kent et al., 2002; Merrell et al., 2006).

Dentre as doenças hematológicas, o mieloma múltiplo demonstrou utilizar a sinalização TLR para a sobrevivência e proliferação das células transformadas. Estudos feitos em células de pacientes e linhagens celulares mostraram o aumento da sobrevivência celular na presença de CpG, o agonista de TLR9, quando submetidas a baixa quantidade de soro fetal bovino (2%) na cultura. Esse mesmo agonista tornou as células tumorais resistentes à morte por apoptose induzida pela droga dexametasona. Paralelamente, em outro ensaio, os autores demonstraram que o agonista de TLR7, loxoribine, também protege às células da morte induzida pela dexametasona. A secreção da citocina IL-6 no meio extracelular mostrou ser crucial no processo de proliferação das células tumorais já que o uso de anticorpo anti-IL6 bloqueou o aumento celular quando comparado com o controle tratado com IgG e CpG (Jego et al., 2006). Simultaneamente, Bohnhorst et al. confirmou o envolvimento da sinalização de outros receptores TLRs na proliferação e sobrevivência em linhagens celulares de mieloma múltiplo e em células derivadas de pacientes. Dito trabalho demonstra o aumento da proliferação celular, medido com timidina triciada, induzida após a ligação do Pam3Cys e o receptor heterodimérico composto por TLR1/2. O mesmo resultado pode ser observado quando as células são induzidas com agonistas de TLR4, 7 e 8. Novamente foi confirmada a participação da citocina IL-6 no aumento da proliferação e sobrevivência das células, comprovado pela diminuição da proliferação de células tratadas com Pam3Cys

quando anticorpos anti-IL-6 estão presentes no meio de cultura (Bohnhorst et al., 2006).

1.2.2 TLR na terapia contra o câncer

A terapia anti-tumoral utilizada atualmente consiste no ataque de células em divisão através de quimioterapia e radioterapia. O sucesso do tratamento depende do tipo de câncer, já que cada neoplasia apresenta características particulares de sobrevivência e evasão imune. O estudo da biologia das células cancerosas mostrou um persistente ambiente imunossupressor ao redor das células transformadas (Liu et al., 2007). Portanto, terapias que colaborem com o sistema imune na eliminação das células cancerosas são de extrema importância. Para isso, é preciso que células apresentadoras de antígenos circundem esses ambientes e consigam estimular o sistema imune adaptativo, principalmente as células T citotóxicas (CTL), encarregadas de eliminar especificamente as células tumorais. Elas induzem apoptose através de granzimas e perforinas, assim como via FasL, estimulando Fas nas células alvo.

Assim, tomando vantagem da expressão dos receptores de tipo Toll em células tumorais, foi aproveitada sua sinalização para quebrar a imunossupressão dos microambientes tumorais. Estudos pioneiros iniciados há 100 anos por William Coley demonstraram a promoção da resposta anti-tumoral em vários tipos de câncer após administração repetida de extrato cru de micróbios (*streptococos*) (Huang et al., 2008). Anos mais tarde foi comprovada a melhoria de pacientes com câncer de bexiga após aplicação da vacina BCG, concluindo-se na atuação dos TLRs 2 e 4 neste fenômeno (Uehori et al., 2003).

Na área das doenças mieloproliferativas hematológicas foram realizados amplos avanços na utilização dos agonistas de TLRs na imunoterapia. Tem sido descrito o uso dos agonistas de TLR7 e 9 na terapia de Leucemia Linfóide Crônica (CLL). Sequências ricas em CpG DNA representam o agonista de TLR9 capaz de estimular as células CLL um aumento da expressão de MHC classe I, moléculas co-estimuladoras, incluindo membros da família B7 (CD80 e CD86), moléculas de adesão e moléculas da família do receptor TNF- α (Spaner e Masellis, 2007). Ensaio *in vitro* demonstraram que células leucêmicas só se tornaram sensíveis à

ação das CTL (linfócitos T citotóxicos) depois de vários dias de ativação com agonistas de TLRs (Spaner et al., 2008).

Resultados similares foram encontrados na Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Smits et al., 2010). Eles observaram um aumento da imunogenicidade em culturas primárias de pacientes e em linhagens celulares quando tratadas com resiquimod, um agonista dos receptores TLR7/8, obtendo-se, como resultado, o aumento da expressão das moléculas do MHC, da produção de citocinas pró-inflamatórias e da ativação de células T virgens alogênicas.

A revisão de Schon et al. (2008) descreve porque os receptores de TLR7, 8 e sua sinalização são considerados novos alvos para a terapia do câncer. Eles descrevem o fato da produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores através da ativação do NFkB, pode gerar uma predominante resposta anti-tumoral quando se utiliza imiquimod. São citados trabalhos que demonstram como células dendríticas adquirem uma atividade anti-tumoral sob estimulação com aquele agonista provocando, ao mesmo tempo, uma diminuição da ação dos mecanismos supressores atuantes no microambiente tumoral.

A importância do estudo desses receptores endossomais na terapia do câncer baseia-se na produção de IFN do tipo I. Neste sentido, existe um trabalho interessante na Leucemia Mielóide Crônica, onde os autores observaram o aumento significativo da sobrevivência de camundongo Balb/c injetados com células BaF/3 que expressam ectópica e simultaneamente as proteínas BCR-ABL e ICSBP, quando comparadas as células que só expressam a oncoproteína BCR-ABL. É importante destacar que pacientes com CML têm baixos níveis de ICSBP nas células que expressam BCR-ABL e que o tratamento com IFN- α e - β leva a melhoria do quadro clínico destes pacientes (Nardi et al., 2009).

Com todas as evidências descritas no envolvimento dos receptores TLRs nos diversos tipos de cânceres, surgiu o interesse em investigar a sinalização destes receptores em células que expressam BCR-ABL.

1.3 BCR-ABL E LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A Leucemia Mielóide Crônica é uma doença mieloproliferativa, caracterizada pela expansão clonal e transformação das células-tronco primitivas e pluripotentes.

A anormalidade citogenética marcante na LMC é uma translocação cromossômica t(9;22) (q34;q11) que envolve os genes bcr (breakpoint cluster region) localizado no cromossomo 22 e o gene c-Abl (Abelson leukemia vírus) no cromossomo 9. Assim se forma o pequeno cromossomo chamado “cromossomo Filadélfia” que contém em sua estrutura a fusão gênica *BCR-ABL* cujo produto transducional é a oncoproteína quimérica e homônima, com constitutiva atividade tirosina-quinase (Pane et al., 2002).

A LMC é uma doença trifásica. A fase inicial chamasse de **fase crônica**, momento no qual se observa uma expansão massiva da linhagem celular granulocítica contendo a molécula BCR-ABL. Esta fase é assintomática, apresenta a capacidade de diferenciação celular dentro dos valores normais, e têm uma duração de 3 a 4 anos. Seguidamente, a leucemia pode progredir para a **fase acelerada** onde o paciente sofre um aumento do número de blastos no sangue periférico e o tratamento começa a não ter efeito. Na última fase chamada **fase blástica** caracteriza-se por ser aguda e geralmente fatal. Ocorre um bloqueio da diferenciação celular na medula óssea, liberando-se no sangue periférico 30% ou mais de células blásticas linfóides ou mielóides (Ren, 2005), além de outras desordens genéticas e/ou epigenéticas.

O principal tratamento para esta doença é o transplante definitivo de medula óssea, mas o sucesso depende da idade do paciente e disponibilidade de doadores compatíveis (Goldman e Druker, 2001). A intervenção terapêutica de primeira linha é a medicação com mesilato de imatinibe (Glivec, STI571, CGP57148) desenvolvido como um potente inibidor da tirosina-quinase c-Abl, que induz apoptose seletivamente nas células BCR-ABL-positivas. O Glivec inibe a autofosforilação de c-Abl por competir no sítio catalítico com ATP. Em pacientes recentemente diagnosticados com LMC em fase crônica, o imatinibe induz uma completa resposta citogenética em um 80% dos doentes, evidenciada com a ausência do cromossomo Filadélfia nas células da medula óssea (Hehlmann et al., 2007). Estudos moleculares mostram que a indução de morte das células BCR-ABL-positivas pelo imatinibe

consiste, entre outros mecanismos, no aumento da produção de duas proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, Bim e Bad, que estavam sendo silenciadas pela oncoproteína (Kuroda et al., 2006).

A aquisição de mutações pontuais no sítio catalítico de c-ABL é uma das causas de resistências ao glivec dependente de BCR-ABL (Gorre e Sawyers, 2002). Uma das mutações mais estudadas corresponde à substituição da treonina 315 por isoleucina. Este resíduo está localizado dentro de sítio catalítico, T315I. Tal mutação desencadeia resistência ao Glivec já que a treonina 315 participa ativamente da ligação da droga no sítio catalítico através de pontes de hidrogênio com sua cadeia lateral (Quintas-Cardama e Cortes, 2009). Para superar este problema, outros inibidores de tirosina-quinases foram desenvolvidos e estão sendo utilizados no tratamento da LMC, em pessoas que não respondem ao mesilato de imatinibe. Dentre eles podemos nomear os inibidores de segunda geração tais como nilotinib e dasatinib que inibem membros da família SRC além do c-Abl (Weisberg et al., 2007). Mesmo assim há pacientes que evoluem drasticamente da fase crônica para a blástica, onde os tratamentos deixam de ter efeito e a expectativa de vida é de aproximadamente seis meses (Hehlmann et al., 2007).

O estudo de uma proteína fusionada, no caso de BCR-ABL, fomenta o estudo individual da estrutura e função das proteínas integrantes daquela quimera.

c-Abl é produto de um proto-oncogene que pertence à família das tirosinas quinases de tipo não receptor. Esta proteína de 145 KDa tem funções dentro de núcleo celular e no citoplasma. Regula diversos processos celulares tais como mitogênese, migração, adesão, resposta ao dano no DNA, sobrevivência e resposta ao estresse oxidativo (Sirvent et al., 2008). A organização estrutural dos domínios de c-ABL é similar a proteína quinase SRC, assim ambas as proteínas possuem um domínio SH1 tirosina quinase, SH2 e SH3 na direção do extremo N-terminal (**Figura 3**). Já na extremidade C-Terminal, a molécula c-Abl apresenta uma sequência rica em prolina (PXXP) que interage com motivos SH3 de proteínas adaptadoras; um sítio de ligação ao DNA; um sítio de união para F-actina e outro para G-actina; sinais de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES) (Sirvent et al., 2008).

Figura 3. Domínios estruturais das proteínas c-Src e c-Abl.
 FONTE: Adaptado de Sirvent et al. (2008).

As funções e localizações desta proteína são estritamente reguladas em consideração ao número de processos celulares em que c-Abl está envolvida, já que uma vez desregulada pode levar à transformação celular. Exemplos de c-Abl oncogênicas podem ser citados as proteínas v-Abl e BCR-ABL que são estritamente citoplasmáticas e cuja tirosina quinase está ativada constitutivamente (Sirvent et al., 2008). Em células normais c-Abl encontra-se em uma conformação inativa auto-inibitória que consiste no domínio SH2 e SH3 participando conjuntamente na oclusão do sítio catalítico evitando o ingresso do substrato e do ATP (Hantschel e Superti-Furga, 2004). Além de c-Abl apresentar duas conformações estruturais: ativa e inativa, ela possui mais um nível de regulação. Tal nível baseia-se na ativação da proteína por auto-fosforilação da tirosina Y214 localizada no loop de ativação (**Figura 4**). Quando este resíduo não está fosforilado, o loop de ativação encontrasse dentro do sítio quinase de c-Abl evitando dessa forma a ativação da molécula (Dorey et al., 2001). A fosforilação acontece por um mecanismo auto-catalítico *in trans* e se refere às fosforilações cruzadas entre proteínas iguais após previa homo-oligomerização (Dorey et al., 2001). Foi demonstrado que para uma total ativação é necessário a fosforilação também da tirosina Y245 situada no domínio de ligação entre SH2 e a quinase (Brasher e Van Etten, 2000) (**Figura 4**).

Figura 4. Estruturas auto-reguladoras de c-Abl.
FONTE: Sirvent et al. (2008)

Camundongos neonatos com c-Abl contendo uma mutação não funcional morrem precocemente e aumenta a susceptibilidade as infecções, presumivelmente pelo comprometimento do desenvolvimento de linfócitos B e T (Schwartzberg et al., 1991; Tybulewicz et al., 1991).

BCR é uma proteína de 160 KDa que é ubiquamente expressa. Sua estrutura protéica esta formada por um domínio de dimerização (DD) no extremo N-terminal seguido do domínio serina/treonina-quinase cujos substratos identificados correspondem a BAP-1 da família 14-3-3 (Reuther et al., 1994) assim também o próprio BCR (Laneuville, 1995). No centro da molécula encontrassem os domínios homólogos a plecstrina (PH) e homologo a *dbl* que estimulam a troca de guanidina trifosfato para guanina difosfato pelos fatores trocadores de guanidina RHO (Denhardt, 1996). Já o extremo C-terminal tem um domínio com atividade GTPase para RAC, o qual regula a polimerização de actina e a atividade da NADPH oxidase em células fagociticas (Diekmann et al., 1995) (**Figura 5**).

Figura 5. Domínios estruturais da proteína BCR.
 FONTE: Sirvent et al. (2008)

Embora se saiba que BCR ativa várias vias de sinalizações a partir de seus domínios de ligação, sua relevância biológica ainda não foi bem estabelecida. De fato, foi demonstrado que camundongos KO para BCR possui um deficiente *burst* oxidativo em células neutrofílicas (Voncken et al., 1995), sugerindo uma função anti-microbial em células mielóides.

Dependendo do sítio de quebra da molécula BCR podem ser gerados três tipos de proteínas quiméricas BCR-ABL (**Figura 5**). Cada tipo desenvolve formas diferentes de leucemia. Assim, a isoforma de 230 kDa está relacionada com a leucemia crônica neutrofílica (Pane et al., 1996), enquanto que a isoforma de 210 kDa é responsável pela leucemia mieloide crônica e a de 190 kDa está envolvida em algumas formas de leucemia linfocítica aguda (Chopra et al., 1999).

A expressão da oncoproteína BCR-ABL é uma condição necessária e suficiente para a transformação das células na LMC, uma vez que sua presença demonstrou ter um papel fundamental em sua patologia (Melo et al., 2003). A proteína fusionada proporciona sítios de ligação para o desencadeamento de inúmeros processos celulares que em células normais sem modificação citogenética são finamente controlados. Sendo assim, c-Abl perde sua conformação inativa na fusão com a proteína BCR e dessa forma observa-se a constitutiva ação catalítica de seu domínio tirosina-quinase (Pendergast et al., 1991). Por outro lado, BCR possui domínios de oligomerização (DO) que fornece à proteína quimérica a capacidade de agrupar-se e conseqüentemente estimular as auto-fosforilações nas tirosinas Y245 e Y412 que ativam a molécula de c-ABL (Hantschel e Superti-Furga, 2004). Tauchi et

al. (1997) demonstrou que mutações em tal motivo de homo-oligomerização evita a transformação celular de células de fibroblastos murinos contendo BCR-ABL (Tauchi et al., 1997). A dimerização molecular de c-ABL demonstrou ser importante na transformação celular e ativação dessa molécula, já que esses mesmos efeitos foram observados na proteína quimérica TEL-ABL onde os domínios de oligomerização são proporcionados pela proteína TEL em substituição ao BCR (Golub, 1997).

1.3.1 Vias de sinalização de BCR-ABL e processos celulares envolvidos

Numerosas vias de sinalização são ativadas em células que expressam BCR-ABL. Em consequência, os principais processos celulares alterados pelas inúmeras proteínas ativadas simultaneamente são: diminuição da adesão das células ao estroma da medula óssea (Gordon et al., 1987), expressão e função alterada das moléculas de adesão (Bhatia et al., 1994), inibição da apoptoses em células dependente de fatores de crescimento (Bedi et al., 1994) e detenção da diferenciação celular nas fases aguda da doença (Quintas-Cardama e Cortes, 2009).

Figura 6. Vias de sinalizações ativadas por BCR-ABL e os processos celulares envolvidos.
 FONTE: Adaptada de Marley e Gordon (2005).

1.3.1.1 Via RAS

Esta via de sinalização está envolvida na transformação de fibroblastos ativada por BCR-ABL. A mutação na tirosina Y177 por fenilalanina evita a união de GRB-2 e diminui a ativação de RAS (Pendergast et al., 1993). Através desta mutação se observa diminuição da transformação em células primárias da medula óssea mesmo com a constitutiva atividade quinase de c-ABL (Pendergast et al., 1993). Aquela tirosina 177 quando fosforilada serve como sítio de reconhecimento pelo domínio SH2 da proteína GRB2 que posteriormente recruta SOS (*Son os sevenless*, trocador de nucleotídeos guanina) o que resulta na ativação de RAS (Ren, 2005). Na ausência de GRB-2, ainda pode ser observado o fenótipo transformante pelo BCR-ABL e a molécula RAS ainda está ativada. Atualmente sabe-se que existem outras proteínas adaptadoras recrutadas por BCR-ABL, como CRKL e SHC que ativam alternativamente RAS (Goga et al., 1995; ten Hoeve et al., 1994).

A principal via ativada pela proteína RAS (**Figura 6**) corresponde à família das MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) que são proteínas serinas-treoninas kinases. Elas incluem três tipos de serinas-treoninas kinases sendo elas ERK (*extracellular signal regulated kinase*), JNK/SAPK (*jun N-terminal kinase*, *Stress-activated protein kinase*) e p38MAPK. As MAPKs são ativadas após prévia ativação de receptores tirosinas kinases e regula uma variedade de processos celulares, tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação (Kim e Choi, 2010). Em células expressando BCR-ABL foi demonstrado que as vias ERK e JNK estão sendo ativadas pela proteína RAS e ambas as vias são requeridas para a atividade transformante (Chopra et al., 1999; Raitano et al., 1995).

A transformação da célula por BCR-ABL é descrita como a capacidade destas células se tornarem capazes de proliferar independentemente de citocinas de crescimento (Daley e Baltimore, 1988). Da mesma forma, camundongos irradiados letalmente e reconstituídos com medula óssea BCR-ABL positiva desenvolvem várias neoplasias hematológicas inclusive a síndrome similar a LMC (Daley et al., 1990). Em relação à ativação das vias de sinalização Ras-Raf-Erk e Ras-Raf-JNK, foi demonstrado que as moléculas c-myc e ciclina D1 são os principais responsáveis do aumento de proliferação das células Filadélfia positivo (Raitano et al., 1997).

1.3.1.2 Via PI3K

A proteína PI3K esta formada por duas subunidades p85 (regulatória) e p110 (catalítica). A primeira subunidade funciona como proteína adaptadora sendo recrutada através de seus domínios SH2 e SH3, dessa forma permite à subunidade catalítica interagir com tirosinas kinases de tipo receptor e citoplasmáticas que a levaram a sua ativação enzimática (Margolis, 1992). PI3K esta envolvida na sinalização induzida pela ligação de RTK (*receptor tyrosine kinase*) participando assim dos processos de mitogênese, transformação celular e apoptoses (Coughlin et al., 1989; Wages et al., 1992). Sua interação com a proteína BCR-ABL foi demonstrada a partir de ensaios de imunoprecipitação mostrando que a subunidade p85 de PI3K co-precipita com a oncoproteína em linhagem celular CML (Gotoh et al., 1994). Avaliando a funcionalidade desta interação, Skorski et al. (1995) observou a inibição da proliferação em linhagens celulares filadelfia positiva assim também em células CML primarias na presença de wortmannin, um potente inibidor da subunidade catalítica p110 de PI3K (Skorski et al., 1995).

1.3.1.3 Via JAK-STAT

O crescimento normal das células é controlado por citocinas. IL-3 e GM-CSF (*granulocyte/monocyte colony stimulating factor*) são duas citocinas que regulam o crescimento e diferenciação das células mielóides (Raitano et al., 1997; Warren et al., 1995). Os receptores de cada uma destas citocinas transduz um sinal intracelular com ativação de JAK (*Janus-Activated Kinase*) que fosforila e ativa os fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (Schindler e Darnell, 1995). BCR-ABL ativa constitutivamente as vias de JAK e STAT (STAT1 e 5) em células hematopoiéticas (Carlesso et al., 1996; Shuai et al., 1996) substituindo o sinal das citocinas de crescimento e por consequência a regulação da sobrevivência celular estabelecida pelas mesmas.

A via JAK-STAT também esta envolvida no processo de apoptose. STAT5 que esta sendo ativada constitutivamente por BCR-ABL, dirige à ativação transcripcional da proteína anti-apoptotica Bcl-xL (Gesbert e Griffin, 2000).

1.3.1.4 Via NFkB

NFkB é um complexo de fatores de transcrição ativados em resposta a citocinas inflamatórias. Esta envolvida na resposta imune, proliferação e diferenciação. Reuther et al. (1997) mostrou que BCR-ABL ativa os genes dependente de NFkB e que tal ativação foi parcialmente mediada por RAS e dependente da tirosina quinase de BCR-ABL (Reuther et al., 1998). Foi demonstrado também que a ativação desta molécula também foi requerida para a tumorigênese induzida por BCR-ABL em camundongos nude (Reuther et al., 1998).

Durante apoptose induzida por TNF foi observado que a ativação de NFkB suprime a ativação de caspase 8 e por tanto inibe a morte celular (Wang *et al.*, 1998).

Além de sua capacidade transformante, BCR-ABL torna as células, que a possuem, altamente resistentes à apoptose induzida por escassez de citocinas (Cortez et al., 1995; Kabarowski et al., 1994) ou quando induzida por agentes quimioterápicos (Bedi et al., 1995). Por outro lado, BCR-ABL também foi envolvida na resistência a morte induzida por Fas (McGahon et al., 1995). Algumas explicações da literatura para estes fenômenos sugerem que a oncoproteína esteja alterando os controles do ciclo celular (Bedi et al., 1995) ao tempo que leva a superexpressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 como por exemplo a superexpressão da proteína Mcl-1 (Deininger et al., 2000). Paralelamente, já foi descrito Mcl-1 sendo regulado positivamente em varios cânceres desenvolvendo uma principal atuação na resistência as drogas anti-câncer (Warr e Shore, 2008) e ao próprio mesilato de imatinibe (Zimmerman et al., in press 2010).

Quanto à participação de RAS na geração de sinais anti-apoptóticos, foi demonstrado que a expressão constitutiva de Mcl-1, um membro anti-apoptótico da família Bcl-2, depende da via de Ras/Raf/MEK e que a inibição de Mcl-1 diminui a sobrevivência e aumenta a sensibilidade de células que expressam BCR-ABL à indução de morte pelo mesilato de imatinibe (Aichberger et al., 2005).

Portanto, consideramos que o estudo dos receptores TLRs na LMC seja de extrema importância, já que poderia aportar dados inéditos sobre a relação entre a oncoproteína quimérica BCR-ABL e os receptores imunes. Dessa forma poderíamos conhecer a relevância destes últimos na biologia da LMC, assim como propor novos

alvos de terapia para o uso de agonistas ou antagonistas da via de sinalização dos TLRs para complementar o tratamento com as drogas utilizadas hoje.

Neste sentido, trabalhamos com a hipótese de que tanto BCR-ABL possa ser capaz de modular a expressão ou a sinalização dos TLRs, quanto a estimulação dos TLRs em células BCR-ABL-positivas possa interferir na sinalização desta tirosina-quinasa.

2 OBJETIVO

Investigar a relação biológica entre a oncoproteína BCR-ABL e os TLRs.

2.1 METAS ESPECIFICAS

- Padronizar a expressão da oncoproteína BCR-ABL no sistema induzível da linhagem murina TonB210.1.
- Investigar a modulação da expressão gênica dos receptores TLR pelo BCR-ABL.
- Avaliar a integridade da via de sinalização dos TLRs modulados pelo BCR-ABL através da ativação de NFκB pelo estímulo com o agonista respectivo.
- Investigar a relevância biológica da ligação do agonista de TLR na biologia das células BCR-ABL positivas.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Materiais

Linhagens Celulares

Ba/F3: linhagem murina de pró-linfócito B dependente de IL-3, derivada de camundongo Balb/c.

TonB210.1: linhagem celular derivada de Ba/F3 gentilmente fornecida pelo Dr Christian Sillaber da Universidad de Vienna, Austria. Essa linhagem consegue expressar a oncoproteína BCR-ABL humana na presença de doxíciclina e através de um transativador que age diretamente no promotor responsivo a tetraciclina da proteína. A sequência da proteína encontra-se inserida no plasmídio denominado pTetP210.pUHD172-1neo cujo promotor no extremo 5' é responsivo a tetraciclina.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados para cultura de células, reações de PCR, extração de RNA e conversão em cDNA foram obtidos da Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EUA). Os reagentes e oligonucleotídeos Taqman utilizados nas reações de real-time PCR foram obtidos da Applied Biosystems. Os anticorpos utilizados para marcação dos *western blotting* foram, em geral, obtidos da Cell signaling. Para a estimulação do receptor heterodimérico TLR1/2 utilizamos o seu principal agonista, Pam3CSK4 sendo este cedido gentilmente pelo Dr. Ruslan Medzhitov da Universidade de Yale. A droga doxíciclina utilizada para induzir a produção de BCR-ABL e o reagente MTT para os ensaios de proliferação foram obtidos da empresa SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Missouri, USA). Os inibidores utilizados foram LY294002 [Cell Signaling], PD98059 [Cell Signaling], SB203580 [TOCRIS] e SP600125 [TOCRIS].

3.3 Métodos

Cultura de Células

As linhagens murinas foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml penicilina, 100 µg/ml

estreptomicina e 25 mM HEPES (RPMI completo) e 10% de sobrenadante de células WEHI contendo IL-3. As culturas foram mantidas em estufa à 37 °C e 5% CO₂.

O uso das células para os experimentos foi condicionado ao mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão com Azul de Tripán. A contagem do número de células, tanto para repique quanto para a execução dos experimentos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Indução de BCR-ABL com doxíciclina nas células TonB210.1

Cinquenta mil células TonB210.1 foram cultivadas em placa de 24 wells com meio RPMI e 10% de sobrenadante WEHI. Durante a padronização do sistema, utilizamos duas concentrações de Doxíciclina: 1 e 5 µg/ml. Depois dessa etapa do projeto nós sempre utilizamos 5 µg/ml de doxíciclina em todos os ensaios de indução de BCR-ABL. Mantivemos as células com a droga em estufa por 48 horas.

Eletroforese de proteínas e Western-blot

Para obtenção das amostras, utilizamos o extrato protéico obtido de 1x10⁶ células das linhagens celulares utilizadas no estudo. As células foram centrifugadas 240g por 5min a 4 °C e ressuspensas em 100 µl de tampão de amostra (1x SDS, “Sodium Dodecyl Sulphate”). Na sequência, foram aquecidas a 100 °C por 5min e rapidamente resfriadas em gelo. O estoque destas amostras foi mantido a -20 °C. A análise das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS na concentração 12% para proteína IκBα (39KDa) e 8% para BCR-ABL (210KDa). Enquanto as amostras estavam no gel de empacotamento a voltagem aplicada foi de 80V e quando as amostras passaram para o gel de corrida, a voltagem foi aumentada para 100V. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de 0,45 µm de PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) da PIERCE, com auxílio do sistema da Bio-Rad por 4 a 5h. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 3h a temperatura ambiente para impedir marcações inespecíficas dos anticorpos à membrana. Para a marcação com a maioria dos anticorpos utilizados no decorrer do projeto, o bloqueio foi feito com uma solução de 5% BSA (*Bovine Serum Albumin*) em TBS-Tween, 0,1% Azida. A marcação das membranas com os anticorpos foi feita durante 12h com o anticorpo primário desejado a 4°C. Após esse processo a membrana é lavada 3 vezes em

TBS Tween e incubada por 1h com o anticorpo secundário apropriado a temperatura ambiente, conjugado à peroxidase. Após essa marcação a membrana é lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência ECL (Amersham) e subsequente exposição a um filme auto-radiográfico (Kodak co.). O tempo de exposição das membranas ao filme dependeu da intensidade da marcação e variou de 10s a 5min.

Ativação da via de NFκB com agonistas de TLR1/TLR2

Para verificar se o agonista de TLR1/TLR2 é capaz de ativar a via de NFκB nas células TonB210.1, tratadas ou não com doxiciclina, e nas células macrofágicas J774, essas linhagens foram submetidas a incubação com Pam3CSK4 (1µg/mL e/ou 10µg/mL) em diferentes intervalos de tempos. Dez milhões de células foram adicionadas em tubo de 1,5mL em um volume final de 1mL. Foi adicionado ao tubo o volume correspondente a concentração final de agonista e em seguida foi colocado em “thermomixer” a 37 °C sob agitação de 350rpm, onde permaneceu por todo o experimento. A cada intervalo de tempo foi retirado 100µL do tubo e esse volume foi transferido para tubos devidamente identificados contendo 100µL de uma solução de PBS + Ortovanadato de sódio 0,2mM, um inibidor de fosfatases. As amostras foram preparadas para a posterior realização de *Western Blotting* utilizando o anticorpo IκB-α (Cell signaling).

Inibição das vias de sinalização

Para conhecer qual é a via de sinalização utilizada por BCR-ABL para aumentar a expressão de TLR1, nós pré-incubamos as células TonB210.1 por 30min com os 4 inibidores e posteriormente acrescentamos a doxiciclina (5µg/ml) como descrito acima. As concentrações dos inibidores utilizadas foram as seguintes: LY294002 (50µM), inibidor de PI3K, PD98059 (20 µM), inibidor de MEK1, SB203580 (10 µM), inibidor de p38MAPK e SP600125 (25 µM), inibidor de JNK. Após 48h de indução do BCR-ABL, colhemos as amostras e as preparamos em TRIZOL® (INVITROGEN).

Extração de RNA

Um a cinco milhões de células foram transferidas para um tubo de 1,5ml e centrifugadas a 420g por 3min. O sobrenadante foi descartado e 0,5ml de TRIZOL foi adicionado, sob agitação em vortex lento. Após 5min de incubação em temperatura ambiente, foi adicionado 0,1ml de clorofórmio seguida de nova incubação por 2min. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi então adicionado 1 vol de isopropanol (0,25ml) seguido por uma incubação a -20 °C por 2h. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi descartado, recuperando-se o precipitado de RNA. Meio mililitro de Etanol 75% foi adicionado e seguida as amostras foram centrifugadas a 7500g por 5min a 4 °C. O precipitado foi seco e ressuspenso em água destilada, livre de RNase e DNase. A quantificação foi feita utilizando-se um espectrofotômetro (*SpectraMax 190 – Molecular Devices*) com comprimento de onda de 260/280nm .

Conversão de RNA para cDNA

A mesma quantidade de RNA, um a três microgramas para todas as amostras, foram diluídas em 11µl de água livre de RNase. Foi adicionado 500 ng de oligo dT, seguido de aquecimento a 70 °C por 10min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 8µl do mix Superscript (4µl de Tampão 5x; 1µl de dNTP 10mM; 2µl de DTT 0,1M e 200 U Superscript III R/T) e incubou-se a 50 °C por 50min. A enzima foi inativada incubando a reação a 72 °C por 15min seguidos por 5min a 4 °C.

RT-qPCR

A reação de qPCR avalia o acúmulo do produto da reação de amplificação em sua fase logarítmica, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. Este é atualmente um método considerado preciso e reprodutível para quantificação da expressão gênica. Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit Taqman (Applied Biosystem). O número de catálogo dos *primers* para Tlrs de camundongos está especificado na **Tabela 3**. Preparamos as reações segundo às quantidades determinadas pelo fabricante dos oligonucleótidos. O perfil térmico aplicado foi o seguinte: 2min a 50 °C, 10min a 95 °C, 50 ciclos de 30s a 95

°C e 1min a 60 °C. O equipamento e *software* utilizado foram Stratagene 3005P™ e MxPro™ QPCR.

Tabela 3 - *Número de catálogo dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR (Taqman)*

Fragmentos Gênicos	Nº de catálogo
Tlr1	Mm 00446095_m1
Tlr2	Mm 00442346_m1
Tlr3	Mm 01207404_m1
Tlr4	Mm 00445274_m1
Tlr5	Mm 00546277_s1
Tlr6	Mm 02529782_s1
Tlr7	Mm 00446590_m1
Tlr9	Mm 00446193_m1
Gapdh	4352932E

Cálculo da expressão relativa e análises estatísticas

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e quantificação relativa. Os métodos de comparação de Cts foram utilizados neste trabalho para comparar a expressão relativa dos genes estudados. Para os cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerou-se que durante a reação de qPCR a fluorescência aumenta a cada ciclo e atinge um limiar (*threshold*) no qual as amostras podem ser comparadas. Quanto maior o número inicial de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. Para cada amostra, o “*threshold cycle*” (Ct) obtido na fase exponencial da reação, foi analisado para os genes de interesse assim como para um controle interno cuja expressão não apresente diferença estatística, sendo nesse caso o *Gapdh*. A diferença entre os valores dos Cts (ΔCt) foi calculada para cada gene de interesse respeito ao controle interno nas células em cada uma das condições (com e sem doxiciclina). Para a obtenção dos valores de $\Delta\Delta Ct$ foi feita a subtração dos valores de ΔCt das células com doxiciclina dos ΔCt das células sem doxiciclina. Finalmente o valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é calculado para a obtenção da relação entre cada célula e sua respectiva amostra de referência. Esse valor representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído (Livak e Schmittgen, 2001).

Os dados apresentados para as linhagens celulares foram obtidos pela média dos Cts obtidos nas triplicatas de cada amostra e são representativos de três experimentos.

Dosagem de citocina por ELISA sandwich

A produção de IL-6 foi analisada por ELISA sandwich de captura, utilizando kit da BDOptEIA™ (Nº de Catálogo 55240), de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em duplicata.

Tratamento para indução de apoptose

Quinhentas mil células de TonB210.1 previamente induzidas e não com doxiciclina foram submetidas às drogas indutoras de morte VP-16 [etoposídeo] (50µM) e Ara-C [citarabine] (100 µM) por 18h na presença de Pam3CSK (1,5 µg/ml). A morte por apoptose foi avaliada através da técnica de HFS (*Hypotonic Fluorescent Solution*).

Análise de apoptose via fragmentação de DNA (HFS)

O conteúdo de cada poço derivado dos tratamentos realizados, contendo de 5×10^5 células, foi centrifugado a 240g por 5min a 4 °C e ressuspensos em tampão hipotônico HFS [0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50µg/ml de iodeto de propídeo (PI)]. Estas células permaneceram por um período mínimo de 1h de incubação a 4 °C antes de serem analisadas por citometria de fluxo no citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). O conteúdo de DNA produz um perfil gráfico dependente da fase do ciclo celular em que estas se encontram. Foram considerados eventos apoptóticos os núcleos hipodiplóides, que no gráfico aparecem à esquerda do pico G0-G1. Foi feito um *gate* utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) para a exclusão dos *debris*. Finalmente as amostras adquiridas no citômetro foram analisadas pelo *software Cell Quest*.

Análises de proliferação através do ensaio colorimétrico da redução do MTT

O MTT apresenta coloração amarelo-fluorescente. A forma estrutural em anel do componente tetrazólico do MTT é incorporada pelas células viáveis, e assim

quebrada pelas enzimas mitocondrias, gerando cristais insolúveis de formazina na cor azul escuro. Por tanto, esse método indica a atividade mitocondrial, que é diretamente proporcional ao número de células vivas e metabolicamente saudáveis (Weichert *et al.*, 1991). Dez mil células induzidas ou não com doxiciclina por 48h foram estimuladas com 50ng/ml de Pam3CSK4. Após o tempo de 72 e 96h, foi adicionado o MTT em uma concentração de uso de 500µg/ml. As células foram então incubadas a 37 °C por 3h e em seguida foi adicionado 100µl de solução SDS 10% preparado em HCl 0,01N, que age na dissolução dos cristais reduzidos do MTT, e novamente incubadas por 18h. Por fim, a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro de ELISA, *SpectraMax 190 – Molecular Devices*. A leitura foi feita no comprimento de onda de 540nm.

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Graphpad Prism*, versão 3.02, da companhia *Graphpad Software Incorporation*. O teste usado foi o *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste Tukey, para ensaios que envolveram uma variável (tratamento com drogas). O teste utilizado para ensaios que envolveram duas variáveis foi o *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni. O primeiro tipo de análise foi utilizado para averiguar se o fenômeno observado era resultante da variação entre os diferentes tratamentos e não de uma combinação aleatória. A segunda análise consistiu em comparar tratamentos dois a dois e ver se estes eram significativamente diferentes entre si. Valores de $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização de um modelo de BCR-ABL induzível por doxíciclina em células de camundongo

Com o intuito de estudar a biologia da LMC e a relação entre BCR-ABL e a sinalização dos TLRs, nós trabalhamos em um modelo de estudo *in vitro* com células de camundongos. Assim, escolhemos a linhagem derivada de Ba/F3 denominada TonB210.1 gerada pelo Dr. Kevin M. Klucher et al. no ano 1997. TonB210.1 foi criada mediante a transfecção estável de uma construção que contém o gene *BCR-ABL* junto a um promotor responsivo à droga doxíciclina (Klucher et al., 1998). Nós estimulamos a produção da proteína BCR-ABL utilizando duas concentrações de doxíciclina; 1 e 5µg/ml. Paralelamente, submetemos as células Ba/F3 às mesmas concentrações de doxíciclina para avaliar a ação da droga na expressão basal dos genes *Tlr*. Assim também observamos que a doxíciclina não comprometeu a viabilidade das células nos tempos e nas doses utilizadas. A quantidade obtida de oncoproteína foi diretamente proporcional à quantidade de droga utilizada (**Figura 7A**). Da mesma forma, a concentração de substratos fosforilados em resíduos de tirosina aumentou progressivamente com o aumento da concentração da droga indutora.

Em seguida, avaliamos o tempo requerido pela TonB210.1 para deixar de produzir BCR-ABL, após a remoção da doxíciclina do meio de cultura. Observamos ausência total da proteína BCR-ABL após 48h de retirada a droga com a consequente diminuição da quantidade de proteínas fosforiladas. Diante destes resultados podemos afirmar que BCR-ABL demanda 48h para ser degradada em sua totalidade (**Figura 7B**).

Figura 7. Tratamento de células Ba/F3 e TonB210.1 com doxiciclina para a indução de BCR-ABL. A) TonB210.1 expressa a oncoproteína BCR-ABL (p210) na presença de diferentes concentrações de doxiciclina. 5×10^5 células Ba/F3 e células TonB210.1 foram induzidas com 1 e $5 \mu\text{g/ml}$ de doxiciclina por 48h. B) a proteína BCR-ABL é degradada das células após 48 h da retirada de doxiciclina. Western-Blot com o anticorpo específico para c-Abl revela BCR-ABL (210KDa) e anticorpo α -PY detecta proteínas fosforiladas totais. Como controle de carga foi usado anticorpo anti- β -actina (45 KDa). (c) controle não induzido.

5.2 Inibição da ação tirosina-quinasa de BCR-ABL com mesilato de imatinibe (MI) e análises da expressão gênica dos *Tlrs*.

Definido o procedimento experimental, seguidamente submetemos ambas as linhagens celulares ao tratamento com $5 \mu\text{g/ml}$ de doxiciclina e incubação por 48h para a indução da produção de BCR-ABL na presença ou não de $10 \mu\text{M}$ de MI. A **Figura 6** mostra que quando tratada com MI, BCR-ABL perde sua capacidade fosforilativa.

Figura 8. *STI 571 inibe a capacidade fosforilativa da tirosina quinasa de BCR-ABL* . 5×10^5 células Ba/F3 e células TonB210.1 foram incubadas por 48h com $5 \mu\text{g/ml}$ de doxíciclina na presença ou não de $10 \mu\text{M}$ de STI571. Western Blotting com anticorpo específico para c-Abl revela BCR-ABL (210KDa) e anticorpos α -PY detectam proteínas fosforiladas totais. Como controle de carga foi usado anticorpo anti- β -actina (45 KDa).

Pouco se sabe do envolvimento dos receptores TLRs na LMC e foi essa questão o que motivou o início do presente projeto. Em seguida, demos foco a possibilidade de BCR-ABL poder regular a expressão gênica dos TLRs. Um ensaio semelhante ao desenvolvido na **Figura 8** foi realizado, sendo que as amostras foram agora processadas para extração de RNA e sínteses de cDNA.

Inicialmente comparamos a expressão basal dos TLRs nas células BaF/3 e TonB210.1. A **Figura 9** demonstra que ambas apresentam um perfil de expressão semelhante destes receptores.

Figura 9. Perfil de expressão gênica basal dos receptores *Tlr* nas linhagens murinas *Ba/F3* e *TonB210.1*. Para calcular a expressão basal de *Tlrs* em ambas as linhagens, utilizamos como calibrador aquele *Tlr* que apresentou a menor expressão gênica em cada linhagem. Para *Ba/F3* o calibrador empregado foi *Tlr4* da própria linhagem e em *TonB210.1* foi *Tlr3*. Como referência endógena foi empregado o gene *Gapdh*.

Ao analisarmos individualmente a expressão gênica de cada receptor *Tlr* em ambas as linhagens submetidas ou não ao tratamento com Doxíciclina e/ou STI571, observamos que apenas *Tlr1* e *Tlr2* foram modulados significativamente de modo específico na *TonB210.1*. A expressão de *Tlr1* foi induzida na presença de BCR-ABL, mas não quando o imatinibe foi adicionado à cultura, demonstrando que a atividade tirosina quinase é essencial para este efeito. A expressão de *Tlr2*, por sua vez, foi modulada positivamente pela BCR-ABL, mesmo na presença do imatinibe (**Figura 10**).

A linhagem *Ba/F3*, nosso controle experimental, não apresentou mudanças estatisticamente significativa na expressão gênica da maioria dos receptores *Tlrs* entre os tratamentos. A exceção foi *Tlr4*, que variou significativamente na presença de doxíciclina, tanto na *BaF/3* quanto na *TonB210.1* (**Figura 10**). No entanto, as diferenças podem não terem sido devido à presença de BCR-ABL talvez um efeito direto da doxíciclina. Por esse motivo, não consideraremos o aumento da expressão desse gene como sendo causado pela oncoproteína em *TonB210.1*.

Outros dois receptores avaliados foram os receptores de *Tlr7* e *Tlr8*, que não apresentaram níveis detectáveis de mRNA, sugerindo que esses genes são pouco ou nada expressos em ambas as células.

Figura 10. *Analises de Real time RT-qPCR do receptor **Tlrs** nas linhagens murinas Ba/F3 e TonB210.1 submetidas aos tratamentos com doxiciclina e/ou STI571. 5x10⁵ células Ba/F3 e células TonB210.1 foram incubadas por 48h com 5 µg/ml de doxiciclina na presença ou não de 10µM de STI571. Gapdh foi utilizado como referência endógena. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes em triplicatas. *** p≤0,001, ** p≤0,01 e * p≤0,05.*

5.3 A sinalização das MAPKs está envolvida na regulação da expressão gênica de *Tlr1*

Sabe-se que muitas são as vias ativadas pela oncoproteína, mesmo porque a capacidade fosforilativa constitutiva deve-se a perda de seu domínio regulador durante a translocação cromossômica, em consequência, além das vias ativadas pelo domínio quinasa há também um maior número de vias de sinalizações ativadas devido ao aumento de interações protéicas provenientes de ambas as proteínas agora fusionadas. Contudo, nós nos interessamos mais naquelas vias de sinalizações ativadas através do sítio tirosina quinasa de c-Abl. Entre as primeiras moléculas a serem ativadas encontra-se a proteína Ras cuja sinalização participa durante o processo de oncogênese. Diversas vias são ativadas a partir de Ras (Marley e Gordon, 2005), entre elas encontram-se as vias PI3K/Akt e MAPKs tais como JNK e ERK (Raitano et al., 1995) (**Figura 6**).

Com o mesmo objetivo, nós investigamos quais fatores de transcrição já foram descritos na regulação da expressão gênica de *Tlr1*. Procurando na literatura achamos o trabalho de Izadi et al., em que demonstraram que a regulação gênica positiva do receptor de *Tlr1* é dependente da ativação de JNK1. Eles descreveram 3 elementos de resposta ao complexo AP-1 no promotor proximal de *Tlr1* (Izadi et al., 2007).

Simultaneamente, fomos realizar uma análise *in silico* para a obtenção de outros fatores de transcrição que reconhecem elementos de resposta localizados no promotor de *Tlr1*. Para isso, nós utilizamos ferramentas de bioinformática que inferem a natureza dos fatores de transcrição usando bases de dados de genomas descritos. Neste trabalho utilizamos três sítios de predição: o sítio do Genome Browser proveniente da Universidade de California de Santa Cruz (UCSC) <http://genome.ucsc.edu/> (Kent et al., 2002), do Mybioinfo www.mybioinfo.info e do

Sabiosciences www.sabiosciences.com . Dessa forma, nos interessaram os fatores de transcrição descritos na **Figura 11**, já que foram preditos pelas três ferramentas. Novamente, o complexo AP-1 foi descrito nas análises, sugerindo então que uma das vias das MAPKs poderia estar regulando a expressão de *Tlr1*. A figura também mostra o envolvimento das vias do cálcio intracelular (NFAT-4), assim como a via de NFkB.

Figura 11. Estrutura do gene *Tlr1* murino com alguns dos fatores de transcrição preditos.

A partir dessas premissas, nós fomos avaliar a expressão do gene *Tlr1* quando presentes os inibidores das vias de sinalizações de JNK (SP600125), p38MAPK (SB203580), PI3K-Akt (PD98059) e MEK1 (Ly294002) em células TonB210.1 induzidas com doxiciclina. A **Figura 12** demonstra claramente que as três vias das MAPKinases: JNK, p38MAPK e ERK1, estão envolvidas no processo de regulação gênica de *Tlr1* induzida por BCR-ABL. Sendo que as duas primeiras sinalizações participam reprimindo a expressão gênica, e a última, a via de ERK1, colabora com a oncoproteína BCR-ABL para regular positivamente a expressão gênica desse receptor.

Figura 12. Vias das MAPKs regulam a expressão do gene *Tlr1* na presença de BCR-ABL. 5×10^5 células TonB210.1 incubadas por 48h com 5 $\mu\text{g/ml}$ de doxíciclina na presença e ausência de STI571 (10 μM) e de cada inibidor das vias de sinalização de PI3K, LY294002 (50 μM); de ERK1, PD98059 (20 μM), de p38MAPK, SB203580 (10 μM) e de JNK, SP600125 (25 μM) pré-incubados por 30 min previamente à indução de BCR-ABL por doxíciclina. Gapdh foi utilizado como referência endógena. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes em triplicatas. *** $p \leq 0,001$. Não detectado (nd).

No entanto a expressão do receptor *Tlr1* é induzida unicamente por BCR-ABL, uma vez que na presença de cada inibidor e na ausência da oncoproteína, seu mRNA não foi detectado. Isso demonstra que componentes das vias das MAPKs são estimulados e regulados pela proteína quimérica. Por tanto, baseados no resultado da **Figura 12**, nós acreditamos na existência de um balanço entre as vias MAPKs para a indução final do gene *Tlr1*.

Por outro lado, a via PI3K não parece estar envolvida na regulação da expressão gênica desse receptor.

O ensaio realizado com o sistema induzível de BCR-ABL nas células TonB210.1 proporcionou informações inéditas a respeito da relação entre essa proteína quimérica e a expressão gênica dos receptores imunes TLRs. Os resultados tornam-se mais relevantes se pensarmos na qualidade da interação molecular entre os dois tipos de proteínas já que esse é um sistema condicional cuja

única variação é o aparecimento de BCR-ABL, mantendo-se o mesmo conteúdo citoplasmático.

5.4 Ativação da via de NFκB na presença do agonista de TLR1/TLR2

Em conjunto, os resultados das RT-qPCR sugerem que tanto *Tlr1* quanto *Tlr2* são fortemente regulados por BCR-ABL. Interessantemente esses receptores se associam formando heterodímeros na superfície celular fundamentais para o reconhecimento de estruturas lipopeptídicas tri-aciladas presentes em bactérias como a *Borrelia burgdorferi*. O composto sintético utilizado para a ativação específica dessa via de sinalização é o Pam3CSK4 constituído por três cadeias de ácidos graxos palmitólicas e uma seqüência peptídica de cisteínas (C), serinas (S) e lisinas (K).

Em seguida nós fomos avaliar a ativação de NFκB na estimulação do dímero TLR1/TLR2 com seu agonista artificial, Pam3CSK4. Para isso utilizamos duas concentrações do agonista e fizemos uma cinética de ativação.

Assim, comprovamos a ativação de NFκB, evidenciada indiretamente pela degradação de seu inibidor, o IκBα, nas células TonB210.1 com e sem doxiciclina estimuladas com Pam3CSK4. Nós utilizamos duas concentrações de agonista: 1 e 10 µg/ml de Pam3CSK4, e fizemos uma cinética de ativação. Previamente ao uso do agonista de TLR1/TLR2 nós observamos que BCR-ABL não ativa a via de NFκB na ausência de ativação da via dos TLRs, mesmo sob o tratamento com as drogas doxiciclina e/ou STI571 (dados não mostrados). A ativação de NFκB somente foi detectada com 10 µg/ml de agonista, o que representa uma quantidade 10 vezes maior da requerida para a ativação do mesmo receptor em macrófagos J774 (**Figura 13**). Esta ativação foi mais aparente nas células TonB210.1 tratadas com Doxiciclina e, por tanto, expressando BCR-ABL. Desta forma, nós concluimos que o heterodímero TLR1/TLR2 está sendo expresso na membrana das células BCR-ABL positiva de forma aumentada e é capaz de transduzir um sinal intracelular. A consequência direta daquela ativação ainda é incerta na biologia do BCR-ABL, mas a literatura sugere possíveis efeitos que tentaremos responder nos próximos ensaios.

Figura 13. O agonista sintético de TLR1/TLR2, Pam3CSK4, ativou a via de NFκB em uma concentração de 10μg/ml nas células TonB210.1 negativas e positivas para BCR-ABL. Cinética de ativação de NFκB de 1×10^7 de células TonB210 sem tratamento e tratadas com 5μg/ml de doxíciclina submetidas às concentrações de 1μg/ml e 10μg/ml de Pam3CSK4. Cinética de ativação de NFκB da linhagem macrofágica J774 com 1μg/ml de Pam3CSK4.

5.5 Pam3CSK4 induz um aumento da produção de IL-6 nas células BCR-ABL positivas.

Posteriormente fomos estudar um dos produtos principais da via de sinalização ativada dos TLRs, a citocina IL-6. Para isso estimulamos durante um período de 24h com Pam3CSK4 em uma concentração dependente do número celular e a quantidade de agonista utilizada na cinética para a ativação de NFκB. Por tanto trezentas mil células TonB210.1 foram estimuladas com 1,5μg/ml de agonista assim como dez milhões foram ativadas com 10μg/ml. As células TonB210.1 desse experimento eram células positivas e negativas para BCR-ABL, determinadas através da indução prévia com doxíciclina por 48h.

Após termos realizado o procedimento de ELISA sandwich para IL-6, nós observamos um aumento significativo na produção desta citocina no sobrenadante das células BCR-ABL positivas quando estimuladas tanto com Pam3CSK4 quanto com LPS, agonista de TLR4 (**Figura 14**). É muito interessante destacar a enorme produção de IL-6 através do estímulo de TLR1/TLR2 nas células transformadas

quando comparadas as células sem BCR-ABL, sendo este de 1500 pg/ml, quantidade comparável a produzida por macrófagos (dados não mostrado).

Figura 14. Células *TonB210.1* com expressão de BCR-ABL apresentaram um aumento significativo de IL-6 na presença de Pam3CSK4. 3×10^5 células foram induzidas com $1,5 \mu\text{g/ml}$ de Pam3CSK4 e $1,5 \mu\text{g/ml}$ de LPS por 24h. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes em triplicatas. *** $p \leq 0,001$

5.6 A indução com Pam3CSK4 não altera a proliferação das células BCR-ABL positivas.

Baseado em dados da literatura que demonstram o envolvimento da sinalização dos receptores TLRs no aumento de proliferação e sobrevivência de células tumorais (Jego et al., 2006; Li et al., 2010) em seguida fomos observar a proliferação das células *TonB210.1* BCR-ABL positivas e negativas quando estimuladas com Pam3CSK4.

Para atingir nosso objetivo específico, utilizamos a técnica colorimétrica de MTT cujo princípio consiste na redução deste último componente quando ligado nas mitocôndrias ativas. Desta forma, trata-se de uma medição indireta da quantidade de células viáveis.

Não observamos diferença significativa na proliferação entre as células induzidas e não induzidas com doxiciclina na presença e na ausência do agonista (**Figura 15**). Mesmo que a tendência após 96 h de cultura em RPMI com 10% de soro fetal bovino é de menor divisão celular de ambas as células na presença do Pam3CSK4.

Figura 15. *Pam3CSK4 não alterou a proliferação das células TonB210.1 com e sem a expressão de BCR-ABL. 1x10⁴ células induzidas ou não com 5µg/ml de doxíciclina por 48 h foram estimuladas ou não com 50ng/ml de Pam3CSK4. A análise foi feita através da medição de células viáveis pelo método colorimétrico MTT e a leitura a 540nm por espectrofotometria após 72 e 96 horas. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão.*

5.7 Pam3CSK4 induz quimioresistência nas células BCR-ABL positivas.

A ativação dos receptores de tipo Toll já foi relacionada tanto com o aumento da susceptibilidade quanto com a indução da resistência à morte por apoptose (Salaun et al., 2007). Com o intuito de alterar a alta resistência à apoptose descrito para as células expressando BCR-ABL (Bedi et al., 1994), posteriormente nós fomos avaliar o comportamento das células sob condições de estresse celular induzido por drogas que impedem a replicação celular.

Na **Figura 16**, nós confirmamos que BCR-ABL torna as células resistentes a apoptose induzidas por Ara-C e VP16 como já foram descritos por outros alunos de nosso grupo em células humanas. No mesmo gráfico mostramos que a presença de Pam3CSK4 torna as células BCR-ABL positivas ainda mais resistentes à morte por apoptose. A diferença estatística com p value <0,5 confirma a quimioresistência contra duas drogas utilizadas na terapia anti-câncer, fornecida pelo agonista Pam3CSK4 em células BCR-ABL positivas.

Figura 16. Células TonB210.1 com expressão de BCR-ABL são resistentes à morte celular induzidas por agentes inibidores da replicação celular. 2×10^5 células induzidas ou não com $5 \mu\text{g/ml}$ de doxíciclina por 48h, foram estimuladas ou não com $1,5 \mu\text{g/ml}$ de Pam3CSK4 na presença de $50 \mu\text{M}$ de VP16 (etoposídeo) e $100 \mu\text{M}$ de Ara-C por 18h. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (Teste ANOVA e BONFERRONI)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi iniciado a partir das premissas existentes na literatura respeito do envolvimento da sinalização dos receptores de tipo Toll em diversos tipos de cânceres. O principal objetivo era conhecer o papel desses receptores em células contendo a oncoproteína BCR-ABL. Esta última proteína é a assinatura molecular da Leucemia Mieloide Crônica e sabe-se que ela é a responsável pelo fenótipo transformado das células progenitoras da medula óssea. A evolução da doença se correlaciona positivamente com o aumento do número de transcritos BCR-ABL, assim maior número de proteínas são fosforiladas e diversas vias de sinalização permanecem ativadas. Dessa forma células transformadas ganham características celulares vantajosas respeito às células normais, tais como resistência a apoptose e crescimento independente de citocinas que fazem com que elas perpetuem e aumentem em número.

Por todos estes motivos e outros, é preciso investigar profundamente a biologia das células transformadas por BCR-ABL para entender quais são as vias de sinalizações que sustentam a viabilidade das células leucêmicas.

Por tal razão nós investigamos o papel da sinalização dos receptores imunes TLRs nas células leucêmicas BCR-ABL positivas, baseado na extensa literatura comprovando o envolvimento desta sinalização em diversos tipos de cânceres (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009).

Em neoplasias hematológicas foram demonstrados aspectos positivos e negativos da ativação desta sinalização e os primeiros estão sendo aproveitados para o combate de doenças como a Leucemia Linfocítica Crônica fazendo uso de agonistas dos receptores de TLR7 e 9 (Smits et al., 2010; Spaner e Masellis, 2007).

Tanto Ba/F3.BA com expressão constitutiva de BCR-ABL quanto TonB210.1 são modelos conhecidos no estudo de sobrevivência e inibição de apoptose induzidas por BCR-ABL, principalmente porque essas células tem sido selecionadas pelo crescimento independente aos fatores de crescimento como são IL-3 e GM-CSF (Bedi et al., 1994). Informações importante respeito da biologia do BCR-ABL foram descobertos a través do uso de modelos murinos que desenvolvem a síndrome mieloproliferativa similar a Leucemia Mieloide Crônica (Chopra et al., 1999). Outros estudos foram feitos em linhagens humanas geradas a partir de

pacientes nas diferentes fases da doença e que expressam de forma endógena o gene *BCR-ABL*. Por outro lado, pouco dados são publicados na literatura a partir de resultados realizados com amostras de pacientes, principalmente na área de nosso interesse que envolve conhecimento do histórico clínico das pessoas desde o momento do diagnóstico. Portanto, informações cruciais para este trabalho, tais como relação leucemia-infecção, poderia dar bases fortes para os resultados obtidos *in vitro*. Mesmo assim, a grande vantagem de nosso modelo se baseia no fato de conseguir estudar as vias de sinalizações inicialmente alteradas pela oncoproteína uma vez que a célula começa a expressá-la.

.

6.1 Regulação dos receptores de tipo Toll por BCR-ABL.

Para atingir o nosso objetivo, nos aprimoramos um sistema de BCR-ABL induzível através de doxíciclina em células murinas TonB210.1. Tal sistema nos permite estudar a estreita relação de BCR-ABL e as vias ativadas por ela, assim como avaliar as diferenças no comportamento celular na sua presença. Inicialmente observamos que BCR-ABL está regulando a expressão gênica de alguns dos receptores TLR (**Figuras 10**), sendo que a expressão do receptor *Tlr1* é dependente da ação catalítica do sítio tirosina kinase de c-Abl, como foi demonstrado através do uso de STI571. Paralelamente também foi regulado por BCR-ABL o parceiro molecular de TLR1, o receptor TLR2, sendo que este último não demonstrou estar sendo regulado positivamente pelo sítio tirosina kinase. Esses dados pela primeira vez mostram a oncoproteína regulando a expressão dos receptores de tipo Toll ao nível mRNA. Sabe-se que a expressão desses receptores é conhecida principalmente nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e dendríticas assim também em células epiteliais, onde a ativação de sua sinalização por PAMPs leva a secreção de citocinas pró-inflamatórias e indução da resposta imune adaptativa. Mas, quando a superexpressão gênica desses receptores acontece em células transformadas, as consequências biológicas descritas até agora são diferentes e, em alguns casos, beneficiando a progressão tumoral. A sinalização dos receptores TLRs participa da indução do reparo tissular após uma infecção, por tanto estimula o aumento da proliferação celular, neovascularização, produção de citocinas de crescimento e resistência a apoptose. Este microambiente

é rico em ROS que provoca danos ao DNA de células normais e gera mutações que as transforma em tumorais (Chen et al., 2008). A célula tumoral adquire características que a levam a perpetuar no decorrer da doença: produção de citocinas de crescimento, insensibilidade aos sinais de detenção da proliferação, evasão a apoptose, angiogênese, ilimitada replicação celular e invasão tissular (Hanahan e Weinberg, 2000). Em pelo menos três destas características os receptores TLR já foram envolvidos na biologia do câncer (Bohnhorst et al., 2006; Li et al., 2010; Salaun et al., 2007). Por tal razão nos acreditamos que a oncoproteína BCR-ABL estaria utilizando a ativação dos receptores TLRs para sustentar seu fenotipo transformado. A literatura descreve os receptores TLRs como moléculas que estão sendo induzidas e cuja ativação é aproveitada no contexto de tumorigênese associadas à inflamação crônica (Coussens e Werb, 2002).

Os receptores de tipo Toll, quando estimulados através da ligação de seu agonista, transduzem um sinal intracelular que leva a ativação de três principais fatores de transcrição; MAPK, NFkB e membros da família IRF que estimulam a produção de citocinas pro-inflamatórias e interferons de tipo I (Akira e Takeda, 2004). Entretanto, a via de NFkB já está ativada pelo BCR-ABL, utilizando em parte a sinalização de Ras, como descritos em camundongos nude. Essa via participa do processo de tumorigênese de células hematopoiéticas em modelos murinos de leucemia e proporciona a capacidade de crescimento em meio privado de citocinas e inibição da morte por apoptose em células murinas 32D (Reuther et al., 1998). Nas nossas células TonB210.1 nós não observamos ativação de NFkB na ausência de estimulação dos receptores TLRs após 48h de indução de BCR-ABL (dados não mostrados), indicando talvez que este processo de ativação necessite de maior tempo na presença da proteína quimérica. Nada tem sido descrito respeito do mecanismo molecular que BCR-ABL utiliza para ativar o fator de transcrição NFkB, mas as análises de bioinformática feita neste trabalho (**Figura 11**) mostra que a sequência do promotor de TLR1 possui elementos de resposta para este fator. Assim nós sugerimos um circuito de retroalimentação positivo onde a expressão de TLR1 induzida pela oncoproteína levaria a translocação do fator de transcrição NFkB ao núcleo após a ligação do receptor com seu ligante (ainda não identificado na LMC) e que por sua vez este participe na produção de mais receptor de tipo toll.

6.2 Participação das MAPK na regulação de *tlr1*

Seguidamente estávamos interessados em conhecer, quais são as vias que BCR-ABL utiliza para induzir a expressão de TLR1. Para isso, escolhemos uma abordagem farmacológica com uso de inibidores de vias de sinalizações para responder essa pergunta. Como demonstrado na **Figura 12** elementos da via de sinalização das MAPKinases estão envolvidos na regulação de TLR1 ao nível transcripcional, reprimindo sua expressão, no caso da via de p38MAPK e JNK, ou induzindo sua expressão como foi comprovado através do uso do inibidor da via de MEK1. A sinalização de JNK esta envolvida tanto com a indução de apoptose quanto com sua inibição, mas de fato JNK é o centro dos mecanismos que integra múltiplas vias para determinar o destino celular (Vlahopoulos e Zoumpourlis, 2004). Por outro lado, é possível inferir qual é o mecanismo empregado pela oncoproteína para superexpressar TLR1. No trabalho revisto por Quintás-Cardama e Jorge Cortés (2009), eles descreveram a sinalização ocasionada pela auto-fosforilação da tirosina 177 no domínio SH2 do BCR, de BCR-ABL. Tal modificação pos-traducional fornece ao domínio um aumento da afinidade pela proteína GRB2, que posteriormente recruta SOS, o trocador de nucleotídeos guanina de RAS, e assim desencadeia a ativação desta última molécula. Por sua vez, RAS causa a ativação constitutiva de ERK1 e PI3K/Akt, moléculas envolvidas principalmente na proliferação celular independente de fator de crescimento e da inibição da apoptose, respectivamente. O mecanismo descrito anteriormente foi observado na etapa inicial de transformação por BCR-ABL de células LMC primarias, sugerindo então que a superexpressão de TLR1 deva acontecer já nas primeiras células neoplásicas philadelphia positivas dentro da medula óssea (Quintas-Cardama e Cortes, 2009). Interessantemente, a ativação de ERK1 é dependente de citocinas durante a fase crônica da doença, mas torna-se constitutivamente ativada na fase blástica onde é realmente detectada nas células progenitoras CD34⁺ (Notari et al., 2006).

A utilização individual dos inibidores nas células BCR-ABL positivas, demonstraram diferentes funções entre as três vias das MAPKs na regulação de TLR1 (**Figura 17**). De fato, se sabe que na LMC a expressão da proteína JunB e inibida nas células provenientes de pacientes acometidos com a doença (Radich et al., 2006). JunB é um componente do complexo de transcrição AP-1 que funciona

como um supressor de tumores nas células mielóides. Esta molécula antagoniza os efeitos ocasionados por outros membros da sinalização JNK ativados por RAS, assim inibindo a proliferação e sobrevivência das células BCR-ABL positivas (Angel e Karin, 1991). Tomando esses dados em vista, nós sugerimos a possível participação de JunB na repressão gênica de TLR1 nas células TonB210.1 estimuladas com BCR-ABL, segundo o mostrado nos resultados da **Figura 12** mediante o uso do inibidor SP600125.

Os dados resultantes da utilização do inibidor da via p38 MAPK demonstraram a atuação das proteínas p38 α e β na repressão gênica de TLR1. Embora, sua participação tenha sido menor do que a observada para elementos da via JNK, de certa forma esse dado não deixa de ser relevante, já que interessantes publicações descrevem a via de p38 MAPK como uma sinalização que participa ativamente nos efeitos anti-leucêmicos induzidos por drogas como Interferon α (Mayer et al., 2001), mesilato de imatinibe (Parmar et al., 2004) e dasatinib (Dumka et al., 2009). Nesses trabalhos, todos descrevem a ativação de p38 como evento necessário para a inibição do crescimento celular induzidas pelas drogas mencionadas anteriormente. Vale ressaltar que estas três drogas representam os medicamentos de primeira linha na terapia para a LMC (Weisberg et al., 2007).

6.3 Ativação da via de sinalização de TLR1/TLR2 com Pam3CSK4

Com o intuito de determinar se aquela expressão gênica dos receptores TLR1 e 2 se traduzem a proteína funcional expressas na membrana plasmática, nós ativamos essa via com o agonista sintético do heterodímero, Pam3CSK4. A ativação de NF κ B acontece em resposta a citocinas como IL-1 ou TNF α . O evento marcante da sinalização é a fosforilação dos resíduos Ser32 e Ser36 de I κ B α , o inibidor específico de NF κ B no citoplasma. Ditas fosforilações marcam esta proteína para ser ubiquitinizada e degradada pelo proteossomo, liberando o NF κ B ativo para translocar ao núcleo celular. A avaliação da ativação do fator de transcrição de NF κ B foi feita através da visualização do sumiço da proteína I κ B α , por western blotting (Brown et al., 1995).

Nossos resultados confirmam a integridade da via de sinalização de TLR1/TLR2 quando ativado com seu agonista Pam3CSK4 (10 μ g/ml) nas células

TonB210.1 tratadas ou não com doxiciclina (**Figura 13**). O fator de transcrição NFkB conseguiu translocar pro núcleo embora aquela ativação precise de maior quantidade de agonista quando comparamos com o necessário para os macrófagos J774 (1ug/ml). Sabe-se que macrófagos e células dendríticas sinalizam para a produção de citocinas pro-inflamatórias ativando a via de NFkB na presença de mínimas quantidades de PAMPs (Akira e Takeda, 2004). Soma-se a possibilidade destas células TonB210.1 estarem expressando menores quantidades de receptores de membrana para responder a mesma dose de agonista utilizado pra J774. Isso foi observado por uma pesquisadora de nosso grupo, onde hibridomas de linfócitos T expressando menor quantidade de mRNAs dos TLRs do que em macrófagos, precisaram de maior quantidade de agonista para ativar a via de NFkB.

De qualquer forma, as células que não expressam BCR-ABL estão respondendo com a mesma cinética de ativação que as células que expressam a proteína quimérica, o que demonstra que o aumento da expressão de TLR1 induzido por BCR-ABL não esta intensificando o sinal de ativação de NFkB proveniente da ligação do heterodímero TLR1/TLR2 com seu agonista (**Figura 13**). Mesmo porque ambas as células apresentam pouca diferença no que respeita ao receptor de TLR2, sugerindo uma ação conjunta e igual entre os dois receptores pra transdução do sinal.

Porém, quando foi feito a dosagem de citocina IL-6 produzida após o estímulo com o agonista de TLR1/TLR2, foi observado uma diferença significativa entre as células negativas e positivas para BCR-ABL. Estas últimas produziram maior quantidade de IL-6 do que as primeiras, quando expostas a mesma dose de agonista (**Figura 14**). Esse dado confirma o resultado obtido na **Figura 10** ja que há uma relação diretamente proporcional entre o aumento do número de mRNA de TLR1 e o aumento de IL-6 produzidas nas células BCR-ABL positivas estimuladas com Pam3CSK4. Esta citocina junto com TNF α e IL-1 β são os produtos pro-inflamatórios esperados da via ativada dos receptores TLR. Sugerindo então que mesmo tendo, ambas as células, a mesma cinética de ativação de NFkB, possivelmente a combinação de fatores de transcrição, além do NFkB, esteja influenciando na quantidade de citocina produzida. Esta hipótese se baseia nos dados revistos por Trinchieri e Sher (2007), onde explicam que a quantidade de citocina produzida depende das combinações de receptores TLRs que estão sendo

ativados simultaneamente (Trinchieri e Sher, 2007). Nesse aspecto, foram descritos trabalhos demonstrando que as citocinas TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-23, Cox-2 e a própria IL-6, foram mais fortemente induzidos em células dendríticas quando estimuladas com combinações de agonistas de TLRs comparados ao estímulo com um único agonista (Gautier et al., 2005; Napolitani et al., 2005). Assim, da mesma forma que as vias dos receptores TLRs cooperam para o aumento da produção de citocinas secretadas, nós acreditamos que possa existir uma influência das vias ativadas por BCR-ABL nas vias ativadas pelo engajamento de TLR1/TLR2 com seu agonista.

IL-6 é uma citocina que induz a resposta de fase aguda da inflamação. Possui funções pleiotrópicas e sistêmicas. Mas, como outras citocinas, também tem propriedades anti-inflamatórias (Barton et al., 1996; Opal e DePalo, 2000). Um dos mecanismos anti-inflamatórios utilizados por esta citocina corresponde à indução dos antagonistas das principais citocinas pro-inflamatórias, IL-1ra (receptor antagonista de IL-1) e o receptor solúvel de TNF α (Tilg et al., 1994). Assim, a ação pro ou anti-inflamatória resultante da IL-6 secretada, depende do microambiente e das interações dos fatores solúveis presentes. Neste sentido, existem diversos relatos na literatura citando ao aumento de IL-6 como um marcador de progressão tumoral (Barton, 2005). Viu-se aumento do crescimento tumoral de células de hepatocarcinoma H22 quando TLR2 foi estimulado com *Lysteria monocytogenes*, sendo que os principais fatores produzidos foram IL-6 e iNOS (Huang et al., 2007). As moléculas MyD88 e NF κ B participam ativamente na indução desta citocina como foi demonstrado em modelo de carcinoma hepatocelular (Naugler et al., 2007). Em relação à LMC, foi descrito uma maior produção de IL-6 e survivina no soro de pacientes em fase blástica e acelerada da doença quando comparados aos controles saudáveis e mesmos aos pacientes na fase crônica (Zhara et al., 2007).

A presença de IL-6 e TGF β , produzidas pelas células tumorais podem induzir a diferenciação das células Th17 (Ivanov et al., 2006). Dessa forma a presença de citocinas IL-17 e IL-23 têm sido identificadas em tecidos de câncer de ovário o qual sugere que a inflamação mediada pelos linfócitos Th17 promove o crescimento tumoral. Neste sentido citocinas produzidas após a ligação dos receptores TLRs das células tumorais podem influenciar na determinação do fenótipo de linfócitos T e por tanto definir o tipo de resposta imune atuante no microambiente. Assim, a ativação

da reposta imune inata pela ação dos receptores TLRs, leva à produção de citocinas IL-1, IL-8, IL-6, TGF β que promovem angiogêneses ao tempo que regula a diferenciação dos linfócitos T (Wang et al., 2008).

Em fim, fatores solúveis produzidos pelas células tumorais após estímulo com agonista de TLR, suprime a ação de células imunes efetoras, linfócitos T e NK. Entre os produtos diretamente induzidos após a ligação do receptor TLR4 em células tumorais estão IL-6 e NO.(Huang et al., 2005).

A literatura é consistente com o fato da IL-6 estar aumentada no microambiente tumoral favorecendo a progressão neoplásica. Seguidamente, nós queríamos saber o porquê de sua secreção. Para responder isso, trabalhos in vitro com células de mieloma multiple estimuladas com agonistas de TLR (CpG e Pam3CSK4) demonstraram o envolvimento da citocina IL-6 na sobrevivência celular e no aumento da proliferação de culturas carentes de nutrientes. O papel direto dela foi confirmado mediante utilização de anticorpos neutralizantes, que mostrou diminuição da proliferação e aumento da susceptibilidade a apoptose induzida pela droga dexametasona (Bohnhorst et al., 2006; Jago et al., 2006). Esses dados sugerem que ligantes de TLRs agem como fatores de sobrevivência estimulando a produção de IL-6 para que tenha um efeito autocrino e induza o aumento da proliferação (Li et al., 2010). A bibliografia é escassa na hora de mostrar um mecanismo pela qual IL-6 esta induzindo à proliferação e inibindo a apoptose.

6.4 Consequências biológicas após ativação da via de sinalização de TLR1/TLR2 com Pam3CSK4

Além da produção de IL-6 confirmada neste trabalho, nós almejávamos conhecer as consequências biológicas advindas após da ligação do receptor heterodimerico TLR1/2. Assim, a partir de dados da literatura nós continuamos nossa investigação avaliando o efeito da ativação com Pam3CSK4 na proliferação e na morte da célula induzida por dano ao DNA.

No que respeita a proliferação, esperava-se uma evidente mudança no numero de células BCR-ABL viáveis após o estímulo com Pam3CSK4, mas não foi isso o que aconteceu (**Figura 15**). Uma provável explicação seja o fato de ter avaliado a replicação celular em condições ótimas. Chamasse dessa forma as

culturas suplementadas com os fatores essenciais que fornecem as condições permissivas para a divisão celular sem estresse tais como 37 graus de temperatura, existência de nutrientes, 5% de atmosfera de CO₂, pH neutro, etc. Se o efeito está na sobrevivência celular, deveríamos avaliar a viabilidade celular em meios pobres de nutrientes.

Porém, quando avaliamos a morte induzida por dano ao DNA, nós verificamos que o estímulo com Pam3CSK4 proporciona resistência a apoptose nas células BCR-ABL (**Figura 16**). As duas drogas utilizadas neste experimento são utilizadas na terapia contra o câncer, sendo que Ara-C é usada na Leucemia Mieloide Aguda. Elas induzem dano ao DNA e inibem enzimas essenciais para a replicação celular. Em ambos os casos a apoptose é induzida porque a maquinaria de reparo celular não conseguiu resolver o dano provocado. Possivelmente a resistência a apoptose observada nos nossos resultados possa estarem relacionados a sinalização TLR regulando, expressão ou ativação de moléculas anti-apoptóticas (Salaun et al., 2007).

Em conclusão, o presente trabalho demonstra que a proteína BCR-ABL está induzindo a expressão gênica dos receptores da imunidade inata, TLR1 e 2. Sendo que para o primeiro, a indução foi dependente da ação do sítio catalítico tirosina quinase da oncoproteína. Por outro lado, também vimos que as vias das MAPKs estão envolvidas na indução e repressão de TLR1 e que tais vias são ativadas ao mesmo tempo na presença de BCR-ABL. Assim, nós comprovamos que a estimulação do heterodímero com Pam3CSK4 nas células BCR-ABL positivas induz o aumento da produção de IL-6, uma citocina angiogênica e inflamatória, já nas primeiras 24h após o estímulo. Portanto, nossos resultados, através de ensaios *in vitro*, fornecem informações respeito ao comportamento da célula BCR-ABL positiva na presença de PAMPs.

Embora existam muitos estudos sobre LMC, uma incógnita em especial permanece sem resposta: por que existem pacientes que evoluem rapidamente da fase crônica a blástica, mesmo recebendo o tratamento adequado e prematuro, quando comparados com outros indivíduos que permanecem em remissão sob o mesmo protocolo de tratamento. Nossos resultados fomentam uma possível explicação, a qual está relacionada com o contexto de infecções em pacientes acometidos com LMC.

Em consideração ao fato da IL-6 no microambiente tumoral ser um sinal de mal prognóstico pro paciente com câncer, nós sugerimos que possivelmente células transformadas com BCR-ABL na presença de PAMPs ou ligantes endógenos de TLRs ativariam a sinalização destes últimos levando a progressão do câncer. Assim, nós estimamos que pacientes na fase crônica acometidos com determinadas infecções poderiam evoluir para as fases acelerada e blástica, comprometendo sua melhoria.

Figura 17. Modelo de regulação gênica de *Tlr1* por BCR-ABL.

7 CONCLUSÃO

- 1) BCR-ABL regula positivamente o gene *Tlr1*.
- 2) A regulação positiva de *Tlr1* é dependente da ação do sítio catalítico tirosina quinase de c-Abl.
- 3) As MAPKs controlam a expressão gênica de *Tlr1* quando presente a oncoproteína.
- 4) BCR-ABL utiliza a via de ERK1 para superexpressão *Tlr1* e as vias p38 MAPK e JNK agem reprimindo a expressão desse gene.
- 5) A sinalização do dímero TLR1/TLR2 só ativa NFκB com 10µg/ml de agonista sintético Pam3CSK4 nas células TonB210.1 sem e com BCR-ABL.
- 6) Células BCR-ABL positivas produzem maior quantidade de IL-6 na presença de Pam3CSK4 quando comparadas com células TonB210.1 sem expressão da oncoproteína.
- 7) Pam3CSK4 não altera a proliferação de células TonB210.1 com BCR-ABL respeito daquelas que não tem BCR-ABL.
- 8) A via de TLR1/TLR2 ativada proporciona resistência a apoptose quando induzida por drogas que danificam o DNA em células BCR-ABL positivas.

REFERÊNCIAS*

- Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, Skvara H, Florian S, Sonneck K, et al. 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*. 2005;105(8):3303-11.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):791-8.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(2-3):129-57.
- Barton BE. Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. *Expert Opin Ther Targets*. 2005;9(4):737-52.
- Barton BE, Shortall J, Jackson JV. Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model. *Infect Immun*. 1996;64(3):714-8.
- Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*. 1995;86(3):1148-58.
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994;83(8):2038-44.
- Bhatia R, Wayner EA, McGlave PB, Verfaillie CM. Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest*. 1994;94(1):384-91.
- Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Flottum M, Knudsen L, Borset M, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2006;20(6):1138-44.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 may 22]

Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000;67(4):508-14.

Brasher BB, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem.* 2000;275(45):35631-7.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science.* 1995;267(5203):1485-8.

Brown SL, Riehl TE, Walker MR, Geske MJ, Doherty JM, Stenson WF, et al. Myd88-dependent positioning of Ptgs2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury. *J Clin Invest.* 2007;117(1):258-69.

Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. 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.* 1996;183(3):811-20.

Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5531-41.

Coughlin SR, Escobedo JA, Williams LT. Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signal transduction. *Science.* 1989;243(4895):1191-4.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.

Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene.* 2008;27(2):225-33.

Chopra R, Pu QQ, Elefany AG. Biology of BCR-ABL. *Blood Rev.* 1999;13(4):211-29.

Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(23):9312-6.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990;247(4944):824-30.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-56.

Denhardt DT. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J.* 1996;318 (Pt 3):729-47.

Diekmann D, Nobes CD, Burbelo PD, Abo A, Hall A. Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *EMBO J*. 1995;14(21):5297-305.

Dorey K, Engen JR, Kretschmar J, Wilm M, Neubauer G, Schindler T, et al. Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 2001;20(56):8075-84.

Dumka D, Puri P, Carayol N, Lumby C, Balachandran H, Schuster K, et al. Activation of the p38 Map kinase pathway is essential for the antileukemic effects of dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(12):2017-29.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650-9.

Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):680-7.

Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1869-81.

Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G1055-65.

Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005;201(9):1435-46.

Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6325):355-6.

Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*. 2000;96(6):2269-76.

Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*. 1995;82(6):981-8.

Goldman JM, Druker BJ. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001;98(7):2039-42.

Golub TR. TEL gene rearrangements in myeloid malignancy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11(6):1207-20.

Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328(6128):342-4.

Gorre ME, Sawyers CL. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(4):303-7.

Gotoh A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Toyama K. Potential molecules implicated in downstream signaling pathways of p185BCR-ABL in Ph+ ALL involve GTPase-activating protein, phospholipase C-gamma 1, and phosphatidylinositol 3'-kinase. *Leukemia*. 1994;8(1):115-20.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):11-21.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(1):33-44.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-50.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-9.

Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15416-21.

Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res*. 2005;65(12):5009-14.

Huang B, Zhao J, Shen S, Li H, He KL, Shen GX, et al. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res*. 2007;67(9):4346-52.

Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*. 2008;27(2):218-24.

Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.

Izadi H, Motameni AT, Bates TC, Olivera ER, Villar-Suarez V, Joshi I, et al. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for Toll-like receptor 1 gene expression in macrophages. *Infect Immun*. 2007;75(10):5027-34.

Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006;20(6):1130-7.

Kabarowski JH, Allen PB, Wiedemann LM. A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *EMBO J*. 1994;13(24):5887-95.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11(5):373-84.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19(1):24-32.

Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004;5(10):1061-8.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.

Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(4):396-405.

Klucher KM, Lopez DV, Daley GQ. Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression. *Blood*. 1998;91(10):3927-34.

Kundu SD, Lee C, Billips BK, Habermacher GM, Zhang Q, Liu V, et al. The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate*. 2008;68(2):223-9.

Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, et al. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(40):14907-12.

Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol*. 1995;7(4):255-66.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.

Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*. 2010;49(1):1-9.

Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(5):2883-92.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*. 2004;6(3):297-305.

Margolis B. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth Differ*. 1992;3(1):73-80.

Marley SB, Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(1):13-25.

Mayer IA, Verma A, Grumbach IM, Uddin S, Lekmine F, Ravandi F, et al. The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem*. 2001;276(30):28570-7.

McGahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ, Mahboubi A, Cotter TG, Green DR. Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem*. 1995;270(38):22625-31.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.

Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:132-52.

Monick MM, Carter AB, Robeff PK, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J Immunol*. 2001;166(7):4713-20.

Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005;6(8):769-76.

Nardi V, Naveiras O, Azam M, Daley GQ. ICSBP-mediated immune protection against BCR-ABL-induced leukemia requires the CCL6 and CCL9 chemokines. *Blood*. 2009;113(16):3813-20.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 2007;317(5834):121-4.

Notari M, Neviani P, Santhanam R, Blaser BW, Chang JS, Galletta A, et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood*. 2006;107(6):2507-16.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.

Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996;88(7):2410-4.

Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002;21(56):8652-67.

Parmar S, Katsoulidis E, Verma A, Li Y, Sassano A, Lal L, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25345-52.

Peek RM, Jr., Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):28-37.

Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*. 1991;66(1):161-71.

Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75(1):175-85.

Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(1):99-104.

Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.

Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2794-9.

Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, Sawyers CL. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(25):11746-50.

Raitano AB, Whang YE, Sawyers CL. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1333(3):F201-16.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73(5):555-61.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):57-63.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.

Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):172-83.

Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science*. 1994;266(5182):129-33.

Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev*. 1998;12(7):968-81.

Robak P, Smolewski P, Robak T. The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the risk of development and treatment of hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(8):1452-62.

Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3311-8.

Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:621-51.

Schon MP, Schon M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2008;27(2):190-9.

Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, et al. Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 1991;65(7):1165-75.

Seki E, Tsutsui H, Imuro Y, Naka T, Son G, Akira S, et al. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology*. 2005;41(3):443-50.

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 1996;13(2):247-54.

Sirvent A, Benistant C, Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell*. 2008;100(11):617-31.

Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Szczylik C, Kanakaraj P, Perrotti D, Zon G, et al. C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res*. 1995;55(11):2275-8.

Smits EL, Cools N, Lion E, Van Camp K, Ponsaerts P, Berneman ZN, et al. The Toll-like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory

capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(1):35-46.

Spaner DE, Foley R, Galipeau J, Bramson J. Obstacles to effective Toll-like receptor agonist therapy for hematologic malignancies. *Oncogene*. 2008;27(2):208-17.

Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):53-60.

Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(2):652-6.

Tauchi T, Miyazawa K, Feng GS, Broxmeyer HE, Toyama K. A coiled-coil tetramerization domain of BCR-ABL is essential for the interactions of SH2-containing signal transduction molecules. *J Biol Chem*. 1997;272(2):1389-94.

ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood*. 1994;84(6):1731-6.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 1994;83(1):113-8.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(3):179-90.

Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 1991;65(7):1153-63.

Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, et al. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect Immun*. 2003;71(8):4238-49.

Vlahopoulos S, Zoumpourlis VC. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(8):844-54.

Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell*. 1995;80(5):719-28.

Wages DS, Keefer J, Rall TB, Weber MJ. Mutations in the SH3 domain of the src oncogene which decrease association of phosphatidylinositol 3'-kinase activity with pp60v-src and alter cellular morphology. *J Virol*. 1992;66(4):1866-74.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998;281(5383):1680-3.

Wang RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2008;27(2):181-9.

Warr MR, Shore GC. Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Curr Mol Med*. 2008;8(2):138-47.

Warren MK, Rose WL, Beall LD, Cone J. CD34+ cell expansion and expression of lineage markers during liquid culture of human progenitor cells. *Stem Cells*. 1995;13(2):167-74.

Wasserman SA. A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell*. 1993;4(8):767-71.

Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg Immunol (Leipz)*. 1991;37(3-4):139-44.

Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ*. 2008;15(12):1901-9.

Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):345-56.

Wolska A, Lech-Maranda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(2):248-72.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1522-6.

Zhara M, Mourad H, Farouk G, Elbatch M, Ezzat S, Sami W. Molecular detection of survivin expression, antiapoptotic gene, and other prognostic markers, how they are correlated and how it could be of prognostic value in chronic myeloid leukemia patient. *Egypt J Immunol*. 2007;14(2):51-62.

Zimmerman EI, Dollins CM, Crawford M, Grant S, Nana-Sinkam SP, Richards KL, et al. Lyn Kinase-dependent Regulation of miR181 and Mcl-1 Expression: Implications for Drug Resistance in Myelogenous Leukemia. *Mol Pharmacol*. In press.