Клиническая онкогематология. 2016;9(1):1–5

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

Clinical oncohematology. 2016;9(1):1–5

ONCO clinical HEMATOLOGY

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL RESEARCH

PF-114, новый ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl, снижает фосфорилирование CrkL и вызывает гибель клеток хронического миелоидного лейкоза

Е.С. Колотова[1], В.В. Татарский[1], А.А. Зейфман[2,3], О.В. Строганов[2,3], В.С. Стройлов[2,3], И.Ю. Титов[2,3], Ф.Н. Новиков[2,3], А.А. Калинина[1], Г.Г. Чилов[2,3], А.А. Штиль[1]

[1] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

[2] ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» РАН, Ленинский пр-т, д. 47, Москва, Российская Федерация, 119991

[3] ООО «Фьюжн Фарма», ул. Генерала Дорохова, д. 18, стр. 2, Москва, Российская Федерация, 119530

PF-114, a Novel Inhibitor of Bcr-Abl Chimeric Tyrosine Kinase, Attenuates Intracellular CrkL Phosphorylation and Kills Chronic Myeloid Leukemia Cells

ES Kolotova[1], VV Tatarskii[1], AA Zeifman[2,3], OV Stroganov[2,3], VS Stroilov[2,3], IYu Titov[2,3], FN Novikov[2,3], AA Kalinina[1], GG Chilov[2,3], AA Shtil'[1]

[1] N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

[2] N.D. Zelinskii Institute of Organic Chemistry, 47 Leninskii pr-t, Moscow, Russian Federation, 119991

[3] Fusion Pharma, 18 bld. 2 Generala Dorokhova str., Moscow, Russian Federation, 119530

РЕФЕРАТ

Актуальность и цели. Химерная тирозинкиназа Bcr-Abl вызывает злокачественную трансформацию миелоидных клеток посредством фосфорилирования ряда субстратов, важнейшим из которых является адаптерный белок CrkL. Фармакологическое ингибирование Bcr-Abl-зависимого сигналинга (передача сигнала) — основной современный подход в лечении больных хроническим миелоидным лейкозом. В результате молекулярного моделирования создан новый селективный ингибитор Bcr-Abl (PF-114). В работе определена цитотоксичность PF-114 для клеток хронического миелоидного лейкоза и изучено его влияние на фосфорилирование CrkL.

Методы. Цитотоксичность определяли с помощью MTT-теста. Суммарный внутриклеточный пул CrkL (фосфорилированная и нефосфорилированная формы) определяли методом проточной цитофлюориметрии.

Результаты. Инкубация Bcr-Abl-положительных клеток (линия K562) с PF-114 приводила к отмене фосфорилирования CrkL и гибели клеток. Фосфорилирование CrkL в Bcr-Abl-негативных линиях лейкозных клеток (HL60, U937 и Jurkat) не выявлено.

Заключение. Отсутствие фосфорилирования CrkL в Bcr-Abl-негативных линиях (HL60, U937 и Jurkat) и гибель клеток HL60 при действии концентраций PF-114, значительно превышающих требуемые для гибели линии K562, подтверждают перспективность создания лекарственного препарата для терапии хронического миелоидного лейкоза на основе PF-114.

Ключевые слова: хронический миелоидный лейкоз, тирозинкиназа Bcr-Abl, фосфорилирование белков, проточная цитофлюориметрия, цитотоксичность.

ABSTRACT

Background & Aims. The chimeric tyrosine kinase Bcr-Abl triggers malignant transformation of myeloid cells via phosphorylation of a number of substrates including the CrkL adaptor protein. Pharmacological inhibition of Bcr-Abl mediated signaling is a major strategy in treatment of patients with chronic myeloid leukemia (CML). A new specific Bcr-Abl inhibitor (PF-114) was designed using a molecular modeling approach. The paper defines the cytotoxicity of PF-114 against CML cells and its effect on the CrkL phosphorylation.

Methods. The cytotoxicity was determined using the MTT assay. The total intracellular CrKL pool (phosphorylated and non-phosphorylated forms) was determined by means of flow cytometry.

Results. Exposure of Bcr-Abl-positive, K562 cell line to PF-114 blocked intracellular CrkL phosphorylation and caused cell death. In contrast, virtually no phosphorylated CrkL was detectable in Bcr-Abl-negative HL60, U937 and Jurkat leukemia cell lines.

Conclusion. Absence of CrkL phosphorylation in Bcr-Abl-negative cells (HL60, U937 and Jurkat) and death of HL60 cells under the effect of PF-114 at concentrations exceeding those required to kill K562 cells supports the emergence of PF-114 as a promising drug candidate for CML.

Keywords: chronic myeloid leukemia, Bcr-Abl tyrosine kinase, protein phosphorylation, flow cytometry, cytotoxicity.

© 2016 практическая медицина

Получено: 15 сентября 2015 г.
Принято в печать: 8 октября 2015 г.

Для переписки: Александр Альбертович Штиль, д-р мед. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: + 7(499)612-78-34; e-mail: shtilaa@yahoo.com

Для цитирования: Колотова Е.С., Татарский В.В., Зейфман А.А. и др. PF-114, новый ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl, снижает фосфорилирование CrkL и вызывает гибель клеток хронического миелоидного лейкоза. Клиническая онкогематология. 2016;9(1):1–5.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-1-1-5

Received: September 15, 2015
Accepted: October 8, 2015

For correspondence: Aleksandr Al'bertovich Shtil', DSci, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: + 7(499)612-78-34; e-mail: shtilaa@yahoo.com

For citation: Kolotova ES, Tatarskii VV, Zeifman AA, et al. PF-114, a Novel Inhibitor of Bcr-Abl Chimeric Tyrosine Kinase, Attenuates Intracellular CrkL Phosphorylation and Kills Chronic Myeloid Leukemia Cells. Clinical oncohematology. 2016;9(1):1–5 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-1-1-5

ВВЕДЕНИЕ

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся наличием Ph-хромосомы, несущей химерный ген *Bcr-Abl*. Этот ген образуется в результате транслокации (9;22)(q34;q11) в стволовых кроветворных клетках [1]. В нормальных клетках тирозинкиназа Abl (**Ab**elson murine **l**eukemia viral oncogene homolog 1) участвует в регуляции пролиферации, выживания, адгезии, миграции клеток, а также опосредует ответ на генотоксический стресс [2, 3]. Функции белка Bcr (**B**reakpoint **c**luster **r**egion) в нормальных клетках не вполне ясны. В структуре Bcr выявлены фрагменты, важные для патогенеза ХМЛ [4]. В химерном белке Abl постоянно аутофосфорилирована, что приводит к активации сигнальных каскадов через адаптерные белки Grb2 и CrkL [5] (рис. 1). Фосфорилирование CrkL (Crk-like) по остатку тирозина в положении 207 обнаружено при ХМЛ и не выявлено в нормальных нейтрофилах [6]. Это событие — раннее и важное звено в передаче сигналов в клетках с Bcr-Abl. Фосфорилирование CrkL активирует нижележащие сигнальные молекулы, что вызывает передачу пролиферативных сигналов (см. рис. 1). Активация этих каскадов, а также ограничение апоптотического сигналинга (передача сигнала) позволяют Bcr-Abl-позитивным клеткам выживать и пролиферировать независимо от регуляции факторами роста.

Фармакологическое ингибирование Bcr-Abl — основной современный подход в лечении больных ХМЛ, а снижение доли фосфорилированного CrkL в клетках может служить маркером ответа на действие ингибиторов Bcr-Abl [8]. Ингибитор Bcr-Abl первого поколения, иматиниб, эффективен при отсутствии мутаций в *Bcr-Abl* [9]. Появление вторичных мутаций в киназном домене *Abl* приводит к резистентности к иматинибу, что требует использования препаратов второго поколения: дазатиниба, нилотиниба или босутиниба [10]. Тем не менее мутации в *Abl*, в частности самая распространенная T315I, обусловливают устойчивость опухолевых клеток и к препаратам второго поколения. Единственный одобренный в настоящее время препарат, эффективный при ХМЛ с мутацией T315I, — понатиниб, ингибитор Bcr-Abl третьего поколения [11]. Однако вследствие недостаточно высокой селективности понатиниба профиль его безопасности неоптимален. Недавно разработанный нами ингибитор Bcr-Abl третьего поколения PF-114 (рис. 2) в доклинических исследованиях показал эффективность при ХМЛ с мутацией T315I и существенно более селективное ингибирование протеинкиназ, а также безопасность [12].

В настоящей работе исследованы важные свойства PF-114 как прототипа лекарственного препарата: цитотоксичность для Bcr-Abl-позитивных и -негативных клеток, а также ингибирование киназной активности Bcr-Abl в линии клеток ХМЛ по снижению фосфорилирования белка CrkL.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

PF-114 растворяли в диметилсульфоксиде до конечной концентрации 10 ммоль/л и хранили при температуре

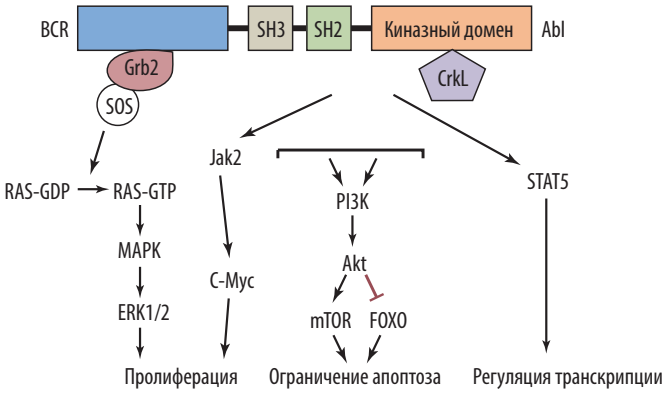


Рис. 1. Пути передачи сигналов в Bcr-Abl-позитивных клетках (цит. по [7])

Fig. 1. Signal transmission pathways in Bcr-Abl-positive cells (cited according to [7])

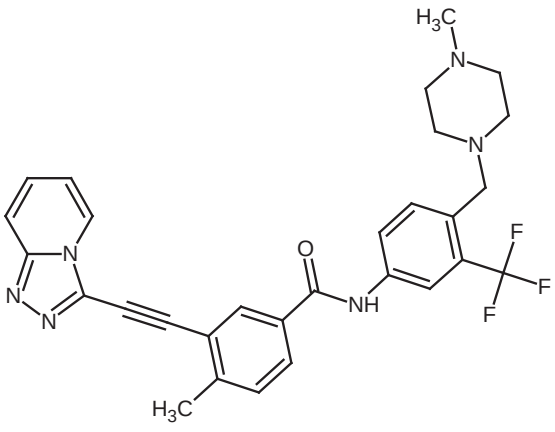


Рис. 2. Структура PF-114

Fig. 2. Structure of PF-114

−20 °С. В день эксперимента готовили водные растворы для внесения в культуру клеток. Реагенты приобретены в компании Sigma (США), кроме особо оговоренных случаев. Цитотоксичность PF-114 определяли в МТТ-тесте. Клетки линий К562 (ХМЛ) и HL60 (острый промиелоцитарный лейкоз) вносили в 96-луночные планшеты (Costar, США) в концентрации 5×10^3 в 190 мкл культуральной среды RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Австрия), 2 ммоль/л L-глутамина и 5% раствора пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия). В лунки вносили PF-114 до конечных концентраций 0,01−12,5 нмоль/л. Каждую концентрацию тестировали трижды. Клетки инкубировали при 37 °С и 5% CO_2 в течение 72 ч. По окончании инкубации в лунки вносили 20 мкл водного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) и инкубировали 2 ч. О жизнеспособности клеток судили по цветной реакции, развивающейся при восстановлении МТТ в формазан. Окраску регистрировали на спектрофотометре (Bio-Rad Benchmark Plus, США) при длине волны возбуждения 570 нм. При вычислении процента выживших клеток при той или иной концентрации PF-114 оптическую плотность в лунках, где клетки инкубированы в отсутствие PF-114, принимали за 100 %.

Суммарный внутриклеточный пул CrkL (фосфорилированная и нефосфорилированная формы) определяли методом проточной цитофлюориметрии [13]. Клетки линии К562 инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С в отсутствие (контроль) или в присутствии PF-114 (концентрации указаны на рис. 3), фиксировали 2% параформальдегидом (10 мин, 37 °С), дважды отмывали однократным фосфатно-солевым буфером и помещали на лед. Клетки пермеабилизировали (делали проницаемыми) 30 мин метанолом, отмывали в том же буфере с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и ресуспендировали в 100 мкл 10% сыворотки крови человека (30 мин, 4 °С) для предотвращения неспецифического связывания антител с клетками. Затем клетки центрифугировали (5 мин, 5000 об./мин), к осадку добавляли кроличьи антитела к нефосфорилированному CrkL (SantaCruz, США; 1:50) и мышиные антитела к фосфорилированному CrkL, конъюгированные с фикоэритрином (ФЭ) (BD Biosciences, США; 1:5). Клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и отмывали от несвязавшихся антител. К осадку добавляли вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные AlexaFluor488 (Invitrogen, США; 1:1000) в буфере с 1% БСА, инкубировали 30 мин при комнатной температуре, отмывали и анализировали в проточном цитофлюориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Все процедуры с антителами (инкубации, отмывка) проводили в буфере с 1% БСА. Для каждого образца накапливали 20 000 флюоресцентных «событий». Указанные условия экспериментов соответствовали рекомендациям производителей антител и оптимизированы нами. По этой же методике определяли общий и фосфорилированный CrkL в линиях Bcr-Abl-негативных лейкозов: HL60, U937 (монобластный) и Jurkat (Т-лимфобластный). Обработка результатов осуществлялась в программе FacsDiva (BD, США).

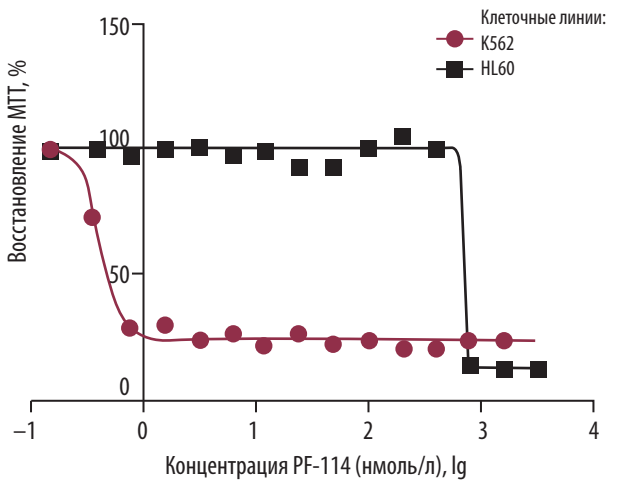


Рис. 3. Выживаемость клеток линий К562 (хронический миелолейкоз) и HL60 (острый промиелоцитарный лейкоз) при действии PF-114. Каждое значение на графиках — среднее 3-х независимых измерений с погрешностью ≤ 10 %
МТТ — бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий.

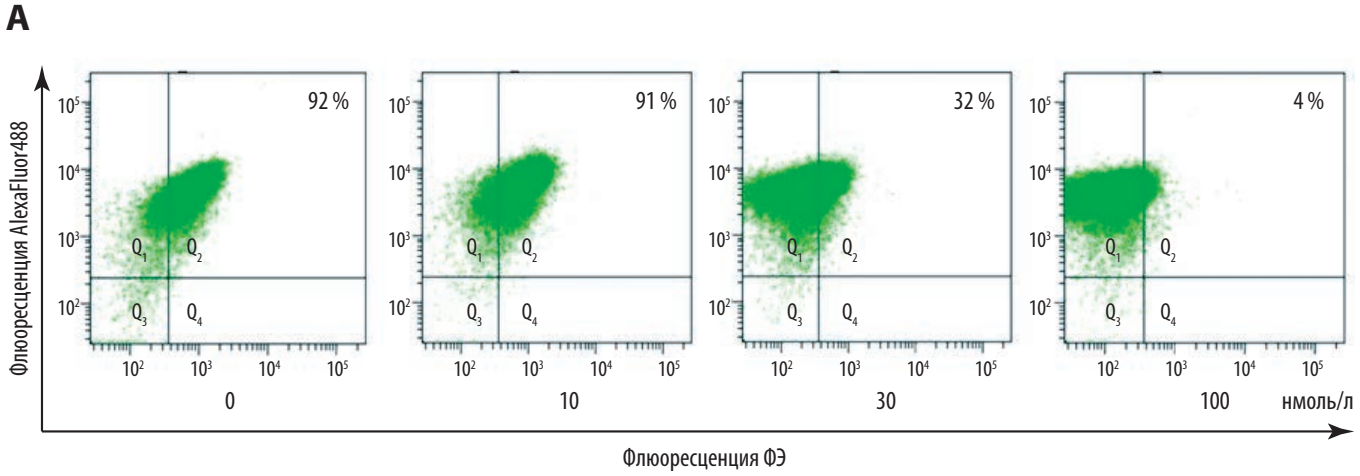
Fig. 3. Survival of K562 cell lines (chronic myeloid leukemia) and HL60 (acute promyelocytic leukemia) under exposure to lg nmol PF-114. Each value in the plots represents a mean of three independent measurements with ≤ 10 % error
MTT — 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Соединение PF-114 высокоактивно в отношении Bcr-Abl-позитивных клеток. Гибель клеток линии К562 отмечена при действии наномолярных или даже субнаномолярных концентраций PF-114. Диапазон концентраций, вызывающих гибель 50 % клеток (IC_{50}), составил 0,4−6 нмоль/л (по результатам 5 экспериментов). Изучение зависимости гибели клеток от времени инкубации с PF-114 показало, что цитотоксический эффект развивается относительно медленно. На рис. 3 представлены результаты типичного эксперимента, показывающие, что и через 72 ч инкубации сохраняется около 30 % жизнеспособных (метаболизирующих МТТ) клеток. Гибель всей клеточной популяции наступает через 4−5 дней; этому предшествует задержка клеточного цикла.

Клетки Bcr-Abl-негативного лейкоза (линия HL60) выживали при действии значительно более высоких концентраций PF-114 (см. рис. 3), что свидетельствует о высокой специфичности соединения к основной внутриклеточной мишени — тирозинкиназе Bcr-Abl.

Для ответа на вопрос о связи цитотоксичности PF-114 с его способностью ингибировать фосфорилирование CrkL клетки линии К562 инкубировали с PF-114 в течение 2 ч и исследовали долю клеток, несущих фосфо-CrkL, по отношению к общему пулу белка. Результаты проточной цитофлюориметрии показали, что относительное содержание клеток с фосфо-CrkL снижалось с увеличением концентрации соединения. В необработанных клетках выявлено 92 % фосфо-CrkL-позитивных клеток (рис. 4, *А*, правый верхний квадрант). При действии 10 нмоль/л PF-114 количество таких клеток почти не изменилось. Существенное снижение отмечено только при более высоких концентрациях PF-114: 30 нмоль/л — до 32 %, 100 нмоль/л — до 4 %. В линиях HL60, U937 и Jurkat фосфо-CrkL-позитивные клетки не выявлены, т. е. в Bcr-Abl-негативных линиях белок CrkL нефосфорилирован. Таким образом, для определения активности новых ингибиторов химерной тирозинкиназы указанная



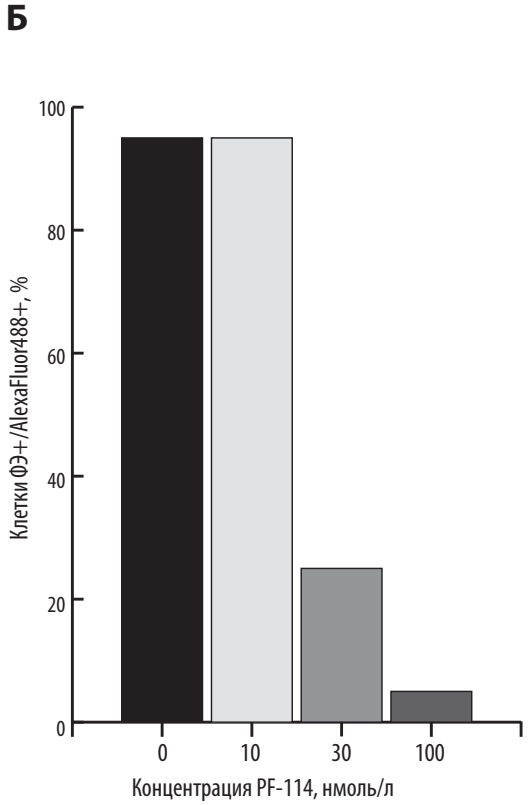


Рис. 4. Снижение фосфорилирования CrkL при увеличении концентрации PF-114. (*А*) Гистограммы распределения флюоресцентных «событий» (типичный эксперимент). (*Б*) Доля CrkL-позитивных клеток (данные 3 экспериментов; средние величины ± средние квадратичные отклонения). Фикоэритрин (ФЭ) и AlexaFluor488 — флюоресцентные красители. Их химически конъюгируют к первичным или вторичным антителам для многоцветной детекции белков в проточной цитофлюориметрии либо иммуноцито(гисто)химии. Концентрация PF-114 в нмоль/л (0, 10, 30, 100) указана не на оси X, а под отдельными квадратами. На осях X и Y — флюоресценция клеток в детекторах прибора, определяющих свечение ФЭ (ось X) или AlexaFluor488 (ось Y). Единицы измерения для ФЭ и AlexaFluor488 — так называемые каналы флюоресценции, т. е. условные величины яркости (или интенсивности флюоресценции). Эти величины отражают количество клеток, присоединивших то или иное антитело с флюоресцентным красителем. Яркость клеток пропорциональна количеству присоединенного антитела с соответствующим красителем и определяется положением светящихся клеток относительно осей координат (на панели *А* — «облака» зеленого цвета)

Fig. 4. Decreased CrkL phosphorylation with increased PF-114 concentration. (*A*) Histograms of distribution of fluorescent events (typical experiment). (*Б*) Portion of CrkL-positive cells (data from 3 experiments; mean values ± standard deviations). Phycoerythrin (ФЭ) and AlexaFluor488 are fluorescent dye. They are conjugated chemically to primary and secondary antibodies for multicolored protein detection in flow cytometry or immunocyto(histo)chemistry. The PF-114 concentrations (in nmol/l; 0, 10, 30, 100) are indicated not on the X axis, but under individual squares. X and Y axes: fluorescence of cells in instrument detectors demonstrating luminescence of ФЭ (X axis) or AlexaFluor488 (Y axis). Measuring units for ФЭ and AlexaFluor488: so called fluorescent channels, i.e. conditional brightness values (or fluorescence intensity). These values reflect the number of cells which have attached this or that antibody with the fluorescent dye. Cell brightness is proportional to the amount of attached antibody with a corresponding stain and is determined by the location of fluorescent cells relative to the axis (on *A* panel: green 'clouds')

тест-система пригодна, т. к. специфична только для Bcr-Abl-позитивных клеток и адекватна для количественной характеристики функциональной активности Bcr-Abl.

Сопоставление экспериментальных условий реализации гибели Bcr-Abl-позитивных клеток и ингибирования в них фосфорилирования CrkL важно для установления механизмов противоопухолевого действия PF-114. Если гибель клеток K562 развивается в течение нескольких суток, то для ингибирования Bcr-Abl-опосредованного фосфорилирования CrkL достаточно относительно кратковременного (2 ч) воздействия. Цитотоксический эффект проявляется при более низких концентрациях PF-114, чем требуемые для ингибирования фосфорилирования CrkL. Действительно, снижение доли клеток с фосфо-CrkL наблюдается при использовании высоких (сверхлетальных) концентраций PF-114. Даже 10 нмоль/л — концентрация, превышающая IC_{50} (см. рис. 3), оказалась недостаточной для ингибирования Bcr-Abl-зависимого фосфорилирования в использованных нами экспериментальных условиях. Вероятно, для достижения гибели клеток необязательно блокирование фосфорилирования именно белка CrkL. Кроме CrkL другие белки-партнеры Bcr-Abl (см. рис. 1) могут принимать участие в индукции и реализации цитотоксичности PF-114. Ресурс www.kinasource.co.uk [14] приводит перечень из 18 белков, фосфорилируемых химерной тирозинкиназой, среди которых каспаза 9, РНК-полимераза II, ДНК-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа D и др. Требуется установить роль LASP1 (LIM and SH3 domain protein) — белка, ассоциированного с цитоскелетом и фосфорилируемого Bcr-Abl [15, 16]. Интересна и возможность ингибирования аутофосфорилирования самой тирозинкиназы, показанная для иматиниба [17]: в этом случае прерываются разные Bcr-Abl-зависимые сигнальные пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для установления связи механизмов цитотоксичности PF-114 с ингибированием фосфорилирования белков-партнеров требуется детальное исследование зависимости указанных феноменов от концентрации соединения и вре-

мени воздействия. Важно, что высокая специфичность к внутриклеточной мишени, преимущественная цитотоксичность для клеток ХМЛ, способность подавлять функцию химерной тирозинкиназы как результат клинически важной мутации, а также благоприятные фармакологические свойства [12] обусловливают перспективность нового препарата для лечения ХМЛ на основе соединения PF-114.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. А.А. Штиль, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовал в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.А. Штиль, Г.Г. Чилов.
Сбор и обработка данных: Е.С. Колотова, В.В. Татарский, А.А. Калинина.
Предоставление материалов исследования: Г.Г. Чилов, А.А. Зейфман, О.В. Строганов, В.С. Стройлов, И.Ю. Титов, Ф.Н. Новиков.
Анализ и интерпретация данных: все авторы.
Подготовка рукописи: А.А. Штиль, Г.Г. Чилов, Е.С. Колотова, В.В. Татарский.
Окончательное одобрение рукописи: А.А. Штиль.
Административная поддержка: А.А. Штиль.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Mace ML, Dahl J, Jabbour EJ. Which tyrosine-kinase inhibitor to use first in chronic phase chronic myelogenous leukemia? Expert Opin Pharmacother. 2015;16(7):999–1007. doi: 10.1517/14656566.2015.1031107.

2. Grover P, Shi H, Baumgartner M, et al. Fluorescence polarization screening assays for small molecule allosteric modulators of ABL kinase function. PLoS One. 2015;10(7):e0133590. doi: 10.1371/journal.pone.0133590.

3. Panjarian S, Iacob RE, Chen S, et al. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. J Biol Chem. 2013;288(8):5443–50. doi: 10.1074/jbc.r112.438382.

4. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей. Под ред. М.А. Волковой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2007. С. 555.
[Volkova MA, ed. Klinicheskaya onkogematologiya: Rukovodstvo dlya vrachei. (Clinical oncohematology: guidelines for doctors.) 2nd revised edition. Moscow: Meditsina Publ.; 2007. pp. 555. (In Russ)]

5. Panigrahi S, Stetefeld J, Jangamreddy JR, et al. Modeling of molecular interaction between apoptin, BCR-Abl and CrkL — an alternative approach to conventional rational drug design. PLoS One. 2012;7(1):e28395. doi: 10.1371/journal.pone.0028395.

6. Nichols GL, Raines MA, Vera JC, et al. Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. Blood. 1994;84(9):2912–8.

7. Jangamreddy JR, Panigrahi S, Lotfi K, et al. Mapping of apoptin-interaction with BCR-ABL1, and development of apoptin-based targeted therapy. Oncotarget. 2014;5(16):7198–211. doi: 10.18632/oncotarget.2278.

8. Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase activity at diagnosis, as determined via the pCrkL/CrkL ratio, is predictive of clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2010;149(3):458–60. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08066.x.

9. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2003;348(11):994–1004. doi: 10.1056/nejmoa022457.

10. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood. 2013;122(6):872–84. doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.

11. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 2012;367(22):2075–88. doi: 10.1056/nejmoa1205127.

12. Mian AA, Rafiei A, Haberbosch I, et al. PF-114, a potent and selective inhibitor of native and mutated BCR/ABL is active against Philadelphia chromosome-positive (Ph+) leukemias harboring the T315I mutation. Leukemia. 2015;29(5):1104–14. doi: 10.1038/leu.2014.326.

13. Hamilton A, Elrick L, Myssina S, et al. BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry. Leukemia. 2006;20(6):1035–9. doi: 10.1038/sj.leu.2404189.

14. Knebel A. Kinasource protein kinase substrate screen KESTREL. Available from: http://www.kinasource.co.uk/ (accessed 21.03.2016).

15. Lin YH, Park ZY, Lin D, et al. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. J Cell Biol. 2004;165(3):421–32. doi: 10.1083/jcb.200311045.

16. Frietsch JJ, Kastner C, Grunewald TG, et al. LASP1 is a novel BCR-ABL substrate and a phosphorylation-dependent binding partner of CRKL in chronic myeloid leukemia. Oncotarget. 2014;5(14):5257–71. doi: 10.18632/oncotarget.2072.

17. Liang X, Hajivandi M, Veach D, et al. Quantification of change in phosphorylation of BCR-ABL kinase and its substrates in response to Imatinib treatment in human chronic myelogenous leukemia cells. Proteomics. 2006;6(16):4554–64. doi: 10.1002/pmic.200600109.