Βλαστικά κύτταρα της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML Stem Cells) - Η οδός προς την ίαση;

Μαρία Δήμου, Παναγιώτης Παναγιωτίδης

ΠΕΡΊΛΗΨΗ: Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία είναι ένα μυελοϋπερπλαστικό νόσημα, το οποίο φέρει την χρωμοσωμική μετάθεση t(9;22). Η παθογένεση της νόσου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παραγωγή της υβριδικής πρωτεϊνης BCR-ABL που έχει δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η θεραπεία της ΧΜΛ με αναστολείς των τυροσινικών κινασών (Tyrosin Kinase Inhibitors-TKIs) έχει οδηγήσει σε θεαματικά αποτελέσματα όσον αφορά την επίτευξη πλήρους κυτταρογεννετικής ανταπόκρισης και την μακρά επιβίωση ασθενών με ΧΜΛ. Σε ορισμένους ασθενείς έχει επιτευχθεί μακροχρόνια «πλήρης μοριακή ύφεση» της νόσου ; σε ορισμένους διεκόπη η χορήγηση TKIs αλλά στους περισσότερους επανεμφανίστηκε μοριακά η νόσος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα αρχέγονα κύτταρα της ΧΜΛ επιβίωσαν της μακροχρόνιας αγωγής με Imatinib και ευθύνονται για την «μοριακή επανεμφάνιση» της ΧΜΛ. Τα αρχέγονα κύτταρα της ΧΜΛ χρησιμοποιούν πλειάδα βιοχημικών μονοπατιών για να εξασφαλίσουν την επιβίωση, την αυτοανανέωσή τους, πολλαπλασιασμό, αναστολή απόπτωσης κ.λπ. Το Imatinib mesylate και σε μεγαλύτερο βαθμό οι νεώτεροι TKIs (nilotinib, dasatinib κ.λπ.) οδηγούν σε μοριακές υφέσεις, αλλά in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι δεν καταφέρνουν να εξαφανίσουν τον πληθυσμό των ΧΜΛ-HSCs. Οι κυτταρικές οδοί που χρησιμοποιούν τα αρχέγονα κύτταρα της ΧΜΛ αποτελούν σήμερα αντικείμενο εντατικής έρευνας, προκειμένου να σχεδιαστούν θεραπείες που στοχεύουν στην εξαφάνισή τους σε συνδυασμό με χορήγηση TKIs. Μια τέτοια συνδυαστική θεραπεία αναστολέων μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνια «λειτουργική ίαση» σε ασθενείς με ΧΜΛ.

Haema 2012; 3(1): 65-77 Copyright ΕΑΕ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι μία κλωνική μυελοϋπερπλαστική νόσος που ξεκινά από το επίπεδο του αιμοποιητικού βλαστικού κυττάρου (Hemopoietic Stem Cell-HSC) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία του ογκογονιδίου σύντηξης, BCR-ABL[1]. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία καινοτόμα πρωτεΐνη με λειτουργία τυροσινικής κινάσης (TK), η οποία προκαλεί αυξημένη παραγωγή και πρώιμη απελευθέρωση μυελοειδών κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Το ογκογονίδιο BCR-ABL μπορεί να στοχευθεί με αναστολείς τυροσινικών κινασών (Tyrosine Kinase Inhibitors-TKIs) των οποίων ο ρόλος είναι να αποσιωπήσουν την λειτουργία της ογκοπρωτεΐνης. TKIs όπως το Imatinib mesylate (Glivec®) χρησιμοποιούνται πια ως καθιερωμένη θεραπεία σε ασθενείς με πρωτοδιαγνωσμένη ΧΜΛ. Αν και οι TKIs αποτέλεσαν μια εξαιρετικά σημαντική πρόοδο στη θεραπεία της ΧΜΛ, δεν καταφέρνουν να εξαφανίσουν τελείως τη νόσο. Οι TKIs οδηγούν σε ταχύτατες μοριακές υφέσεις στην πλειονότητα των ασθενών με ΧΜΛ σε χρόνια φάση, αλλά ως επί τω πλείστον στοχεύουν σε διαιρούμενα κύτταρα και συνήθως δεν εξαφανίζουν τα μετάγραφα BCR-ABL στον πληθυσμό των αρχέγονων HSCs[2].

Προς επιβεβαίωση των ανωτέρω οι Su Chu και συνεργάτες στο ASH meeting το 2008[3], έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΧΜΛ που λαμβάνουν συνεχώς Imatinib και έχουν επιτύχει σταθερή πλήρη κυτταρογενετική ύφεση για πάνω από 5 έτη, εξακολουθούν να έχουν μετρήσιμη έκφραση BCR-ABL στον πληθυσμό των αρχέγονων HSCs.

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, την STIM trial (Stop IMatinib) από την γαλλική ομάδα των Mahon και συνεργατών[4], μετά τη διακοπή του Imatinib σε ασθενείς που βρίσκονταν σε πλήρη μοριακή ύφεση για τουλάχιστον 2 έτη, παρατηρήθηκαν 61% υποτροπές, η οποίες όμως ανταποκρίθηκαν ασφαλώς στην επαναχορήγηση του Imatinib.

Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Νοσοκομείο «Λαϊκό», Αθήνα

Διεύθυνση Αλληλογραφίας: Π. Παναγιωτίδης, Α΄ ΠΠΚ ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό», e-mail: ppanayi@med.uoa.gr

Ανάλογα ευρήματα έχουμε και από τη χρήση των νεότερων TKIs – Nilotinib, Dasatinib & Bosutinib[5-8]. Τα μόρια αυτά αν και έχουν εξαιρετικά αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα, η ικανότητά τους να οδηγούν τα ΧΜΛ HSCs και τα πρόδρομα ΧΜΛ κύτταρα σε απόπτωση είναι πολύ περιορισμένη.

Καθώς λοιπόν υπάρχει μεγάλη πιθανότητα υποτροπής της ΧΜΛ μετά τη διακοπή των TKIs, η σύσταση επί του παρόντος είναι να χορηγούνται εφόρου ζωής. Παρόλα αυτά οι ανησυχίες που υπάρχουν αναφορικά με την πιθανότητα υποτροπής ενώ συνεχίζεται η θεραπεία με TKIs (αφού δεν υπάρχει πραγματική ίαση), οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη θεραπεία, το τεράστιο οικονομικό φορτίο και στοιχεία που αφορούν την έλλειψη συμμόρφωσης των ασθενών σε μία δια βίου θεραπεία (ιδίως αν αναφερόμαστε σε νέους ασθενείς αναπαραγωγικής ηλικίας), δημιουργούν ένα εξαιρετικά ισχυρό κίνητρο για την αναζήτηση της απόλυτης ίασης. Προφανώς αυτή θα είχε ως στόχο τον πληθυσμό των ΧΜΛ HSCs που όπως είδαμε ανιχνεύεται ακόμα και μετά από πολλά χρόνια επιτυχούς θεραπείας με TKIs και που είναι η αιτία της υποτροπής μετά από τη διακοπή τους.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργείται αυτή η έλλειψη ευαισθησίας των ΧΜΛ HSCs στους TKIs παραμένουν σχετικά αδιευκρίνιστοι . Παράγοντες όπως η κυτταρική ηρεμία (quiescence), επίκτητες μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο BCR-ABL, υψηλά επίπεδα έκφρασής του και υπερέκφραση διαμεμβανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων στα HSCs ενδέχεται να παίζουν ρόλο.

Εν τούτοις, πολύ πρόσφατα η Amie Corbin και οι συνεργάτες της από την ομάδα του καθηγητή Druker στο Oregon[9], έδειξαν ότι: το Imatinib in vitro ανέστειλε την δραστικότητα της BCR-ABL TK στον ίδιο βαθμό σε όλα τα HSCs, καθώς και στα πρόδρομα ΧΜΛ κύτταρα από νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΧΜΛ, τα οποία είτε βρίσκονταν σε φάση ηρεμίας είτε διαιρούνταν. Αν και η σύντομης διάρκειας in vitro θεραπεία με Imatinib ελάττωνε τον πολλαπλασιασμό των ΧΜΛ HSCs και προδρόμων, τα κύτταρα αυτά μπορούσαν παρουσία κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων να πολλαπλασιάζονται όπως και τα φυσιολογικά ομόλογά τους HSCs και πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, παρά την απουσία της BCR-ABL δραστικότητας. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι τα ΧΜΛ HSCs δεν είναι εξαρτώμενα από την παρουσία του ογκογονιδίου για την επιβίωσή τους και ότι μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από την μακροχρόνια καταστολή του BCR-ABL ογκογονιδίου με τους διάφορους TKIs.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη των Ashley Hamilton και συνεργατών στο Blood[10]. Οι ερευνητές εδώ προχώρησαν σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια με ΧΜΛ με τη χρήση του dasatinib. Η εργασία αυτή απέδειξε ότι λειτουργικά ΧΜΛ HSCs και πρόδρομα ΧΜΛ κύτταρα μπορούσαν να επιβιώνουν in vitro για μεγάλα χρονικά διαστήματα, παρά την πλήρη καταστολή του ογκογονιδίου και παρά την έλλειψη κυτοκινών. Τα ΧΜΛ HSCs που επιβίωσαν είχαν πλήρως αδρανοποιημένη τη λειτουργία της BCR-ABL TK. Επιπλέον φάνηκε ότι αυτός ο πληθυσμός των ανθεκτικών στο dasatinib HSCs ανήκε όντως στον κλώνο και ήταν πλούσιος σε αρχέγονα κύτταρα, τα οποία ούτε πολλαπλασιασμό των BCR-ABL μεταγράφων είχαν, ούτε μεταλλάξεις στο τμήμα της τυροσινικής κινάσης παρουσίαζαν (στοιχεία δηλαδή που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αντοχή στον TKI).

Όλα τα ανωτέρω ευρήματα υποδεικνύουν ότι πρέπει να στραφούμε σε στόχους ανεξάρτητους από το BCR-ABL, προκειμένου να εξαφανίσουμε τα ΧΜΛ HSCs και κατά συνέπεια να επιτύχουμε την ίαση για τη νόσο.

Στην προσπάθειά μας να ανιχνεύσουμε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την εξόντωση των ΧΜΛ HSCs, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε βασικά στοιχεία της βιολογίας τους, που όπως πλέον γνωρίζουμε δεν διαφέρει από την βιολογία των φυσιολογικών HSCs. Η παρούσα ανασκόπηση σκοπεύει να παρουσιάσει με συντομία τα κυριότερα στοιχεία της βιολογίας των ΧΜΛ HSCs, τα οποία ενδέχεται να αποδειχθούν στο μέλλον άριστοι θεραπευτικοί στόχοι προς επίτευξη της απόλυτης ίασης.

ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΧΜΛ HSCs

Ως φυσιολογικά HSCs ορίζονται μακράς διάρκειας κύτταρα που μπορούν να δημιουργήσουν αποικίες (Long Term Culture Initiating Cells-LTCIC), ικανές να εμβολιαστούν σε ανοσοκατασταλμένο ποντίκι. Μετά από τη διαμεταφορά σε NOD/SCID ποντικό μπορούν να επαναδημιουργήσουν τα διάφορα όργανα και να σχηματίσουν λειτουργικά κύτταρα του αίματος στο δότη. Ομοίως τα ΧΜΛ HSCs όταν διαμεταφέρονται σε υποθανατηφόρα ακτινοβολημένα NOD/SCID ποντίκια, καταφέρνουν να εμβολιαστούν και να δημιουργήσουν λευχαιμία. Τα ΧΜΛ HSCs είναι επίσης LTCIC και κινητικά ήρεμα (quiescent). Η κατάσταση ηρεμίας είναι παροδική και αναστρέψιμη. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τα ήρεμα ΧΜΛ HSCs μπορούν να δημιουργήσουν λευχαιμία. Τα ΧΜΛ HSCs όπως και τα φυσιολογικά HSCs βρίσκονται στο μυελό των οστών in vivo, ο ποίος αποτελεί καταφύγιο και προστασία από ποικίλους κινδύνους, μεταξύ των οποίων και οι θεραπείες[11].

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΤΩΝ ΧΜΛ HSCs

Τα ΧΜΛ HSCs είναι ανοσοφαινοτυπικά όμοια με τα φυσιολογικά HSCs. Και τα δύο στη κυτταρομετρία ροής χαρακτηρίζονται από χαμηλές πρόσθιες και πλάγιες διαχύσεις, που αντιπροσωπεύουν ένα μικρού μεγέθους χωρίς κοκκίωση πρωτόπλασμα.

Τα ΧΜΛ HSCs εκφράζουν τους δείκτες CD34, Thy1/CD90 και CD133 , ενώ δεν εκφράζουν το CD38, CD45RA, CD71 και πολλούς δείκτες των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων[11].

Το CD123 (η α αλυσίδα του υποδοχέα της IL3) και το CD33 που ως γνωστόν αποτελούν δείκτες των οξειών μυελογενών λευχαιμιών, έχει φανεί ότι συνεκφράζονται στην πλειονότητα των CD34+CD38- ΧΜΛ HSCs στη διάγνωση[12].

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη στο Hematologica από τους Harald Herrmann και συνεργάτες[13], φάνηκε ότι τα ΧΜΛ HSCs εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα CD33 από τα φυσιολογικά HSCs. Στην ίδια μελέτη HSCs από ασθενείς με χρόνια φάση ΧΜΛ καλλιεργήθηκαν in vitro με διάφορες δόσεις από το μονοκλωνικό anti-CD33 αντίσωμα gemtuzumab/ozogamycin (GO) και παρατηρήθηκε σε όλα αναστολή της αύξησής τους . Η δράση ήταν δοσοεξαρτώμενη και ακολουθούνταν από απόπτωση.

Οι συγγραφείς υπονοούν ότι το μονοκλωνικό GO θα μπορούσε να δοκιμαστεί και in vivo με στόχο την εξαφάνιση των ΧΜΛ HSCs και κατά συνέπεια την ίαση.

ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ «ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ» ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ BCR-ABL (εικόνα 1)

Το PI3-K/AKT «μονοπάτι»

Η συγκεκριμένη οδός έχει φανεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μορφές καρκίνων και στη ΧΜΛ. Είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται με τη σύνδεση υποδοχέων με δράση ΤΚ με αυξητικούς παράγοντες ή από την έκφραση του BCR-ABL. Πολλά μόρια κατωφερώς του AKT έχει φανεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη λευχαιμογένεση από το BCR-ABL, είτε μέσω ενεργοποίησης είτε μέσω απενεργοποίησης.

Τέτοια μόρια είναι οι πρωτεϊνες FOXO (FOrkhead Box O)(FOXO1, FOXO3a & FOXO4), οι οποίες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες. Απενεργοποίηση των FOXO πρωτεϊνών οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των ΧΜΛ κυττάρων, αναστολή της απόπτωσης ή και στα δύο[15]. Επιπλέον στα φυσιολογικά HSCs ποντικού, οι παράγοντες FOXO1, 3a & 4 τα προστατεύουν από το οξειδωτικό stress. Απώλειά τους οδηγεί σε παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, επιτάχυνση του κυτταρικού κύκλου και τελικά εξάντληση των HSCs[16].

Σχετικά πρόσφατα οι Naka και συνεργάτες παρουσίασαν στο Nature μία πολύ σημαντική εργασία. Χρησιμοποίησαν ένα συνγονιδιακό σύστημα μεταμόσχευσης σε ποντίκια, το οποίο ήταν ικανό να δημιουργήσει μυελοϋπερπλαστική νόσο που θύμιζε ΧΜΛ. Στο μοντέλο αυτό απέδειξαν ότι ο FOXO3a έχει βασικότατο ρόλο στην επιβίωση των ΧΜΛ HSCs[17]. Οι πληθυσμοί των κυττάρων που ήταν ικανοί να δημιουργήσουν λευχαιμία (Leukemia Initiating Cells-LIC) απέδειξαν ιδιαίτερα αυξημένη δραστικότητα του FOXO3a. Επιπλέον η ικανότητά τους να δημιουργούν νόσο ελαττωνόταν σημαντικά με την αναστολή του FOXO3a. Εξαιρετικά ενδιαφέρον στην ίδια μελέτη ήταν το γεγονός ότι ο TGFβ (transforming growth factor β) μπορούσε να καταστείλει το «μονοπάτι» AKT, οδηγώντας έτσι σε ενεργοποίηση του FOXO3a. Συνδυάζοντας το Imatinib με έλλειψη FOXO3a και αναστολή του TGFβ, η ΧΜΛ μπορούσε πλήρως να εξαφανιστεί από αυτό το συνγονιδιακό μοντέλο του ποντικού.

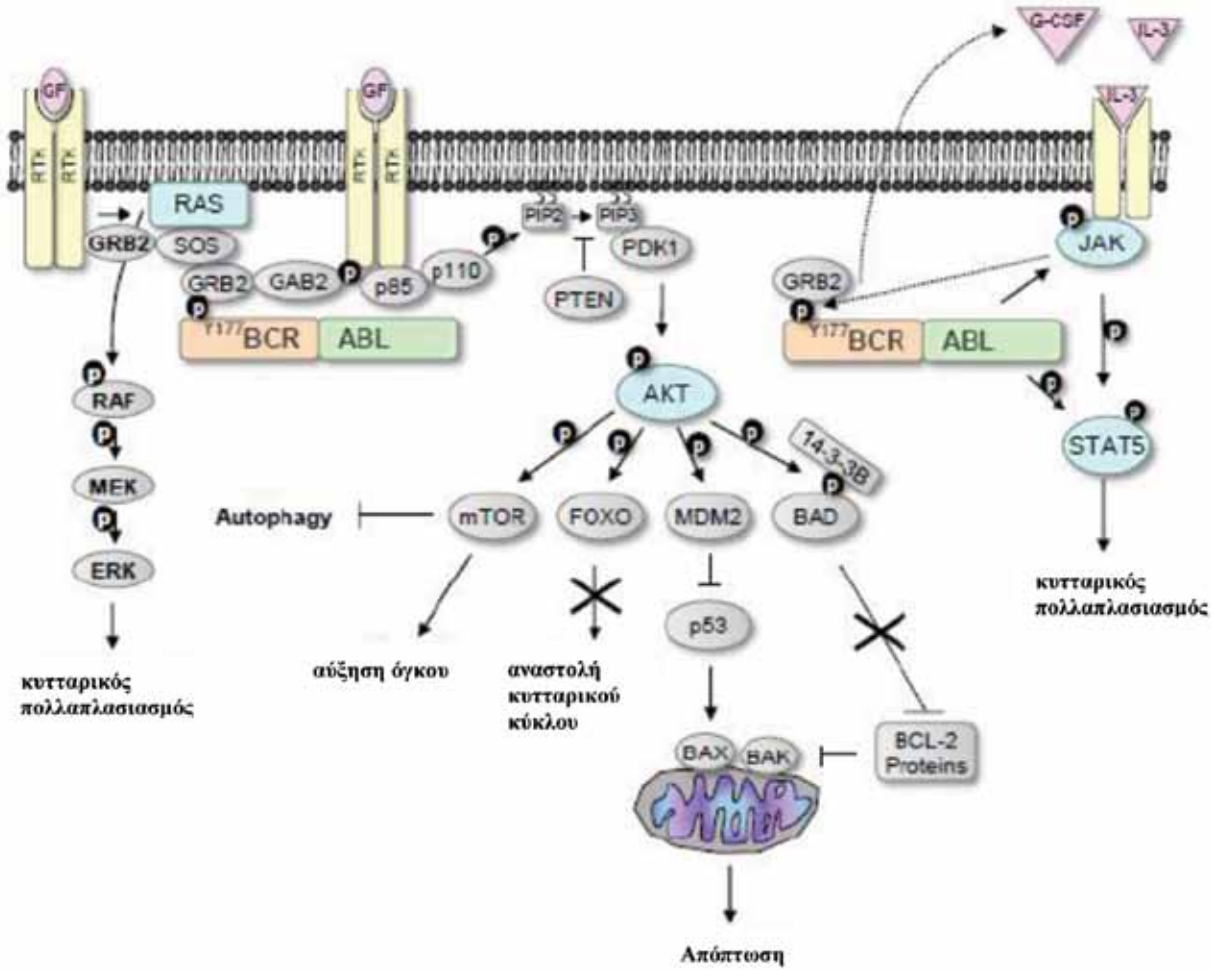
Έχουμε ήδη αναφέρει ότι οι TKIs ασκούν μία ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στα ΧΜΛ HSCs in vitro, και ως εκ τούτου δυνητικά συμβάλουν στην κυτταρική ηρεμία τους και την παραμονή της νόσου[9]. Αυτό ενδέχεται να εξηγείται από το γεγονός ότι οι TKIs ενεργοποιούν κυτταρικά μονοπάτια, όπως τις πρωτεΐνες FOXO, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και σταμάτημα στη G1 φάση. Κάποια πρώιμα στοιχεία δείχνουν ότι το σταμάτημα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου των ΧΜΛ HSCs, ενδέχεται να προκαλείται από επανενεργοποίηση των πρωτεϊνών FOXO[18].

Είναι πολύ πιθανό η πολύ καλή κατανόηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των TKIs στα ΧΜΛ HSCs, να μπορέσει στο μέλλον να βελτιστοποιήσει τη θεραπευτική τους στόχευση. Αυτό φαίνεται ότι μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αναστολής της επίκτητης κατάστασης κυτταρικής ηρεμίας που προκαλείται με την ενεργοποίηση των FOXO πρωτεϊνών, η οποία θα υποχρεώσει τα HSCs της νόσου να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο και να υποστούν απόπτωση.

Η τυροσινική κινάση JAK2

Η Janus Kinase (JAK) είναι μία οικογένεια από ενδοκυττάριες TKs που δεν αποτελούν υποδοχείς, οι οποίες μεταδίδουν κυτοκινο-εξαρτώμενα μηνύματα μέσω της οδού JAK/STAT και έχει φανεί ότι κατέχει καίριο ρόλο σε μία ποικιλία μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων[19]. Ο σχηματισμός της πρωτεΐνης BCR-ABL ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταξύ αυτών και του JAK/STAT[20,21]. Είναι πλέον επιβεβαιωμένο ότι η JAK2 είναι ενεργοποιημένη στα ανεξάρτητα από κυτοκίνες BCR-ABL θετικά κύτταρα[22]. Η BCR-ABL πρωτεΐνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη JAK2 προκειμένου να γίνει η φωσφωρυλίωση της τελευταίας. Η ενεργοποίηση της JAK2 γνωρίζουμε πια ότι παίζει βασικό ρόλο στην ογκογενητική ικανότητα του BCR-ABL[23]. Συνέπεια αυτού είναι ότι κινάσες όπως η JAK2 αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους για τη θεραπεία της ΧΜΛ.

Σε μία σχετικά πρόσφατη εργασία[24] το μόριο AG490, ένας εξειδικευμένος JAK2 αναστολέας, φάνηκε ότι προκαλεί σημαντικό βαθμό απόπτωσης σε κύτταρα μυελού των



Εικόνα 1. Η σηματοδότηση από το BCR-ABL μιμείται ενεργοποίηση από αυξητικούς παράγοντες[14].

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν υποδοχείς ΤΚ οδηγώντας στην ενεργοποίηση των μονοπατιών RAS και PI3-K. Τα συγκεκριμένα μονοπάτια είναι συχνά ενεργοποιημένα σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους. Η φωσφωρυλίωση της τυροσίνης 177 μέσα στο BCR τμήμα του BCR-ABL οδηγεί με ανάλογο τρόπο στην ενεργοποίηση των οδών αυτών, μέσω της αλληλεπίδρασης με την SH2 περιοχή του GRB2. Το GRB2 ενεργοποιεί το RAS αλληλεπιδρώντας με SOS και ενεργοποιεί το PI3-K διαμεσολαβώντας στην φωσφορυλίωση του GAB2. Η συνεχής ενεργοποίηση του PI3-K οδηγεί σε μετατροπή του PIP2 (phosphatidyloinositol biphosphate) σε PIP3 (phosphatidyloinositol triphosphate). Αυτό μπορεί να ανασταλεί από το PTEN, μία φωσφατάση που είναι κατασταλμένη σε πολλές μορφές καρκίνων. Το PIP3 αποτελεί ένα είδος πλατφόρμας για την στράτευση των κινασών θρεονίνης/σερίνης AKT και PDK1 (3-phosphoinositide –dependent protein kinase 1), οδηγώντας έτσι στη φωσφωρυλίωση και ενεργοποίηση του AKT. Το ενεργοποιημένο AKT φωσφορυλιώνει πολλαπλούς κατωφερείς στόχους που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, μεταξύ των οποίων τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO και την προαποπτωτική πρωτεϊνη BAD. Η φωσφωρυλίωση των FOXO από το AKT αναστέλλει την μετακίνηση των πρώτων στον πυρήνα του κυττάρου, δηλαδή καταστέλλει τη λειτουργία τους, οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η φωσφωρυλίωση από το AKT καταστέλλει την προαποπτωτική δραστηριότητα του BAD. Η φωσφωρυλίωση του BAD το αποτρέπει να συνδεθεί και να αναστείλει τη λειτουργία των αντιαποπτωτικών bcl2 πρωτεϊνών, οι οποίες αναστέλλουν τις προαποπτωτικές πρωτεϊνες BAK και BAX. Η ενεργοποίηση του AKT οδηγεί επίσης στην καταστολή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, MDM2. Επιπλέον το AKT φωσφωρυλιώνει την κινάση θρεονίνης/σερίνης mTOR. Η ενεργοποιημένη mTOR προωθεί την πρωτεϊνική μετάφραση και αναστέλλει την αυτοφαγία (autophagy).

Το BCR-ABL είναι επίσης γνωστόν ότι ενεργοποιεί την οδό JAK/STAT, η οποία πολύ συχνά είναι ενεργοποιημένη στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα. Η JAK είναι μία ΤΚ χωρίς τη μορφή υποδοχέα, η οποία ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες. Το BCR-ABL έχει φανεί ότι επάγει την παραγωγή IL3 & GCSF, γεγονότα που θα μπορούσαν οδηγήσουν στην ενεργοποίηση της JAK. Η ενεργοποιημένη JAK , όπως και το ίδιο το BCR-ABL φωσφωρυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα STAT5, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό.

οστών από ασθενείς με ΧΜΛ σε χρόνια, επιταχυνόμενη ή βλαστική φάση[24]. Το μόριο ήταν αποτελεσματικό ακόμα και σε κύτταρα από ασθενείς ανθεκτικούς στο Imatinib. Στην ίδια εργασία άλλοι JAK2 αναστολείς (TG101209, HBC) οδήγησαν σε απόπτωση, Imatinib ευαίσθητες και μη ΧΜΛ κυτταρικές σειρές.

Μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η διπλή αναστολή της JAK2 και των ABL κινασών με το μόριο ON44580, στοχεύει αποτελεσματικά Imatinib ευαίσθητα και μη κύτταρα από ασθενείς με ΧΜΛ ακόμα και σε βλαστική κρίση[25].

Είναι λογικό λοιπόν ποικίλοι αναστολείς της JAK2 να βρίσκονται σε διάφορα προκλινικά και κλινικά στάδια έρευνας, καθώς αντιπροσωπεύουν ελκυστικούς εναλλακτικούς τρόπους στόχευσης των ΧΜΛ HSCs (Πίνακας 1).

ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟ-ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΤΩΝ ΧΜΛ HSCs

Αν και η ικανότητα για αυτό-ανανέωση θεωρείται κεφαλαιώδους σημασίας για την διατήρηση των ΧΜΛ HSCs, οι μηχανισμοί που τη διέπουν και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται, κατά βάση δεν είναι γνωστά.

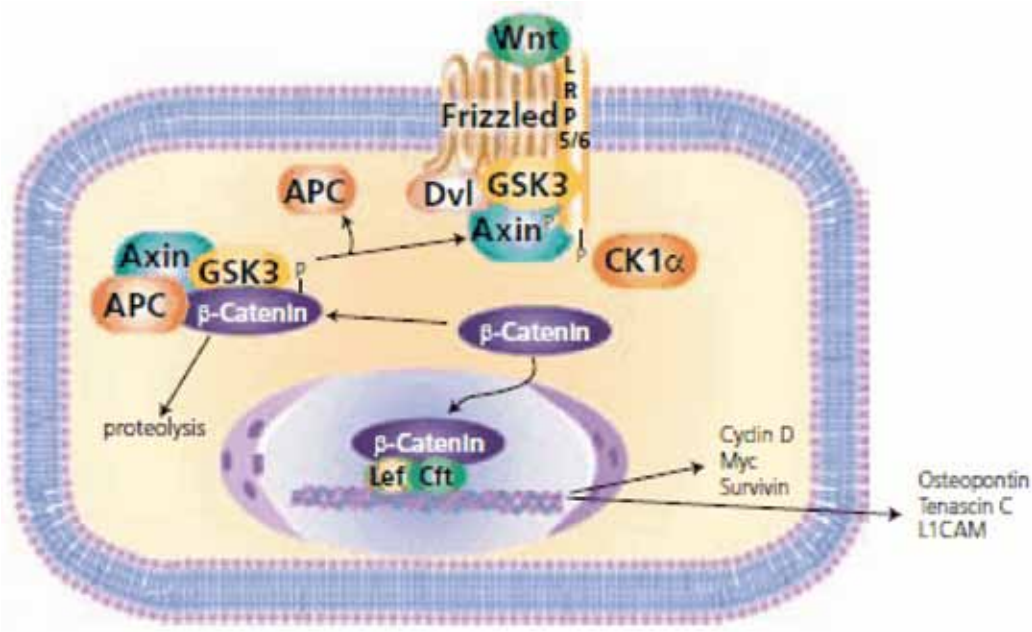
Η οδός Wnt (εικόνα 2)[26] προάγει την αυτό-ανανέωση, πολλαπλασιασμό και παροδική διαφοροποίηση των φυσιολογικών HSCs και εμπλέκεται στην ανάπτυξη και αναγέννηση των κυττάρων των σπονδυλωτών. Στα θηλαστικά διατηρεί τον πληθυσμό των HSCs που βρίσκονται σε ιστούς με ταχύ πολλαπλασιασμό (όπως το δέρμα και οι ενδοκρινείς αδένες), ενώ πολύ συχνά ανευρίσκεται μονίμως ενεργοποιημένη σε διάφορες μορφές καρκίνου και στη ΧΜΛ.

Πρόσφατη μελέτη από τους Zhao και συνεργάτες[27] έδωσε ισχυρές ενδείξεις ότι η σηματοδότηση μέσω Wnt/ β-catenin είναι απαραίτητη για την επιβίωση των φυσιολογικών και ΧΜΛ HSCs. Αυτό το εύρημα μαζί με μία παλαιότερη ανακοίνωση που απέδειξε ότι η ενεργοποίηση της β-catenin σε πρόδρομα της μυελικής σειράς κύτταρα, μπορεί να ευοδώσει την πρόοδο από τη χρόνια φάση στη βλαστική κρίση[28], αποδεικνύουν ότι η σηματοδοτική οδός Wnt/β-catenin μπορεί να αποτελέσει πιθανό μελλοντικό θεραπευτικό στόχο, με σκοπό την πλήρη ίαση από την ΧΜΛ. Βεβαίως μεγάλη προσοχή πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι από αυτή την οδό εξαρτώνται και τα φυσιολογικά HSCs. Το θεραπευτικό παράθυρο πιθανώς υπάρχει γιατί στα ΧΜΛ HSCs η Wnt/ β-catenin ενεργοποιείται με παρεκκλίνοντα τρόπο.

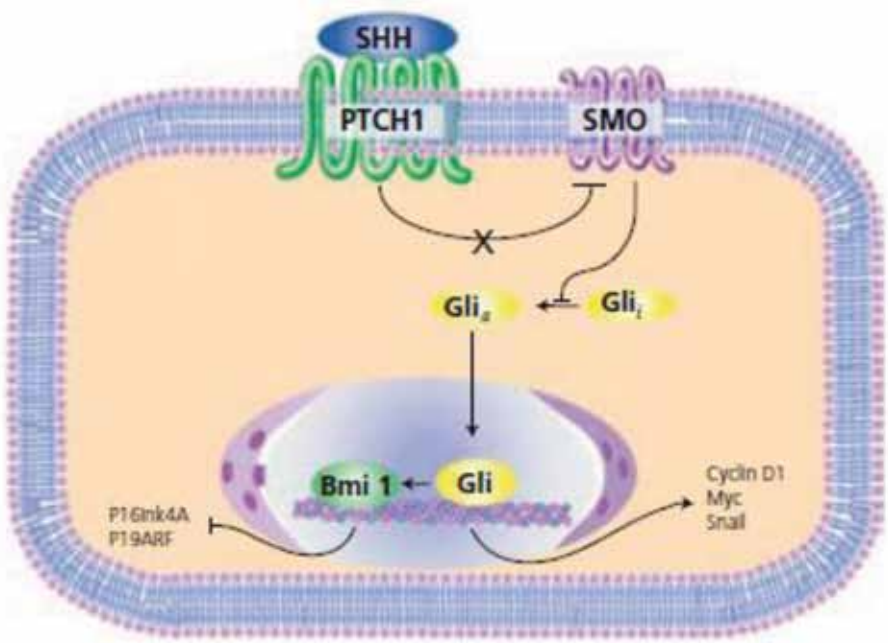
Ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα που υπάρχουν από μελέτες με διάφορους αναστολείς της β-catenin (π.χ. AV65, BC2059) σε κυτταρικές σειρές από ασθενείς με ΧΜΛ ακόμα και από Imatinib ανθεκτικούς ή με τη μετάλλαξη T315I[29,30].

Η οδός Hedgehog εν συντομία θα λέγαμε ότι προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυτο-ανανέωση των HSCs, μέσω αύξησης της έκφρασης των γονιδίων cyclin D1, myc & snail (εικόνα 3)[26]. Υπάρχουν 3 γνωστοί Hedgehog (Hh) συνδέτες. Ο καλύτερα μελετημένος είναι ο Sonic Hedgehog (SHH) συνδέτης.

Η SMO (smoothened) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αναμεταδίδει το σήμα της SHH. Χρησιμο-



Εικόνα 2. Η οδός Wnt[26].



Εικόνα 3. Η οδός Hedgehog[26].

ποιώντας ποντίκια που είχαν έλλειψη της SMO ή άλλα που έλαβαν ένα αναστολέα της SMO, την κυκλοπαμίδη, ο Zhao και οι συνεργάτες του[31] απέδειξαν ελάττωση στον αριθμό των ΧΜΛ HSCs και παράταση επιβίωσης σε ακτινοβολημένα ποντίκια που εξέφραζαν BCR-ABL HSCs. Αντίθετα φάνηκε ότι η διαγονιδιακή έκφραση μίας ενεργοποιημένης μορφή SMO οδήγησε σε αυξημένο αριθμό ΧΜΛ HSCs και επιτάχυνση της αύξησης του όγκου. Με αυτόν τον τρόπο οι συγγραφείς υπονοούν ότι η διαταραχή στην οδό Hedgehog μπλοκάρει την πρόοδο της ΧΜΛ με το να επηρεάζει τα ΧΜΛ HSCs. Εν τούτοις στη συγκεκριμένη μελέτη υπήρχε ελάττωση της επιβίωσης και των φυσιολογικών HCSs, γεγονός που αποθάρρυνε την κλινική εφαρμογή της μεθόδου.

Τρείς όμως διαφορετικές μελέτες έδειξαν ότι τα φυσιολογικά HCSs δεν εξαρτώνται από την οδό Hedgehog για την επιβίωσή τους[32-34].

Σε μία σχετικά πρόσφατη εργασία στο ASH Annual Meeting το 2009 οι Irvine και οι συνεργάτες έδειξαν ότι ο αναστολέας SMO, LDE225, σε συνδυασμό με το nilotinib, εξαφανίζει τα ΧΜΛ HSCs και τα προγονικά κύτταρα.

Επί του παρόντος είναι ενεργείς διάφορες κλινικές μελέτες φάσης I/II που μελετούν τη δράση SMO αναστολέων σε συνδυασμό TKIs (πίνακας 1). Μία εξ'αυτών είναι η μελέτη του συνδυασμού του dasatinib με τον SMO αναστολέα BMS-833923 για ασθενείς με χρόνια φάση ΧΜΛ που εμφάνισαν πρόοδο νόσου ή αποτυχία ενώ βρίσκονταν υπό θεραπεία με TKIs (NCT01218477). Άλλοι αναστολείς όπως τα μόρια LDE225 & LEQ506 χρησιμοποιούνται σε φάσεις I μελέτες για συμπαγείς όγκους (NCT00880308, NCT00961896, NCT01033019, NCT01125800, NCT01106508).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PML (PROMYELOCYTIC LEUKEMIA)

Προσφάτως φάνηκε ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PML επιτρέπει στα ΧΜΛ HSCs να διατηρούν την ηρεμία τους. Η PML είναι μία πρωτεΐνη που κατέχει βασικότατο ρόλο στην απόπτωση, την κυτταρική διαφοροποίηση και την κυτταρική γήρανση. Η PML υπερεκφράζεται σε βλάστες από ασθενείς με ΧΜΛ, ενώ χαμηλά επίπεδα PML αντιστοιχούν με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και βελτίωση επιβίωσης[35]. Όπως φάνηκε από την εργασία των Ito και συνεργατών[35], τα ΧΜΛ HSCs που δεν εκφράζουν την PML, μπαίνουν στον κυτταρικό κύκλο και οδηγούνται σε εξάντληση και στη συνέχεια δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν λευχαιμία σε πειραματόζωα όταν μεταμοσχεύονται.

Το τριοξείδιο του αρσενικού (As2O3), παραδοσιακό κινέζικο φάρμακο, γνωρίζουμε ότι οδηγεί σε αποδόμηση της PML και έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες, αποδεικνύοντας δραστικότητα κατά των ΧΜΛ HSCs , χωρίς να είναι τοξικό. Το ενδιαφέρον είναι ότι τα φυσιολογικά HSCs που δεν εκφράζουν PML είναι λιγότερο ευάλωτα στη χημειοθεραπεία από τα λευχαιμικά αντίστοιχά τους, γεγονός που αποτελεί ένα είδος «θεραπευτικού παράθυρου» στη στοχευμένη θεραπεία της ΧΜΛ.

Μία φάσης I/II μελέτη για την ασφάλεια ,την ανεκτικότητα και την αντιλευχαιμική δράση του As2O3 σε συνδυασμό με Imatinib σε ασθενείς με ανθεκτική ΧΜΛ σε χρόνια φάση, ολοκληρώθηκε πρόσφατα (NCT00053248) και τα αποτελέσματά της αναμένονται. Επιπλέον μία άλλη ανάλογη φάσης II μελέτη είναι ακόμα ανοιχτή για ένταξη ασθενών (πίνακας 1).

Η ΒΟΗΘΗΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 1- (INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN-IL1RAP)

Η IL1RAP είναι ένας Toll-like υποδοχέας που μεσολαβεί στη λειτουργία της IL-1 και στη μετάδοση του μηνύματος της IL-33. Η IL-33 είναι μία κυτοκίνη που ενεργοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα, μέσω της σύνδεσης με τον υποδοχέα της, ST2 και στη συνέχεια διμερίζεται με την IL1RAP. Η IL1RAP έχει φανεί ότι υπερεκφράζεται στα ΧΜΛ HSCs[36,37]. Τα τελευταία χρόνια αποκαλύφθηκε ότι IL1RAP αποτελεί επιφανειακό δείκτη των ΧΜΛ HSCs και αυτή η ιδιότητα επέτρεψε την επαγωγή κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενης από το αντίσωμα (ADCC).

In vitro η υπερέκφραση του BCR-ABL σε ομφαλοπλακουντιακά κύτταρα, οδηγεί σε υπερέκφραση και του IL1RAP, επιβεβαιώνοντας τη σχέση εξάρτησης με το BCR-ABL ογκογονίδιο[1].

Χρησιμοποιώντας ένα καινοτόμο πρωτόκολλο FISH (fluorescence in situ hybridization), το οποίο ονομάζεται Flow-drop-FISH σε LTCIC καλλιέργειες, οι Jaras και συνεργάτες έδειξαν ότι τα CD34+CD38-,IL1RAP+ κύτταρα είναι κυρίως λευχαιμικά, ενώ τα CD34+CD38-, IL1RAP- είναι βασικά Ph αρνητικά[36].

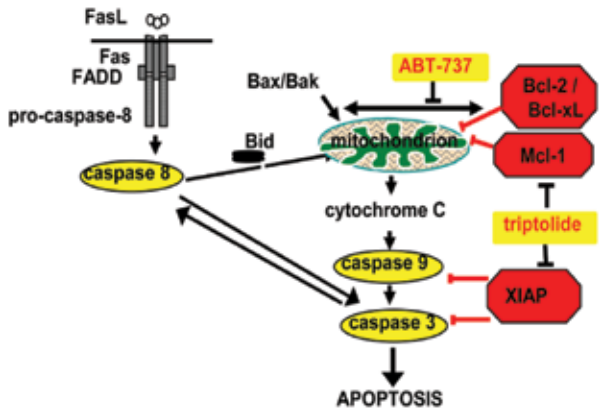
Ένα πολυκλωνικό anti-IL1RAP1 αντίσωμα έχει κατασκευαστεί και έχει φανεί ότι μπορεί να στοχεύσει τα λευχαιμικά και όχι τα φυσιολογικά HSCs. Εν τούτοις η επιλεκτική κυτταροτοξική δραστικότητα του νέου αυτού αντισώματος κατά των λευχαιμικών έναντι των φυσιολογικών HSCs δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί σε αυστηρώς καθορισμένες σειρές από HSCs ή με μεταμοσχευτικές μεθόδους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Παρόλα αυτά το αντίσωμα anti-IL1RAP είναι πολύ πιθανό να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία της ΧΜΛ[38].

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΑ ΧΜΛ HSCs

Η απόπτωση, δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ελέγχεται από μία εξωγενή οδό μέσω υποδοχέων που μεσολαβούν στον κυτταρικό θάνατο και από την ενδογενή οδό στην οποία βασικό ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια (εικόνα 4). Η απόπτωση με διάφορους τρόπους διαδραματίζει βασικό ρόλο στη φυσιολογία των ζωικών ειδών.

Πίνακας 1.

Συνδυασμός φαρμάκων	NCT-identifier	Φάση
- As2O3+ Imatinib για ΧΜΛ σε ΧΦ - As2O3+ TKIs για ΧΜΛ σε ΧΦ	00053248 01397734	II/ ολοκληρώθηκε η ένταξη ασθενών II/ανοιχτή
- Nilotinib +Peg-IFN-2α (NILOPEG) για πρωτοδιαγνωσμένες ΧΜΛ σε ΧΦ - Imatinib + Peg-IFN-α2a σε ΧΜΛ σε ΧΦ - Nilotinib + IFN-a σε δυσανεξία ή ανθεκτικότητα στο Imatinib σε ΧΜΛ/ΧΦ (NICOLI)	01294618 00573378 01220648	II/ανοιχτή II/ανοιχτή II/ανοιχτή
Imatinib+/- Hydrochloroquine (CHOICES) σε ΧΜΛ/ΧΦ	01227135	II/ανοιχτή
- Dasatinib + SMO antagonist (BMS-833923) σε ΧΜΛ/ΧΦ μετά από αντοχή στο Imatinib - Nilotinib+ SMO antagonist (LDE225) σε ΧΜΛ/ΧΦ σε ανθεκτικότητα σε άλλους TKIs	01218477 001456676	II/ανοιχτή II/ανοιχτή
JAK2 inhibitor (SB1518) σε ανθεκτικές ή σε υποτροπή αιματολογικές κακοήθειες (και ΧΜΛ)	00719836	I/II/ συνεχίζεται- ολοκληρώθηκε η ένταξη ασθενών



Εικόνα 4[11]. Η εξωγενής αποπτωτική οδός μέσω υποδοχέων που μεσολαβούν στον κυτταρικό θάνατο και η ενδογενής αποπτωτική οδός μέσω μιτοχονδρίων. Η ABT-737 προάγει την απόπτωση με το να ανταγωνίζεται την Bcl-2 και την Bcl-xL, ενώ το triptolide προκαλεί απόπτωση εν μέρει με το να ελαττώνει την XIAP και την Mcl-1.

Η απορρύθμιση της απόπτωσης πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των ΧΜΛ-HSCs από τον κυτταρικό θάνατο. Στην πραγματικότητα HSCs που εκφράζουν το BCR-ABL, έχει φανεί ότι εκφράζουν υψηλά επίπεδα από τις αντιαποπτωτικές πρωτεϊνες Bcl-xL & Mcl-1 και χαμηλά επίπεδα από την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bim. Η αναστολή της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL σε αυτά τα κύτταρα οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της Mcl-1 και Bim[39,40].

Το ABT-737, ένας εκλεκτικός αναστολέας Bcl-2, Bcl-xL& Bcl-w (εικόνα 4), έχει δείξει ισχυρή αντιλευχαιμική δράση, μεταξύ άλλων σε προγονικά κύτταρα από ΟΜΛ[41]. Η αναστολή των Bcl-2/BclxL από το ABT-737, φάνηκε ότι ενισχύει τη δράση του Imatinib στα ΧΜΛ κύτταρα[42]. Επιπλέον ο συνδυασμός του ABT-737 με τον δεύτερης γενιάς TKI, INNO-406, έχει φανεί ότι αυξάνει την απόπτωση, ακόμα και στα INNO-ανθεκτικά κύτταρα με σημειακές μεταλλάξεις του BCR-ABL, εκτός από τη μετάλλαξη T315I[43].

Το Bcl-2 antisence ολιγονουκλεοτίδιο-Genasence-έδειξε δραστικότητα εναντίον Imatinib-ανθεκτικών BCR-ABL+ κυττάρων[44].

Επιπλέον η surviving, μία πρωτεϊνη που ανήκει στην οικογένεια IAP (inhibitors of apoptosis proteins), ελέγχεται από την κινάση BCR-ABL και υπερεκφράζεται στα ΧΜΛ κύτταρα, ενώ η στόχευση της surviving ξεπερνά την αντίσταση στο Imatinib[45].

Η πρωτεϊνη XIAP, ο πιο ισχυρός αναστολέας καspάσης της οικογένειας IAP, υπερεκφράζεται στα ΧΜΛ κύτταρα και το triptolide (εικόνα 4), ένας παράγων που απομονώθηκε από κινέζικα βότανα, ελαττώνει τα επίπεδα του XIAP, του Mcl1 και του BCR-ABL και προάγει την ανεξάρτητη του BCR-ABL απόπτωση των ΧΜΛ κυττάρων. Χρησιμοποιώντας αυτή ακριβώς την ιδιότητα του triptolide, οι Mak και συνεργάτες μελέτησαν τη δραστικότητα του στη ΧΜΛ και έδειξαν ότι το triptolide προκαλεί κυτταρικό θάνατο, ανεξάρτητα από τις ανταποκρίσεις στο Imatinib σε ΧΜΛ HSCs[46], είτε μόνος του είτε σε συνδυασμό με τον αναστολέα ABT-737[47].

Επαγωγή απόπτωσης ώστε εκλεκτικά να θανατώνονται τα ΧΜΛ HSCs, έχει φανεί ότι μπορεί να προκληθεί από τον αναστολέα της φαρνεσυλτρανσφεράσης BMS-214662, εν μέρει μέσω ενεργοποίησης του Bax. Η κυτταροτοξικότητα αφορούσε κυτταρικές σειρές HSCs που είχαν μεταλλάξεις ανθεκτικές στο Imatinib ακόμα και την T315I[48].

Η Ιντερφερόνη άλφα (IFN-α) πέρα από τις γνωστές έμμεσες επιδράσεις στις ανοσιακές και αντιοαγγειογενετικές απαντήσεις, άμεσα μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση πληθώρας γονιδίων (όπως TRAIL, Fas/FasL, caspase 8, XIAP associated factor -1 ή XAF-1), τα οποία προάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Με άλλα λόγια δηλαδή η IFN-α επάγει την διαδικασία της απόπτωσης[11]. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η σχετικά πρόσφατη ανακοίνωση από τους Essers και συνεργάτες στο Nature[49], η οποία έδειξε ότι η IFN-α ενεργοποιεί τα αδρανή HSCs και προάγει τον πολλαπλασιασμό τους με το να αυξάνει τη φωσφορυλίωση των STAT1 και Akt και την έκφραση των γονιδίων στόχων, μέσω της δραστηριοποίησης του αντιγόνου των βλαστικών κυττάρων-1, σε in vivo πειραματικά μοντέλα ποντικών. Αυτή η παρατήρηση σημαίνει ότι κατά πάσα πιθανότητα ότι η IFN-α στοχεύει τα ΧΜΛ HSCs με το να ωθεί ήρεμα αρχέγονα CD34+ ΧΜΛ πρόδρομα κύτταρα μέσα στον κυτταρικό κύκλο. Ο συνδυασμός της εξόδου των ΧΜΛ HSCs από την κατάσταση ηρεμίας με την αυξημένη απόπτωση, που προκαλείται από την IFN-α, πιθανότατα είναι η αιτία πρόσφατων παρατηρήσεων ότι η η IFN-α μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνιες υφέσεις σε ασθενείς με ΧΜΛ[50].

Υπάρχουν επίσης μελέτες που δείχνουν ότι ο συνδυασμός IFN-α και Imatinib μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερα ποσοστά υφέσων. Η πιο πρόσφατη από αυτές τις μελέτες, η SPITIT trial[51] έδειξε ότι ο συνδυασμός PEG-IFN-α και Imatinib οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά μείζονος και πλήρους μοριακής ύφεσης. Επί του παρόντος είναι ενεργείς αρκετές μελέτες φάσης ΙΙ που μελετούν τον συνδυασμό IFN-α και TKIs σε νεοδιαγνωσθένετες ασθενείς με ΧΜΛ (πίνακας 1)

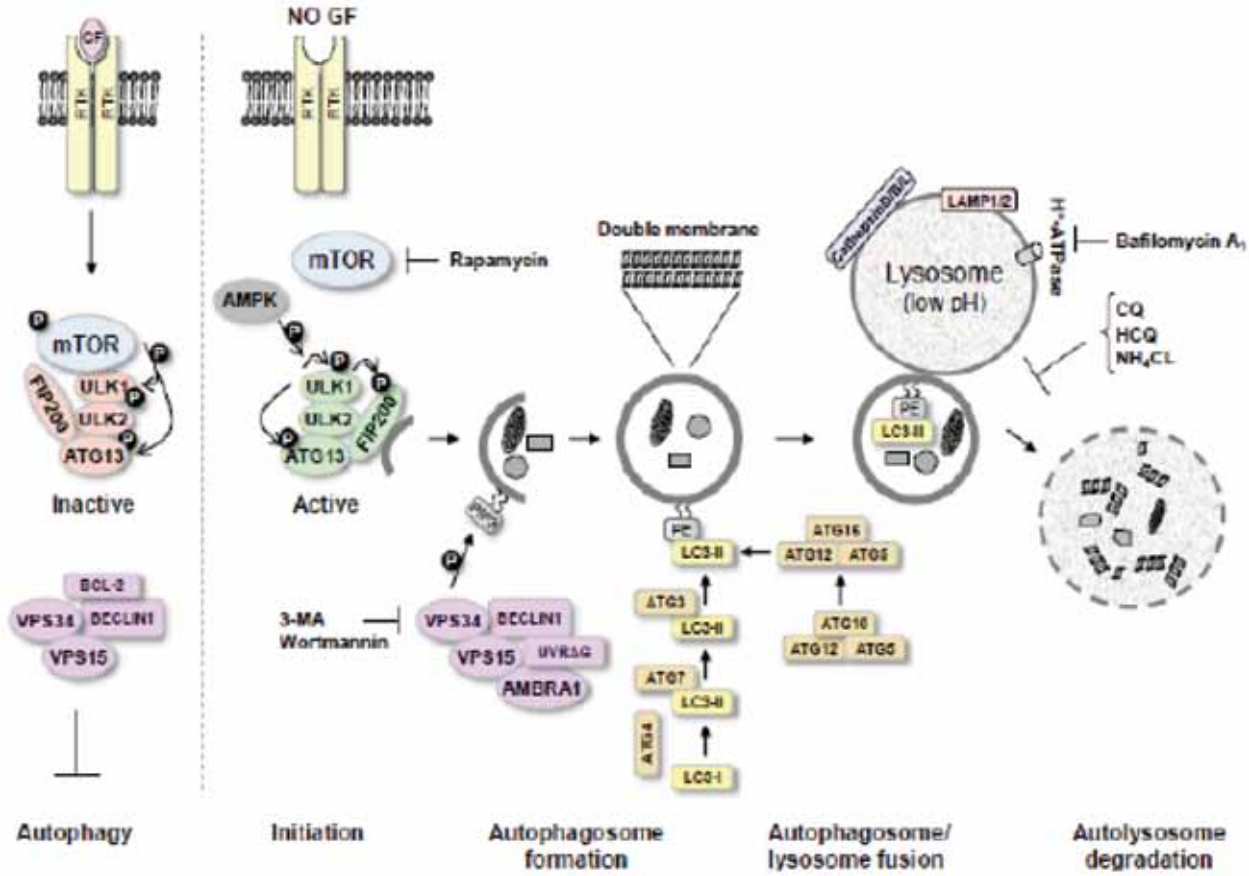
Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ (AUTOPHAGY)

Η αυτοφαγία είναι μία διαδικασία ανακύκλωσης, η οποία οδηγεί σε εγκλωβισμό και αποδόμηση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και άλλων ενδοκυττάριων πρωτεϊνών μέσα στα λυσοσώματα (εικόνα 5). Η ανακύκλωση αυτών των ενδοκυττάριων υλικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως

εναλλακτική πηγή ενέργειας σε περιόδους μεταβολικού stress ή ασιτίας, προκειμένου να διατηρείται η ομοιοστασία των κυττάρων και να εξασφαλίζεται η επιβίωσή τους[14].

Κατανόηση των μηχανισμών της μοριακής ρύθμισης της αυτοφαγίας, επιτεύχθηκε μόνο τα τελευταία 10 έτη. Η αυτοφαγία έχει μελετηθεί πολύ καλά σε μύκητες, όπου βρέθηκαν πάρα πολλά γονίδια που έχουν σχέση με τη αυτοφαγία (autophagy related genes-ATG). Η διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε διαδοχικά βήματα, τα οποία τελικά καταλήγουν σε αποδόμηση των κυτταροπλασματικών υλικών μέσα στα λυσοσώματα (εικόνα 5).

Όπως ήδη είδαμε η σηματοδότηση μέσω του BCR-ABL οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού PI3-K/AKT και του mTOR. Η αναστολή του BCR-ABL με TKIs έχει



Εικόνα 5. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας[14].

Η αυτοφαγία ξεκινά με την ενεργοποίηση του συμπλόκου ULK1/2 κινασών, το οποίο περιλαμβάνει τα μόρια ATG13 και FIP200. Το mTOR καταστέλλει τη δραστικότητα του συμπλόκου με τη φωσφωρυλίωση των ULK1 & ATG13 στις «αρνητικές» θέσεις. Το σύμπλοκο καθίσταται ενεργό ύστερα από AMPK ενεργοποίηση και αναστολή του mTOR, με τη χρήση παραδείγματος χάριν της ραπαμυκίνης ή κατά τη διάρκεια περιόδων ασιτίας. Το φωσφωρυλιωμένο και κατά συνέπεια ενεργό ULK1 προάγει τη φωσφωρυλίωση του ATG13 και του FIP200 και την αποκόλληση από το mTOR Το PI3-K-III VPS34 είναι βασικό για τον περαιτέρω σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Το VPS34 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το VPS15, URAG, AMBRA1 και BECLIN1. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να ανασταλεί από την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2, η οποία αλληλεπιδρά με το BECLIN1 μέσω του BH3 τομέα. Η ολοκλήρωση του αυτοφαγοσώματος γίνεται με τα συνδετικά συστήματα ATG8 (LC3)-PE και ATG12/ATG5. Τα συστήματα αυτά προκαλούν λιπιδιακή διαμόρφωση του LC3-I σε LC3-II-PE, οδηγώντας σε σύνδεσή του με την αυτοφαγοσωματική μεμβράνη. Η μετατροπή του LC3-I σε LC3-II συχνά χρησιμοποιείται για να εκτιμάται η αυτοφαγία σε διάφορες καλλιέργειες. Τα ολοκληρωμένα αυτοφαγοσώματα περιλαμβάνουν υλικά όπως πρωτεΐνες και οργανίδια, τα οποία πέπτωνται ύστερα από σύνδεση με λυσοσώματα. Τα λυσοσώματα έχουν χαμηλό pH και πληθώρα pH ευαίσθητων ενζύμων που μεταβολίζουν αυτά τα άχρηστα υλικά και την κυτταρική σκόνη. Η αποδόμηση των αυτολυσοσωμάτων μπορεί ως εκ τούτου να απομακρύνει ανεπιθύμητα υλικά, όπως κατεστραμμένες πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα προμηθεύει τα κύτταρα με καινούριο δομικό υλικό για την διατήρησή τους. Ο αναστολέας mTOR, ραπαμυκίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προαχθεί η αυτογαγία. Αναστολείς του VPS34 όπως το 3-MA και Wortmannin μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναστολή πρώιμων σταδίων αυτοφαγίας. Οι Bafilomycin A1, CQ, HCQ και NH4Cl που αναστέλλουν την ένωση των αυτοφαγωσωμάτων με τα λυσοσώματα, μπορεί να αναστείλουν την αυτοφαγία σε απώτερα στάδια.

φανεί ότι όχι μόνο προάγει την απόπτωση, αλλά και την αυτοφαγία[52].

Το 2006[53] οι Yan και συνεργάτες έδειξαν ότι η νευροτοξίνη crotoxin επάγει την αυτοφαγία στην κυτταρική σειρά K562 και ότι το σταμάτημα της αυτοφαγίας με την 3-MA (3-methyladenine) και το NH4Cl προάγει την κυτταροτοξικότητα από τη νευροτοξίνη.

Το 2007 οι Carew και συνεργάτες[54] έδειξαν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας με CQ (chloroquine) ενισχύει την αντινεοπλασματική δράση του αναστολέα αποακετυλίωσης ιστονών (SAHA), σε πρωτοπαθώς ανθεκτικά στο Imatinib ΧΜΛ κύτταρα. Αυτές οι δύο μελέτες ήταν η πρώτη απόδειξη ότι τα ΧΜΛ κύτταρα επάγουν την αυτοφαγία ως μηχανισμό κυτταρικής επιβίωσης ύστερα από θεραπεία με αντινεοπλασματικά φάρμακα, υπονοώντας ότι η αναστολή της αυτοφαγίας θα μπορούσε να είναι μία καινοτόμος θεραπευτική οδός σε περιπτώσεις αντοχής στο Imatinib.

Η πιο ισχυρή εν τούτοις ένδειξη ότι η αναστολή της αυτοφαγίας μπορεί να ενισχύει την αποτελεσματικότητα του Imatinib στη θεραπεία της ΧΜΛ ήρθε με τις εργασίες των Bellodi και συνεργατών το 2009[55] και στη συνέχεια το 2011 από την εργασία των Crowely και συνεργατών[56] . Οι δύο αυτές εργασίες έδειξαν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας σε συνδυασμό με τη θεραπεία με TKIs (imatinib, dasatinib ή nilotinib) , προκαλεί σχεδόν πλήρη εξαφάνιση των φαινοτυπικά και λειτουργικά καθορισμένων ΧΜΛ HSCs. Το πιο πιθανό είναι ότι η θεραπεία με TKIs προάγει την αυτοφαγία με το να αναστέλλει τον mTOR, τον αρνητικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας και οι ανωτέρω εργασίες έδειξαν ότι πιθανότατα συμμετέχει το stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί.

Όλα τα προαναφερθέντα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές με ΧΜΛ HSCs οδήγησαν στη δημιουργία μίας κλινικής μελέτης φάσης ΙΙ, την CHOICES (CHlOroquine and Imatinib Combination to Eliminate Stem cells-NCT01227135)-πίνακας 1. Πρόκειται για μία τυχαιοποιημένη μελέτη του Imatinib έναντι Imatinib και χλωροκίνη για ασθενείς με ΧΜΛ σε μείζονα κυτταρογενετική ύφεση (MCyR), με ανιχνεύσιμη νόσο με την ποσοτική PCR και είναι η πρώτη κλινική μελέτη που χρησιμοποιεί την αναστολή της αυτοφαγίας στη ΧΜΛ.

Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΩΝ BMI1 (B CELL SPECIFIC MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS INTEGRATION SITE 1)

Ο BMI1 είναι μέλος της ομάδας γονιδίων polycomb, και λειτουργεί ως κατασταλτής μεταγραφής, διατηρώντας βασικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Κατέχει σημαντική θέση τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα λευχαιμικά HSCs[54]. Η έκφραση του BMI1 είναι εντονότερη σε πιο αρχέγονους πληθυσμούς HSCs και ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης[58,59].

Οι Rizo και συνεργάτες έδειξαν ότι εισάγοντας το BMI1 σε βλαστικά και πρόδρομα αιμοποιητικά ομφαλοπλακουντιακά κύτταρα ανθρώπου, παρατείνεται η διατήρηση της δεξαμενής τους μέσω αυτοανανέωσης των HSCs[60].

Το BMI1 έχει φανεί ότι έχει εντονότερη έκφραση στα στα ΧΜΛ CD34+ από τα φυσιολογικά ομόλογά τους. Επιπλέον η επαγωγή έκφρασης BMI1 με ρετροϊούς σε ΧΜΛ CD34+ κύτταρα από ασθενείς με πρωτοδιάγνωση ΧΜΛ σε χρόνια φάση, οδήγησε σε αύξηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας και των ιδιοτήτων αυτοανανέωσης[61].

Αν και δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή στοιχεία ότι το BMI1 από μόνο του μπορεί να επάγει λευχαιμία, η συνέκφραση του BMI και του BCR-ABL σε ανθρώπινα CD34+ κύτταρα, είναι ικανή να οδηγήσει σε μεταμοσχεύσιμη λευχαιμία σε NOD/SCID ποντίκια[60,61].

Εν κατακλείδι το BMI1 είναι βασικό στοιχείο της φυσιολογικής και λευχαιμικής αιμοποίησης και ως εκ τούτου αντιπροσωπεύει ιδανικό στόχο για τη θεραπεία της ΧΜΛ.

Η ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ PP2A (PROTEIN POSPHATASE 2A)

Η PPA2 είναι βασική κυτταρική φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης και εμπλέκεται σε μία πλειάδα κυτταρικών λειτουργιών. Έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση ως ογκοκατασταλτικός παράγων και υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί η επανενεργοποίησή της να βοηθήσει στη θεραπεία της ΧΜΛ[62].

Οι Neviani και συνεργάτες έδειξαν με την πολύ σημαντική εργασία τους[63] ότι η PPA2 αδρανοποιείται στα CD34+ ΧΜΛ προγονικά κύτταρα. Η αδρανοποίηση αυτή είναι αποτέλεσμα της δράσης του αναστολέα της PPA2, της πρωτεϊνης SET. Το BCR-ABL επάγει την έκφραση της πρωτεϊνης SET με έναν δοσοεξαρτώμενο και κινασο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η JAK2 κατέχει επίσης ρόλο στην ενεργοποίηση του SET κατωφερώς του BCR-ABL[24]. Τόσο σε Imatinib ευαίσθητα όσο και σε Imatinib ανθεκτικά κύτταρα αλλά και σε κύτταρα από ασθενείς με ΧΜΛ σε βλαστική κρίση, η επαγωγή της δραστικότητας της PPA2, προάγει την φωσφωρυλίωση του BCR-ABL, οδηγώντας σε αναστολή της αύξησης του όγκου, αυξημένη απόπτωση και ελαττωμένη in vivo ικανότητα λευχαιμογένεσης[63].

Καθώς με βάση τα ανωτέρω η επαγωγή της δράσης της φωσφατάσης PPA2 είναι πιθανός θεραπευτικός στόχος για τη ΧΜΛ, η Novartis δοκιμάζει έναν ισχυρό ενεργοποιητή της, το μόριο FTY720 (Gilenia®) με πολύ εντυπωσιακά αποτελέσματα σε προκλινικό στάδιο προς το παρόν, ακόμα και για τις κυτταρικές σειρές με την μετάλλαξη T315I[64].

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι τρέχουσες κλινικές μελέτες φαρμάκων που στοχεύουν τα ΧΜΛ-HSCs με ή χωρίς συνδυασμό με TKIs.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Για πολλά χρόνια η ΧΜΛ αντιπροσώπευε ένα μοντέλο και ένα παράδειγμα για τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, την εξάρτηση από το ογκογονίδιο και τις στοχευμένες θεραπείες. Με την είσοδο των TKIs στη θεραπεία της ΧΜΛ «ξεκίνησε ένα ταξίδι» με στόχο την ίαση, χρησιμοποιώντας φάρμακα μη τοξικά από του στόματος. Το βασικό σημερινό εμπόδιο για την πλήρη ίαση των ασθενών σε χρόνια φάση βρίσκεται στον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων της ΧΜΛ,ο οποίος ούτε ογκοεξαρτώμενος ούτε TKI ευαίσθητος είναι. Η παρούσα ανασκόπηση με στοιχεία από τη βασική φυσιολογία των ΧΜΛ HSCs έδειξε ότι αυτά έχουν πολλαπλές ιδιαιτερότητες, οι οποίες επάγονται εν μέρει από το BCR-ABL, αλλά μπορεί να είναι και ανεξάρτητες από αυτό και οι οποίες ενδέχεται να αποτελέσουν ιδανικούς θεραπευτικούς στόχους. Οι νέοι αυτοί θεραπευτικοί στόχοι σε συνδυασμό με τους TKIs θα μπορέσουν στο μέλλον να οδηγήσουν σε αυτό που ονομάζουμε απόλυτη ίαση στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία.

CML stem cells: the pathway to CML cure?

by Maria Dimou, Panayiotis Panayiotidis

1st Department of Propaedeutic Medicine, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

ABSTRACT: Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder which originates from Hemopoietic Stem Cells-HSC carrying the chromosomal translocation t(9;22). The hallmark of the disease is the production of the fusion gene/protein BCR-ABL which is responsible for the pathogenesis of CML. Tyrosin Kinase Inhibitors-TKIs, target BCR-ABL and have revolutionized the therapy of CML, leading to complete cytogenetic responses and long term survival of patients. In some patients "complete molecular responses" have been obtained ; studies in CML patients who were in "complete molecular response" and discontinued treatment with Imatinib have shown that in the majority of patients a molecular relapse of CML has occurred. This proves that the stem cell population of CML is not eliminated by long term Imatinib therapy. CML stem cells use a variety of biochemical pathways for their survival, autorenewal, inhibition of apoptosis etc. Both Imatinib mesylate and mainly newer TKIs (nilotinib, dastinib etc) lead to deep molecular responses but in vitro studies have shown that they are not able to eliminate the CML HSCs population. Combination studies in CML patients using inhibitors targeting both BCR-ABL and other biochemical pathways present in CML stem cells may lead to "functional cure" in a substantial proportion of CML patients.

Βιβλιογραφία

1. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat Rev Cancer. 2005; 5:172-83.
2. Bhatia R, Holtz M, Niu N, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronc myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. Blood. 2003;101(12):4701-7.
3. Su Chu AL, Mc Donald T, Snyder DS, et al. Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytognetic remission on imatinib treatment for 5 years (abstract) Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2008; 112:194.
4. Mahon FX, Rea D, Guillot J, et al. Discontinuation of Imatinib in patients with Chronic Myelogenous Leukemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: The prospective multicenter Stop IMatinib trial. Lamcet Oncol. 2010; 11(11):1029-35.
5. Jorgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in VD34+ CML cells. Blood 2007; 109(9):4016-4019.
6. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS 354825) targets an earlier progenitor population than Imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescence fraction. Blood. 2006; 107(11):4532-4539.
7. Konig H, Copland M, Chu S, Jove R, Holyoake TL, Bhatia R. Effects of dastinib on SRC kinase activity and downstream intracellular signaling in primitive chronic myelogenous leukemia hematopoietic cells. Cancer Res. 2008; 68(23):9624-9633.
8. Konig H, Holyoake TL, Bahtia R. Effective and selective inhibition of chronic myeloid leukemia primitive hemat-

opoietic progenitors by the dual Src/ Abl kinase inhibitor SKI-606. Blood. 2008; 111 (4): 2329-2338.
9. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human Cronic Myeloid Leukemia Stem Cells are insensitive to Imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. J Clin Invest. 2011; 121:396-409.
10. Hamilton A, Hegalson V, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on BCR-ABL kinase activity for their survival. Blood. 2012; 119 (6):1501-1510.
11. Carter B, Mac D, Cortes J, Andreeff M. The elusive CML stem cell: does it matter and how do we eliminate it? Semin Hematol. 2010; 47(4): 362-370.
12. Florian S, Sonneck K, Hauswirth AW, et al. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies. Leuk Lymphoma 2006; 47:207-222.
13. Herrmann H, Cerny-Reiterer C, Gleixner CV, et al. CD34+/CD38- stem cells in chronic myeloid leukemia express Siglec-3 (CD33) and are responsive to the CD33-targeting drug gemtuzumab/ozogamycin. Hematologica. 2012; 97(2):219-226.
14. Helgason VG, Karvela M, Holyoake TL. Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. Blood (prepublished on line 21 June 2011. doi: 10. 1182/blood-2011-01-330621)
15. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosomepositive cells. Blood. 1995; 86(2):726–36.
16. Tothova Z, Gilliland DG. FOXO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. Cell Stem Cell. 2007; 1(2):140–52.
17. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. Nature. 2010; 463(7281):676–80.
18. Pellicano F, Helgason GV, Allan E, et al. FOXO transcription factor activity is partially retained in quiescent CML stem cells and induced by tyrosine kinase inhibitors in CML progenitor cells [abstract]. Haematologica (EHA Annual Meeting Abstract). 2010; 95(Suppl 1):48.
19. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2005; 352(17):1779–90.
20. Sattler M, Salgia R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. Cytokine Growth Factor Rev 1997; 8(1):63–79.
21. Jiang X, Lopez A, Holyoake T, et al. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(22):12804–9.
22. Xie S, Wang Y, Liu J, et al. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. Oncogene. 2001; 20(43):6188–95.
23. Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. Oncogene 2002; 21(47):7137–46.
24. Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, et al. Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. Oncogene 2009; 28(14):1669–81.
25. Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, et al. Destabilization of Bcr-Abl/Jak2 network by a Jak2/Abl kinase inhibitor ON044580 overcomes drug resistance in blast crisis chronic myelogenous leukemia (CML). Genes Cancer. 2010;19; 1(4):346–59.
26. Caligur V. The stem cell hypothesis. BioFiles 2008, 3.5,4
27. Zhao C, Blum J, Chen A, et al. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. Cancer Cell 2007; 12:528–541.
28. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Eng J Med 2004; 351:657–667.
29. Nagao R, Kimura S, Takeuchi M, et al. A novel β-catenin inhibitor, AV65, suppresses the growth of CML cell lines which aquire Imatinib resistance because of ABL kinase domain mutations including T315I and Hypoxia-Adaptation. ASH Annual Meeting Abstracts, 2010 No 1081.
30. Warren F, Smith J, Mudunuru U, et al. Treatment with β-catenin antagonist BC2059 exhibits single agent efficacy and exerts superior activity with Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) or histone deacetylase (HDAC) inhibitor against human AML, CML and myeloproliferative neoplasms (MPN) progenitor cells. Molec Cancer Therapeutics. 2011 (10) suppl 1, abstract C144.
31. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. Nature 2009; 458:776–779.
32. Dierks C, Beigi R, Guo GR, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. Cancer Cell 2008; 14:238–249.
33. Gao J, Graves S, Koch U, et al. Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. Cell Stem Cell 2009; 4:548–558.
34. Hofmann I, Stover EH, Cullen DE, et al. Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. Cell Stem Cell 2009; 4:559–567.
35. Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. Nature 2008; 19(453):1072–1078.
36. Jaras M, Johnels P, Hansen N, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107(37):16280–5.
37. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. Dev Comp Immunol. 2004;28(5):415–28.
38. Pellicano F, Sinclair A, Holyake TL. In Search of CML stem cells' deadly weakness. Curr Hematol Malig Rep. 2011; 6:82-87.
39. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileuke-

mic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. Blood 2005; 105:3303–3311
40. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, et al. Low-level expression of proapoptotic Bcl-2- interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia: role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and reexpression by novel pharmacologic compounds. Cancer Res 2005; 65:9436–9444.
41. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. Cancer Cell, 2006
42. Kuroda J, Kimura S, Andreeff M, et al. ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myeloid leukaemias with diverse drug-resistance mechanisms. Br J Haematol 2007; 140:181–190.
43. Kuroda J, Kimura S, Strasser A, et al. Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. Cell Death Differ 2007; 14:1667–1677.
44. Tauchi T, Sumi M, Nakajima A, et al. BCL-2 antisense oligonucleotide genasense is active against imatinib-resistant BCR-ABL-positive cells. Clin Cancer Res 2003;9:4267–4273.
45. Carter BZ, Mak D, Schober WD, et al. Regulation of survivin expression through bcr-abl/ MAPK cascade: targeting survivin overcomes Imatinib resistance and increases Imatinib sensitivity in Imatinib responsive CML cells. Blood 2006;107:1555–1563.
46. Mak DH, Schober WD, Chen W, et al. Triptolide induces cell death independent of cellular responses to imatinib in blast crisis chronic myelogenous leukemia cells including quiescent CD34+ primitive progenitor cells. Mol Cancer Ther 2009;8:2509–2516.
47. Mak DH, Wang RY, Schober WD, et al. Activation of apoptosis signaling eliminates CD34+ progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors. Leukemia (28 October 2011) | doi:10.1038/leu.2011.285.
48. Copland M, Pellicano F, Richmond L, et al. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. Blood 2008;111:2843–2853.
49. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, et al. IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. Nature 2009;458:904–908
50. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent longterm prognosis. Cancer 2003;97:1033–1041.
51. Guilhot F, Preudhomme C, Guilhot J, et al. Significant higher rates of undetectable molecular residual disease and molecular responses with pegylated form of interferon a2a in combination with Imatinib (IM) for the treatment of newly diagnosed chronic phase (CP) chronic myeloid leukaemia (CML) patients (pts): confirmatory results at 18 months of part 1 of the spirit phase III randomized trial of the french CML group (FI LMC) [abstract]. ASH 2009. 2009
52. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. J Clin Invest 2009;119(5):1109-1123.
53. Yan CH, Liang ZQ, Gu ZL, Yang YP, Reid P, Qin ZH. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. Toxicon 2006;47(5):521-530.
54. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl mediated drug resistance. Blood 2007;110(1):313-322.
55. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. J Clin Invest 2009;119(5):1109-1123.
56. Crowley LC, Elzinga BM, O'Sullivan GC, McKenna SL. Autophagy induction by Bcr-Abl-expressing cells facilitates their recovery from a targeted or nontargeted treatment. Am J Hematol 2011;86(1):38-47.
57. Schuringa JJ, Vellenga E. Role of the polycomb group gene BMI1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells. Curr Opin Hematol 2010;17(4):294–299.
58. Lessard J, Baban S, Sauvageau G. Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. Blood 1998;91(4):1216–1224
59. Lessard J, Schumacher A, Thorsteinsdottir U, et al. Functional antagonism of the Polycomb-Group genes eed and Bmi1 in hemopoietic cell proliferation. Genes Dev 1999;13(20):2691–2703.
60. Rizo A, Dontje B, Vellenga E, et al. Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BMI1. Blood 2008;111(5):2621–2630.
61. Rizo A, Horton SJ, Olthof S, et al. BMI1 collaborates with BCRABL in leukemic transformation of human CD34+ cells. Blood 2010;116(22):4621–4630.
62. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. Trends Mol Med 2008;14(4):152–160.
63. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. Cancer Cell 2005;8(5):355–368.
64. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. J Clin Invest 2007;117(9):2408–2421.