

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

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 conseqüência, 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

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-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 e moléculas co-estimulatorias 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 (*Patterns 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.

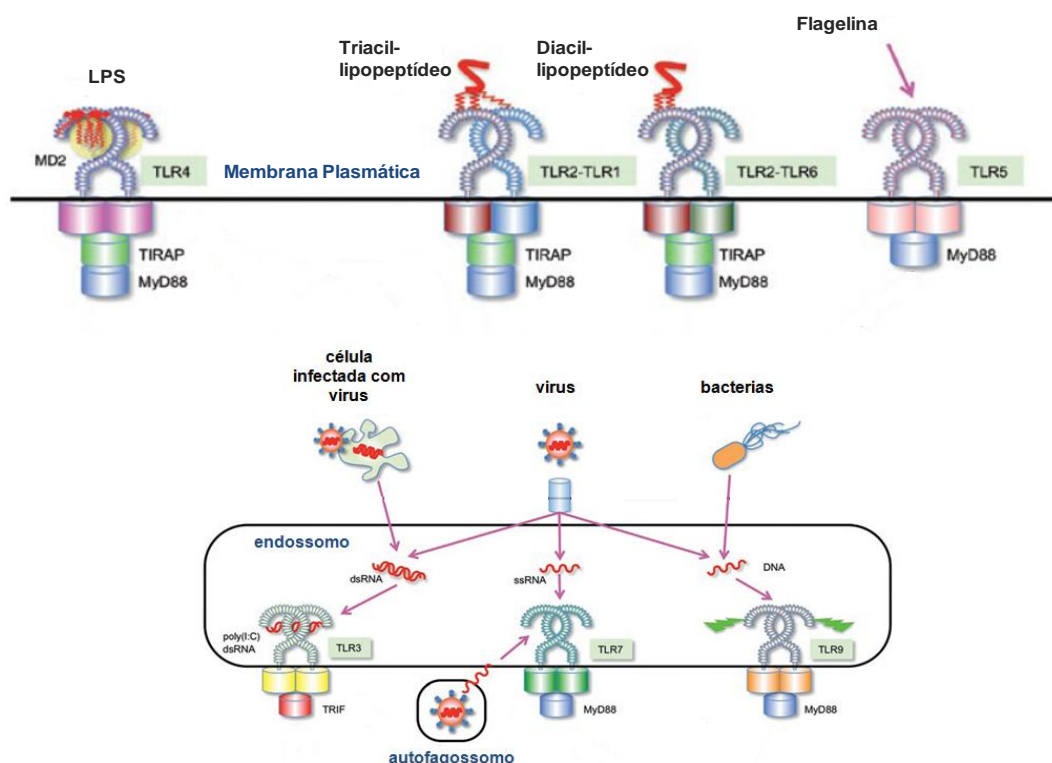


Figura 1. Ligantes de receptores TLR.
 FONTE: Adaptado de Kawai e Akira (2010).

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.

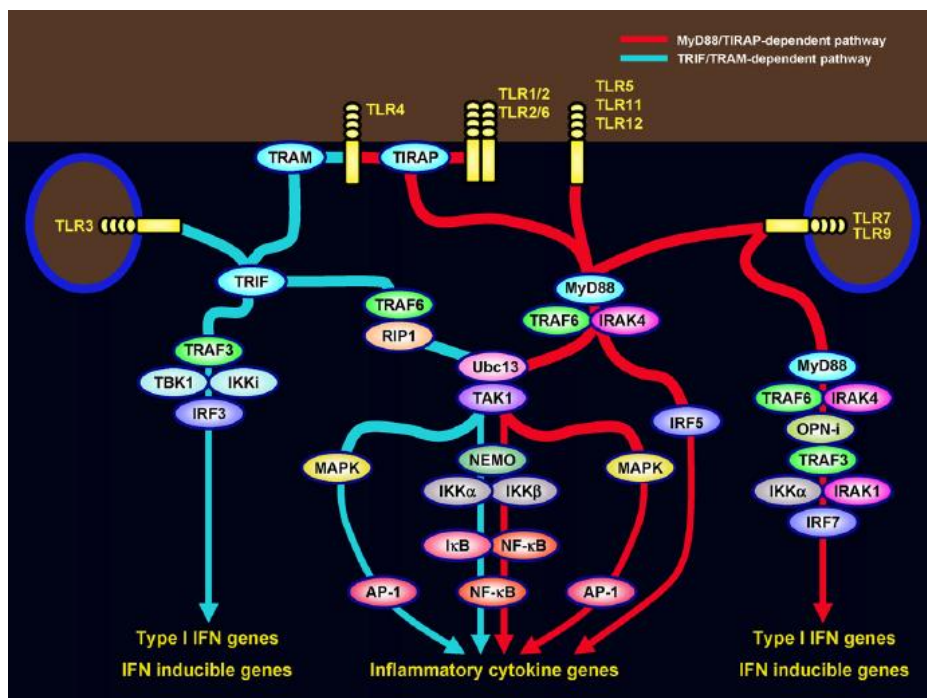


Figura 2. Via de sinalização dos receptores TLR.
 FONTE: (Kawai e Akira, 2007)

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 NFκB 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 ligase 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 consequente 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 NFκB, e o aproxima da molécula TAK1. Dessa forma a quinase TAK1 consegue fosforilar e ativar a subunidade IKKβ com a subsequente fosforilação e degradação da proteína inibidora de NFκB, IκBα. Por fim, NFκB 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 NFκB. Provavelmente por mecanismos de ubiquitinação similares aos descritos anteriormente para a sinalização dependente de MyD88. Uma molécula primordial para ativação de NFκB via TRIF na resposta pela ativação de TLR3 é a proteína RIP1. Deficiências nas moléculas que ubiquitinizam RIP1, não mostram ativação de NFκB via TRIF embora exista ativação pela via dependente de MyD88. Desta maneira, com a ativação de NFκB 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 nucleicos, 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 ICSPB (*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 conectam 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 metaloproteinases 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). Seqüências 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 NFκB, 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 seqüência 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).

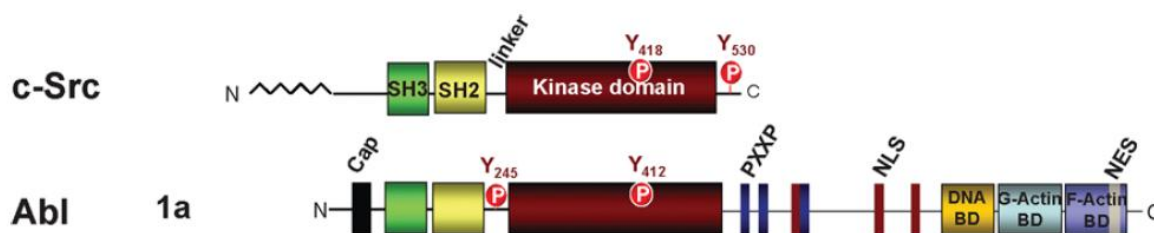


Figura 3. Domínios estruturais das proteínas c-Src e c-Abl.
 FONTE: Adaptado de Sirvent et al. (2008).

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**).

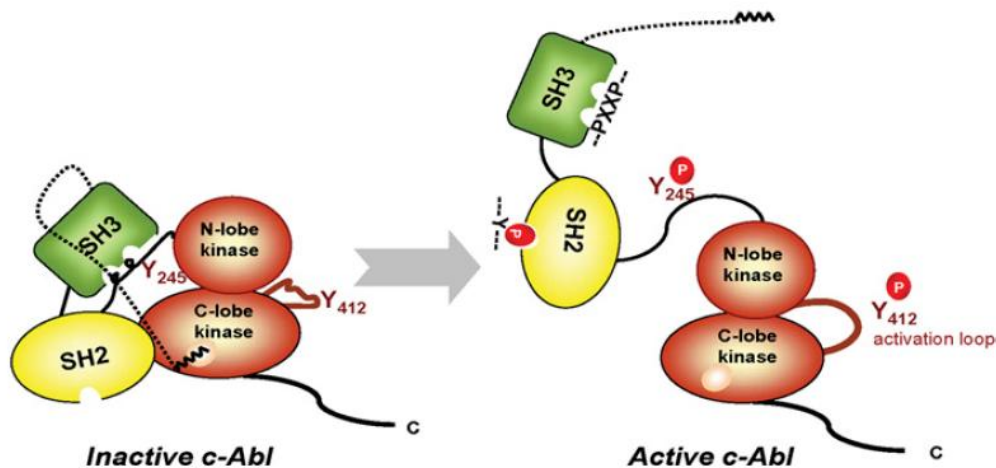


Figura 4. Estruturas auto-reguladoras de *c-Abl*.
 FONTE: Sirvent et al. (2008)

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**).

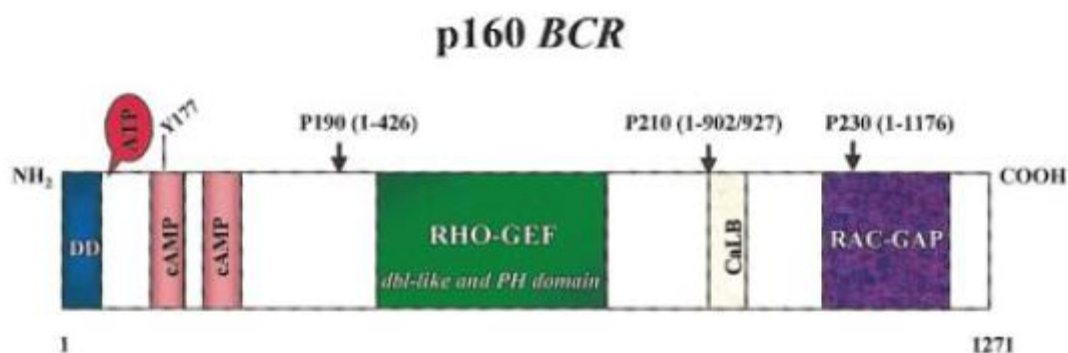


Figura 5. Domínios estruturais da proteína BCR.
 FONTE: Sirvent et al. (2008)

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-microbiana 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).

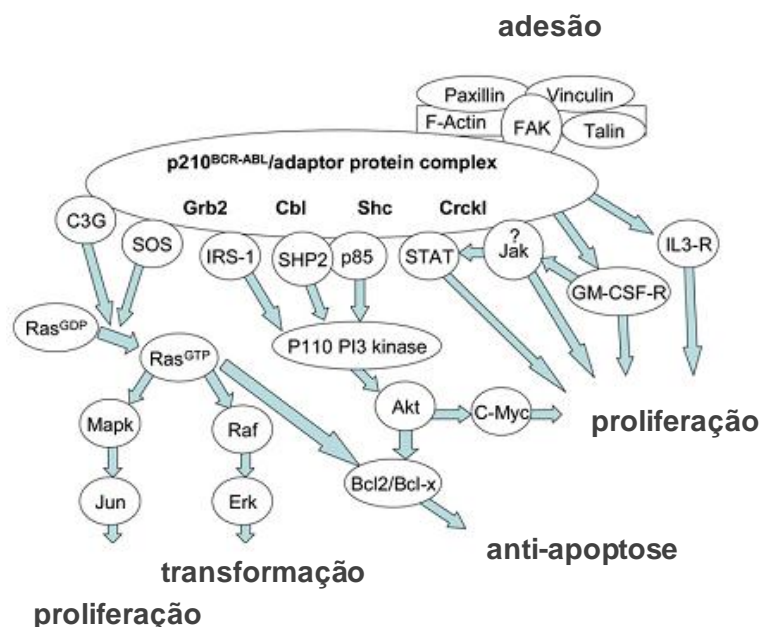


Figura 6. Vias de sinalizações ativadas por BCR-ABL e os processos celulares envolvidos.
 FONTE: Adaptada de Marley e Gordon (2005).

1.3.1.1 Via RAS

Esta via de sinalização esta 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 primarias da medula óssea mesmo com a constitutiva atividade quinase de c-ABL (Pendergast et al., 1993). Aquela tirosina 177 quando fosforilada serve como sitio 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 esta 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 previa 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 varias 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 conseqüência 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 NFκB

NFκB 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 NFκB 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 NFκB 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 vários 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.

7 CONCLUSÃO

- 1) BCR-ABL regula positivamente o gene *Tlr1*.
- 2) A regulação positiva de *Tlr1* é dependente da ação do sitio catalítico tirosina quinasa 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 Ptg2-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, Kretzschmar 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, Unkles 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, Bertoni 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, Iimuro 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.